



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO – PRPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO – PPGAN

RODRIGO BARBOSA MONTEIRO CAVALCANTE

**PÃO DE QUEIJO ENRIQUECIDO COM FEIJÃO-CAUPI
BIOFORTIFICADO E SUAS CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS,
NUTRITIVAS E FUNCIONAIS.**

TERESINA – PI

2018

RODRIGO BARBOSA MONTEIRO CAVALCANTE

**PÃO DE QUEIJO ENRIQUECIDO COM FEIJÃO-CAUPI
BIOFORTIFICADO E SUAS CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS,
NUTRITIVAS E FUNCIONAIS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Linha de Pesquisa: Alimentos Funcionais e Desenvolvimento de Produtos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo (DN/PPGAN-UFPI).

TERESINA – PI

2018

RODRIGO BARBOSA MONTEIRO CAVALCANTE

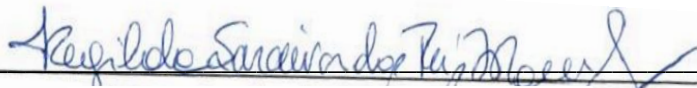
**PÃO DE QUEIJO ENRIQUECIDO COM FEIJÃO-CAUPI
BIOFORTIFICADO E SUAS CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS,
NUTRITIVAS E FUNCIONAIS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

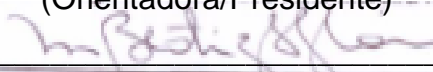
Linha de Pesquisa: Alimentos Funcionais e Desenvolvimento de Produtos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo (DN/PPGAN-UFPI).

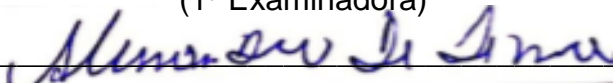
BANCA EXAMINADORA



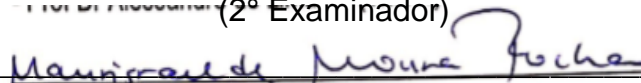
Prof^a. Dr^a. Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo (DN/PPGAN/UFPI)
(Orientadora/Presidente)



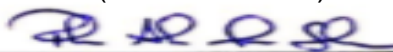
Prof^a. PhD. Maria Beatriz de Abreu Glória (DA/FAFAR/UFMG)
(1^a Examinadora)



Prof. Dr. Alessandro de Lima (IFPI/PPGAN/UFPI)
(2^o Examinador)



Prof. Dr. Maurisrael de Moura Rocha (EMBRAPA/PPGAN/UFPI)
(3^o Examinador)



Prof. Dr. Robson Alves da Silva (IFPI/PPGAN/UFPI)
(4^o Examinador)

Aos meus pais, Roseli Barbosa e Nonato
Cavalcante (*in memoriam*),

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me proporcionado saúde ao longo desses dez anos de UFPI, o bem mais precioso e o que nos torna aptos para o trabalho.

À professora Regilda Moreira-Araújo pela convivência, carinho e aprendizado. Perto dela nos sentimos fortes, protegidos e com a certeza de que tudo vai dar certo. Foi gratificante ver a evolução do LABROMBIOQ/LASA. A cada projeto financiado eram novos equipamentos / reagentes, novas metodologias validadas, novas ideias e sonhos. Coordenar um laboratório, exercer funções administrativas e qualificar pessoas é sua grande marca. Obrigado professora, por cada conselho, pela torcida e por não medir esforços para o sucesso dos seus orientandos. Serei eternamente grato pelas oportunidades concedidas.

Ao professor Marcos Antônio da Mota Araújo pelo carinho e cuidado desde o primeiro contato. A cada encontro é a mesma alegria, preocupação e torcida verdadeira. Obrigado pelo zelo com nossos resultados desde a iniciação científica.

Aos membros da banca de defesa, Prof^a. PhD Maria Beatriz de Abreu Glória, Prof. Dr. Maurisrael de Moura Rocha, Prof. Dr. Robson Alves da Silva e Prof. Dr. Alessandro de Lima por contribuírem com seus conhecimentos desde o Mestrado.

À Universidade Federal do Piauí pela excelência no Ensino, Pesquisa, Extensão e Internacionalização. Foi meu endereço diário por dez anos e palco de inúmeras conquistas.

A todos os professores e funcionários do PPGAN e DN pela prestatividade e companhia desde 2007.

A cada aluno que ministrei Bioquímica Básica. Esta experiência foi uma conquista muito sonhada desde a graduação em Nutrição. Todos os alunos foram super carinhosos, educados e tinham uma enorme admiração por mim.

À Nara Vanessa por todo carinho e companheirismo desde o primeiro dia de LABROMBIOQ/LASA.

Aos colegas de laboratório, em especial, agradeço a Rayssa Porto por tamanha competência e doação às análises.

À minha mãe que é alegria, companhia, força e amor. Obrigado por não medir esforços para meu conforto e por ser solução diante das adversidades. Sua mão amiga e torcida faz tudo valer à pena.

Ao meu pai (*in memoriam*) que deixou um legado de humildade, prestatividade e leveza. Os sacrifícios realizados em prol da minha educação jamais serão esquecidos.

Ao amigo Jerrison Moraes pelos inúmeros momentos de diversão compartilhados e pela ajuda perante as mais diversas situações. Sem dúvidas, um irmão que a vida me presenteou.

À Iuska, Juliana, Nayara, Raphael, Vinícius e Rogério por serem presentes e auxiliarem a caminhada. Tudo fica mais leve na companhia de pessoas que escolhemos conviver.

Aos meus familiares por terem contribuído para minha evolução e crescimento pessoal.

Por fim, agradeço à vida por tantas bênçãos e sonhos realizados.

“Existe um tempo certo para cada coisa, momento oportuno para cada propósito debaixo do sol (...) tempo de plantar, tempo de colher.”

Eclesiastes, Cap. 3.

RESUMO

CAVALCANTE, R. B. M. **Pão de queijo enriquecido com feijão-caupi biofortificado e suas características sensoriais, nutritivas e funcionais**. 2018. 120 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Teresina – PI.

O pão de queijo é um produto de panificação que apresenta ótima aceitação e é largamente consumido por pessoas de todas as idades. O feijão-caupi, um alimento básico para as populações do Nordeste brasileiro, é fonte de proteínas, carboidratos, fibras alimentares, vitaminas, minerais e compostos bioativos. Assim, objetivou-se desenvolver um pão de queijo enriquecido com feijão-caupi aceito sensorialmente e determinar suas características nutritivas e funcionais. A Escala Hedônica, Intenção de Compra e Comparação Pareada foram os testes realizados com cem assessores não treinados. Posteriormente, a composição centesimal, valor energético total, fibra alimentar, minerais, compostos bioativos e a atividade antioxidante foram determinados no produto com farinha integral de feijão-caupi em substituição ao polvilho. Foi criado um banco de dados no programa *Statistical Packarge for the Social Sciences*, versão 21.0. Para comparação das médias entre duas variáveis foi aplicado o *t* de *Student*. Através do teste do One Way ANOVA: Post Hoc multiple comparisons, utilizou-se o teste de Tukey, ao nível de 5%, com intervalo de confiança de 95% para os testes. Verificou-se com a análise sensorial realizada a aceitação dos produtos enriquecidos. O pão de queijo com feijão-caupi é fonte de proteínas e tem alto conteúdo de fibras alimentares, destacando-se as frações insolúveis, além de teores significativos de cinzas, lipídeos e carboidratos. O produto desenvolvido teve um aumento no valor energético total e, em relação ao teor de minerais, é fonte de cobre, zinco e sódio e apresenta alto conteúdo de cálcio, fósforo e magnésio. Os teores de fenólicos totais, flavonóides totais e taninos condensados aumentaram no pão de queijo enriquecido. O pão de queijo com feijão-caupi apresentou um incremento no teor de espermidina e baixo teor de aminos biogênicas. Verificou-se ainda uma melhora da atividade antioxidante do pão de queijo com o incremento de feijão-caupi na formulação. Concluiu-se, portanto, que o feijão-caupi é uma opção viável para o enriquecimento de alimentos de panificação, como o pão de queijo.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*; produto de panificação; micronutrientes; compostos bioativos.

ABSTRACT

CAVALCANTE, R. B. M. **Cheese bread enriched with biofortified cowpea and their sensory, nutritional and functional characteristics.** 2018. 120 f. Thesis (Doctoral) – Postgraduate Program in Food and Nutrition, Federal University of Piauí, Teresina – PI.

Cheese bread is a baking product that has great acceptance and is widely consumed by people of all ages. Cowpea, a staple food for populations in the Brazilian Northeast, is a source of protein, carbohydrates, dietary fiber, vitamins, minerals and bioactive compounds. Thus, it was aimed to develop a cheese bread enriched with cowpea sensorially accepted and to determine its nutritional and functional characteristics. The Hedonic Scale, Intention to Purchase and Paired Comparison were the tests performed with one hundred untrained assessors. Subsequently, the centesimal composition, total energetic value, dietary fiber, minerals, bioactive compounds and antioxidant activity were determined in the product with integral meal of cowpea in substitution to the sprinkle. A database was created in the *Statistical Packarge for the Social Sciences* program, version 21.0. To compare the means between two variables, *Student t* was applied. Using the One Way ANOVA: Post Hoc multiple comparisons test, Tukey's test was used at a level of 5%, with a 95% confidence interval for the tests. The acceptance of the enriched products was verified with the sensorial analysis. Cheese bread with cowpea beans is a source of protein and has a high content of dietary fiber, especially insoluble fractions, as well as significant levels of ashes, lipids and carbohydrates. The developed product had an increase in the total energy value and, in relation to the mineral content, it is a source of copper, zinc and sodium and presents high content of calcium, phosphorus and magnesium. The content of total phenolics, total flavonoids and condensed tannins increased in enriched cheese bread. Enriched cheese bread shows an increase in spermidine contents and low levels of biogenic amines. There was also an improvement in the antioxidant activity of the cheese bread with the increase of cowpea in the formulation. It is concluded, therefore, that cowpea presents itself as a viable option for the enrichment of baking foods, such as cheese bread.

Keywords: *Vigna unguiculata*; bakery product; micronutrients; bioactive compounds.

LISTA DE FIGURAS

1. Estrutura química dos flavonóides.	23
2. Estrutura química de tanino hidrolisado.	24
3. Estrutura química de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol.	25
4. Síntese de poliaminas.	25
5. Vias de formação das aminas biogênicas.	26
6. Estabilização do radical livre DPPH.	28
7. Estabilização do radical ABTS●+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.	28
8. Purchase intent for cheese bread formulations enriched with whole biofortified cowpea flour (<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp).	51

LISTA DE TABELAS

1. Classes de compostos fenólicos em plantas e suas estruturas.	21
2. Percentage of raw materials used in standard cheese bread formulations and in formulations enriched with CF after laboratory tests.	48
3. Overall acceptance of cheese bread enriched with whole biofortified cowpea flour (<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp).	51
4. Paired comparison test between the cheese bread formulations.	52
5. Mineral contents of the standard cheese bread and of the formulation F1 and the percentage of fulfilment of the recommended daily intake (RDI) for children aged between 4 and 6 years.	53
6. Mean and standard deviation of the proximate composition and total energy value (TEV) of cheese bread formulations.	54
7. Percentage of recommended daily intake (RDI) for macronutrients' fulfilment.	55
8. Percentages of the raw materials used in the formulation.	62
9. Mineral content in cheese bread enriched with FFC and the percentage of coverage of the DRI.	64
10. Levels of phenolic compounds in standard cheese bread and enriched.	65
11. Bioactive amine content in cowpea (BRS Aracê), Standard cheese bread and cheese bread enriched with FFC.	66
12. Antioxidant activity in standard cheese bread and enriched with full cowpea bean flour.	68
13. Proximate compositions and total energy values of the grains of five cowpea cultivars before and after thermal processing.	92
14. Total polyphenols in grains of cowpea cultivars before and after thermal processing and in the cooking broth.	93
15. Total flavonoids in grains of cowpea cultivars before and after thermal processing and in the cooking broth.	94
16. Total anthocyanins in grains of cowpea cultivars before and after thermal processing and in the cooking broth.	95
17. Condensed tannins in grains of cowpea cultivars before and after thermal processing and in the cooking broth.	96
18. Antioxidant activity of grains of cowpea cultivars before and after thermal processing and in the cooking broth.	97
19. Total polyphenols in the grain of cowpea cultivars before and after thermal processing, and in the cooking broth.	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico
ADC	Arginina Descarboxilase
ANOVA	Análise de Variância
BHT	Butil-hidroxitolueno
Ca	Cálcio
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CF	Cowpea Flour
Cu	Cobre
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Cy-3-glu	Cianidina-3-glicosídeo
DCV	Doenças Cardiovasculares
DN	Departamento de Nutrição
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilidrazil
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EQ	Equivalente a Quercetina
EC	Equivalente a Catequina
Fe ²⁺	Ferroso
FFC	Farinha de Feijão-Caupi
F1	Formulação 1
F2	Formulação 2
F3	Formulação 3
GAE	Equivalente a Ácido Gálico
HNO ₃	Ácido Nítrico
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICP OES	Espectrometria de Emissão Atômica com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado
IDR	Ingestão Dietética de Referência
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
LABROMBIOQ	Laboratório de Bromatologia e Bioquímica de Alimentos
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
Na	Sódio
NINTEC	Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia
ODC	Ornitina Descarboxilase
OH ⁻	Grupo Hidroxila
P	Fósforo
pH	Potencial Hidrogeniônico

RNA	Ácido Ribonucleico
SAM	S-adenosilmetionina
SD	Standard Deviation
SMDC	S-adenosilmetionina Descarboxilase
SP	São Paulo
SpdS	Espermidina Sintase
SpmS	Espermina Sintase
SPSS	<i>Statistical Packarge for the Social Sciences</i>
TAMIN	Tabela de Teores de Aminoácidos Bioativos em Alimentos
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEAC	Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UV	Radiações Ultravioletas
VET	Valor Energético Total
Zn	Zinco

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	15
INTRODUÇÃO GERAL	15
OBJETIVOS	17
Geral	17
Específicos	17
REFERENCIAL TEÓRICO	18
Pão de Queijo	18
Feijão-caupi	19
Desenvolvimento de Produtos com Feijão-caupi	19
Compostos Bioativos	21
Fenólicos	21
Flavonóides	23
Taninos Condensados	24
Aminas Bioativas	25
Atividade Antioxidante	27
REFERÊNCIAS	30
CAPÍTULO II – RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
DEPÓSITO DO PEDIDO DE PATENTE	39
ARTIGO CIENTÍFICO - Cheese Bread Enriched with Biofortified Cowpea Flour.	45
Abstract	45
Resumo	45
Introduction	46
Material and Methods	47
Results and Discussion	51
Conclusions	56
References	56
ARTIGO CIENTÍFICO - Mineral Content, Phenolic Compounds and Bioactive Amines of Cheese Bread Enriched with Cowpea.	59
Abstract	59
Introduction	60
Material and Methods	61

Results and Discussion	63
Conclusions	68
References	69
CAPÍTULO III – PEDIDO DE PATENTE	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
ANEXOS	82
Anexo 1 – Depósito do Pedido de Patente.	83
Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.	84
Anexo 3 – Testes Sensoriais.	86
Anexo 4 – Outras Produções.	87
Effect of Thermal Processing on Chemical Compositions, Bioactive Compounds, and Antioxidant Activities of Cowpea Cultivars.	87
Effect of Thermal Processing on Total Polyphenol Content in the Grain of Cowpea Cultivars.	104
APÊNDICES	115
Apêndice 1 – Curva Padrão de Ácido Gálico.	116
Apêndice 2 – Curva Padrão de Quercetina.	117
Apêndice 3 – Curva Padrão de Catequina.	118
Apêndice 4 – Curva Padrão de Trolox Utilizada na Análise da Capacidade Antioxidante pelo Método DPPH.	119
Apêndice 5 - Curva Padrão de Trolox Utilizada na Análise da Capacidade Antioxidante pelo Método ABTS.	120

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

O pão de queijo é um produto tradicional do estado de Minas Gerais, Brasil, cuja produção tem aumentado consideravelmente, em associação com o crescimento do mercado, incluindo a exportação do produto. No entanto, apesar de sua grande importância no mercado, devido ao seu consumo crescente, não há padronização na fabricação, identidade e qualidade, sendo permitidas inovações por parte dos fabricantes, como o acréscimo de matérias-primas, que venham a fortalecer o produto (ANJOS et al., 2014; MACHADO; PEREIRA, 2010).

Os alimentos enriquecidos apresentam várias vantagens, entre elas, a grande adesão da população, o baixo risco de toxicidade, já que a margem de inocuidade é muito ampla, e a não modificação dos hábitos alimentares (TADDEI et al., 2011). O acréscimo de matérias-primas fontes de micronutrientes e compostos bioativos pode auxiliar na melhora das características sensoriais, nutritivas e funcionais dos produtos desenvolvidos.

O feijão-caupi provê quantidades significativas de proteínas (23 a 25%) e carboidratos (56,8%), além de possuir quantidade significativa de fibras alimentares (3,9%), minerais (potássio, fósforo, ferro, cálcio, manganês, magnésio e zinco) e vitaminas (tiamina, riboflavina, piridoxina, niacina e folacina) e baixo teor de gorduras (1,3%). Verifica-se também a ocorrência de aminos bioativas, compostos fenólicos, além de oligossacarídeos indigeríveis (rafinose, estaquiose e verbascose) (CARVALHO et al., 2012; CAVALCANTE et al., 2017a).

Têm-se observado que o consumo de frutas e vegetais está abaixo das recomendações. Por sua vez, os produtos de panificação se apresentam como alimentos básicos na alimentação e fornecem uma matriz ideal para fortificação devido à aceitação e conveniência do consumidor. Portanto, enriquecer produtos de

panificação com vegetais pode ser uma estratégia eficaz para aumentar / estimular o consumo dos mesmos (HOBBS et al., 2014).

O consumo de produtos enriquecidos com leguminosas contribuem para uma dieta saudável, auxiliam na prevenção do desenvolvimento de doenças crônicas importantes, como doença cardiovascular e certos tipos de câncer, como também contribui para o requerimento diário de nutrientes e atende aos interesses dos consumidores por alimentos com melhor valor nutritivo (TEMPLE; KAISER, 2003; WILLETT, 1994; HOBBS et al., 2014).

Dessa forma, objetivou-se desenvolver um pão de queijo enriquecido com farinha de feijão-caupi (FFC) biofortificado e determinar suas características sensoriais, nutritivas e funcionais.

OBJETIVOS

GERAL

Desenvolver um pão de queijo enriquecido com feijão-caupi biofortificado e avaliar suas características sensoriais, nutritivas e funcionais.

ESPECÍFICOS

- Elaborar um pão de queijo enriquecido com feijão-caupi.
- Verificar a aceitação e intenção de compra do produto elaborado.
- Determinar a composição centesimal, valor energético total (VET), conteúdo de minerais e fibras alimentares no pão de queijo com feijão-caupi.
- Analisar o teor de compostos fenólicos, aminas bioativas e atividade antioxidante do pão de queijo enriquecido.

REFERENCIAL TEÓRICO

PÃO DE QUEIJO

O pão de queijo é um produto de panificação obtido basicamente do escaldamento do polvilho com água ou leite e óleo, amassamento com ovos, adição de queijo e assamento, podendo-se também variar o tipo de polvilho (doce, azedo ou a mistura destes). Entretanto, o pão de queijo feito com polvilho doce tem sua padronização facilitada por apresentar características físico-químicas mais estáveis. É um produto tradicional do Estado de Minas Gerais cuja produção vem crescendo muito nos últimos anos, aliada a uma expansão do mercado que inclui exportação (ANJOS et al., 2014; MACHADO; PEREIRA, 2010, CAVALCANTE et al., 2016).

O pão de queijo é consumido em países com os mais diferentes hábitos alimentares, tais como Argentina, Estados Unidos, Peru, Itália, França, Alemanha, Hungria, Portugal, Espanha, Israel e Japão. A expansão da comercialização deste produto para outros estados brasileiros e para o exterior ocorreu devido às inovações tecnológicas, principalmente após o surgimento das massas congeladas (PINTO, 2001).

De acordo com Matuda (2008), a vida de prateleira de massas congeladas pode chegar até seis meses mediante uso correto da cadeia de frio e temperatura. Vale ressaltar, dentre outras vantagens, que o uso de baixas temperaturas em panificação promove maior praticidade, conveniência e padronização do produto. Essas características, por sua vez, possibilitam a maior disseminação e o aumento do consumo do pão de queijo enriquecido visto que o mesmo apresenta apelo nutricional e de mercado.

Além de ser uma fonte reconhecida de carboidratos, o pão de queijo também é um produto de panificação isento de glúten, o que o coloca como alimento alternativo para pacientes celíacos, alérgicos às proteínas do trigo (PEREIRA et al., 2004).

Produtos isentos de glúten geralmente são elaborados com farinhas ou amidos refinados e, portanto, apresentam baixos teores de fibras e de micronutrientes. Assim, a fortificação dessas formulações e a utilização de matérias-primas com valor nutritivo e funcional vêm sendo recomendada (CAPRILES; ARÉAS, 2011; KUPPER, 2005; THOMPSON et al., 2005; UGWUONA; SUWABA, 2013). Desta forma, o feijão-

caupi se apresenta como uma oportunidade de diversificar os nutrientes oferecidos pelo pão de queijo.

FEIJÃO-CAUPI

Esta leguminosa é conhecida por diversas denominações regionais como: feijão-macassar, feijão-de-catador e feijão-de-corda, no Nordeste; feijão-de-praia, feijão-de-rama e feijão-de-estrada, na região Norte; feijão-miúdo, na região Sul e feijão-fradinho, no estado do Rio de Janeiro (CARDOSO; RIBEIRO, 2006; MALHEIRO, 2011).

De acordo com Freire Filho et al. (2011), as cultivares com características diferenciadas promoveram uma expansão da cultura tradicional do feijão-caupi de pequena escala para sistemas de produção altamente tecnificados, favorecendo ampla distribuição nacional e mundial. Sua produção se estende pela África, Ásia, Estados Unidos, Oriente Médio e Américas Central e do Sul. O Níger, Nigéria e Brasil são os países que têm a maior área cultivada e as maiores produções. De origem africana, o feijão-caupi foi introduzido no Brasil na segunda metade do século XVI, por colonizadores portugueses no estado da Bahia (SINGH et al., 2002).

Segundo Freire Filho et al. (2011) o feijão-caupi constitui um componente alimentar básico das populações rurais e urbanas das regiões Norte e Nordeste. Mato Grosso, Ceará, Piauí, Pernambuco, Bahia e Paraíba são os estados que detêm o *status* de maiores produtores do país. Atualmente, seu consumo expande-se de forma mais intensa para as regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil.

De acordo com Cavalcante et al. (2017a), Freire Filho et al. (2011), Frota et al. (2008) recentemente, as técnicas de melhoramento genético, buscando características desejáveis em uma cultivar ideal, originam diversos materiais que compõem os bancos de germoplasma do feijão-caupi. Dentre eles, a cultivar BRS Aracê se caracteriza pela adaptação ao bioma Caatinga sendo indicada para produtores da região Nordeste. Esta cultivar pertence ao grupo comercial cores, subclasse verde e contém alto teor de ferro e zinco no grão, sendo tratada como biofortificada.

DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS COM FEIJÃO-CAUPI

Os alimentos à base de grãos integrais, incluindo o pão, desempenham um papel importante na saúde humana e no bem-estar. Demonstrou-se que o consumo

regular de produtos integrais pode contribuir para reduzir o risco de doenças cardiovasculares (DCV), diabetes mellitus tipo 2 e certos tipos de câncer, bem como várias patologias gastrointestinais. As propriedades saudáveis dos grãos integrais estão ligadas à presença de compostos bioativos, como fibra alimentar e compostos fenólicos (GIL; ORTEGA; MALDONADO, 2011; VERARDO et al., 2018; ZILIC et al., 2011). Além do acréscimo de fenólicos totais, a inclusão de farinhas integrais para obtenção de pães melhora o conteúdo de proteínas, vitaminas e minerais, como também a qualidade tecnológica do produto.

Tem-se demonstrado que o amido proveniente do feijão-caupi melhora a qualidade tecnológica de produtos de panificação quando comparado com o amido de fontes convencionais (mandioca, milho, batata e arroz). Com o amido dessa leguminosa, os batidos apresentam menores valores de gravidade específica e os produtos maiores valores de volume específico, cor mais clara, menor redução da umidade durante o período de estocagem e melhores valores nos atributos de textura durante a vida de prateleira ocasionando maiores escores na avaliação sensorial, especialmente para os atributos do miolo e textura (ALMEIDA; MARANGONI; STEEL, 2013).

Frota et al. (2010) utilizaram a farinha de feijão-caupi em substituição à farinha de trigo em formulações de biscoito e rocambole. Verificou-se que o emprego da FFC em diferentes proporções contribuiu para elevar a qualidade nutricional dos produtos. A adição de 30% de FFC no biscoito, aumentou em 2,4 vezes a quantidade de ferro, em quase 3 vezes a do zinco e em 2,4 vezes a do magnésio, quando comparado ao biscoito padrão. Em 100 g de rocambole com adição de 20% de FFC encontram-se supridas 12% das IDRs para o ferro, 19% para o zinco, 21% para o magnésio e 39% para o fósforo. Os resultados da análise sensorial demonstraram que é viável adicionar farinha de feijão-caupi, pois a maioria das formulações apresentou aceitação superior a 70%.

O estudo de Landim et al. (2016) demonstrou a funcionalidade do feijão-caupi, onde foi avaliado o impacto da ingestão de biscoitos à base da farinha da cultivar BRS Xiquexique (pacote de 30g / 3 vezes por semana, durante 60 dias) por pré-escolares suscetíveis a anemia ferropriva. Os resultados demonstraram que a anemia, antes da intervenção, a prevalência era de 12,2% e após a intervenção 1,4%. Logo, constatou-se a eficácia do biscoito acrescido de feijão-caupi visto que o mesmo obteve ótima aceitação pelas crianças (94,3%).

No estudo de Simplício (2013), que objetivou elaborar pães integrais com grãos de duas cultivares biofortificadas de feijão-caupi (BRS Tumucumaque e BRS Aracê), os produtos elaborados com 25% das respectivas farinhas apresentaram boa aceitação, com destaque para a formulação com 25% de FFC da cultivar BRS Aracê. A adição da FFC às formulações aumentou o valor nutritivo dos pães, destacando-se os teores de cinzas, proteínas e lipídeos. Além disso, os pães elaborados possuíram elevados teores de minerais, destacando-se o ferro, zinco, magnésio e fósforo, e foram classificados como fonte de fibras alimentares.

Essa estratégia de fortificação tem apelo não apenas regional, como também, mundial, visto que Ugwuona; Suwaba (2013) relataram que países como a Nigéria apresentam esforços para promover farinhas compostas de cereais e leguminosas, onde a farinha de leguminosas cultivadas localmente e com elevados teores de proteínas podem substituir uma porção da farinha base em produtos de panificação.

COMPOSTOS BIOATIVOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, que os confere o poder antioxidante (Tabela 1).

Tabela 1. Classes de compostos fenólicos em plantas e suas estruturas.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C ₆
Ácidos hidroxibenzóicos	C ₆ -C ₁
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C ₆ -C ₂
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C ₆ -C ₃
Nafitoquinonas	C ₆ -C ₄
Xantonas	C ₆ -C ₁ -C ₆
Estilbenos, antoquinonas	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonóides, isoflavonóides	C ₆ -C ₃ -C ₆
Lignanais, neolignanais	(C ₆ -C ₃) ₂
Biflavonóides	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Ligninas	(C ₆ -C ₃) _n
Taninos condensados	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

Fonte: Harborne (1989), Harborne; Baxter; Moss (1999).

Nas formas simples ou de polímeros, livres ou complexados a açúcares e proteínas, esses compostos são originados do metabolismo secundário das plantas, essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso, são formados em condições de estresse. A diversidade estrutural deve-se a variedade de combinações que acontece na natureza e os compostos resultantes são chamados de fenólicos, que em alimentos, são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa (ANGELO; JORGE, 2007; NACZK; SHAHIDI, 2004).

Segundo Lima (2005); Martinez-Valverde; Periago; Ros (2000) o crescente interesse pelos compostos fenólicos decorre da sua associação com a redução de risco de doenças como a aterosclerose e o câncer cuja bioatividade está relacionada com o fato dos compostos fenólicos auxiliarem o controle da autoxidação.

Tem-se relatado constantemente na literatura a contribuição do feijão-caupi no aporte de compostos fenólicos para a população. Em pesquisas de Barros et al. (2017); Cavalcante et al. (2017b) foi observado uma variação de 89,43 a 295,23 mg (Equivalente Ácido Gálico) GAE / 100g em grãos de 9 cultivares de feijão-caupi. Verificou-se o teor de 205,1 mg GAE / 100g nos grãos da cultivar BRS Aracê, utilizada no presente estudo.

Por sua vez, Cai; Hettiarachchy; Jalaluddin (2003) determinaram o teor de compostos fenólicos em grãos de 17 variedades dessa leguminosa e os valores obtidos variaram de 34,6 a 376,6 mg / 100g⁻¹.

Moreira-Araújo et al. (2017) identificaram entre os compostos fenólicos contidos nos grãos de feijão-caupi, o ácido gálico (45,4 e 93,4 mg / 100 g), catequina (5,57 e 6,48 mg / 100 g), epicatequina (8,67 e 2,95 mg / 100 g), ácido ferúlico (11,1 e 13,8 mg / 100 g) e ácido clorogênico (2,39 e 0,59 mg / 100 g) nos grãos da cultivar BRS Tumucumaque e da linhagem Pingo de Ouro 1-2, respectivamente.

Segundo Angelo; Jorge (2007), a presença desses compostos confirma a importância da inclusão de feijões no hábito alimentar, dentre eles o feijão-caupi, de modo a contribuir para a manutenção da homeostase do organismo. Os compostos fenólicos possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais. Dentre eles, destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis.

FLAVONÓIDES

Os flavonóides são compostos largamente distribuídos no reino vegetal, que se encontram presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos ou agliconas. Consistem em 15 átomos de carbono organizados na configuração C₆-C₃-C₆. A estrutura química dos flavonóides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico (Figura 1). As variações no anel heterocíclico (anel C) resultam em importantes classes de flavonóides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianinas (ANGELO; JORGE, 2007).

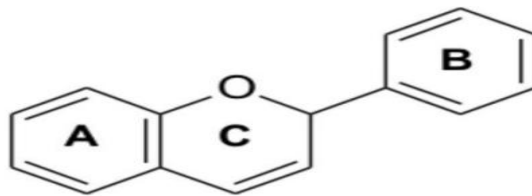


Figura 1. Estrutura química dos flavonóides.

Fonte: Harborne (1973); Lima (2005).

Em relação a sua bioatividade, os flavonóides são potentes antioxidantes, uma vez que, são capazes de sequestrar, por exemplo, ânions-radicais superóxido e radicais hidroxila, óxido nítrico, peroxinitrito e radical peroxila em ambiente aquoso e orgânico, pois possuem faces hidrofílica e lipofílica (VASCONCELOS; SILVA; GOULART, 2006). Conforme Angelo; Jorge (2007), esse mecanismo de ação dos antioxidantes, presentes em extratos de plantas, possui um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal, pois conserva a qualidade do alimento e quando incorporado na alimentação humana reduz o risco do desenvolvimento de patologias.

Outros modos de ação também têm sido atribuídos aos flavonóides, como inibição da proliferação celular, atividade estrogênica, anti-inflamatória, antifibrótica, anticoagulante, antibacteriana, antiaterogênica e anti-hipertensiva (YANG; LIN; KUO, 2008).

Os flavonóides são reconhecidamente encontrados em feijões. Ewald et al. (1999), estudando frações de feijões verdes e ervilhas identificaram por *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC, quercetina e campferol para a fração de feijão e apenas campferol para ervilha, sendo ratificado por Heimler et al. (2005)

quanto aos flavonóis presentes em amostras de feijão. Beninger; Hosfield (2003) também determinaram por meio de HPLC a presença de flavonóis (quercitina 3-O-glicosídeo e campferol 3-O-glicosídeo) em genótipos de feijões melhorados geneticamente. Romani et al. (2004) também identificaram por HPLC as isoflavonas genisteína e daidzeína em frações de grãos de feijão comum.

TANINOS CONDENSADOS

Os taninos constituem uma classe de flavonóides e possuem peso molecular relativamente alto. São substâncias não cristalinas, de cores que podem variar de branco ao marrom-claro, e que formam com água soluções coloidais. Segundo a estrutura química, são classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensáveis, estes denominados proantocianidinas (BOBBIO; BOBBIO, 2001; LIMA, 2005; RIOS; ABREU; CORRÊA, 2003).

Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácidos gálico e elágicos glicosilados, formados a partir do chiquimato, onde os grupos hidroxilas do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos (ANGELO; JORGE, 2007) (Figura 2).

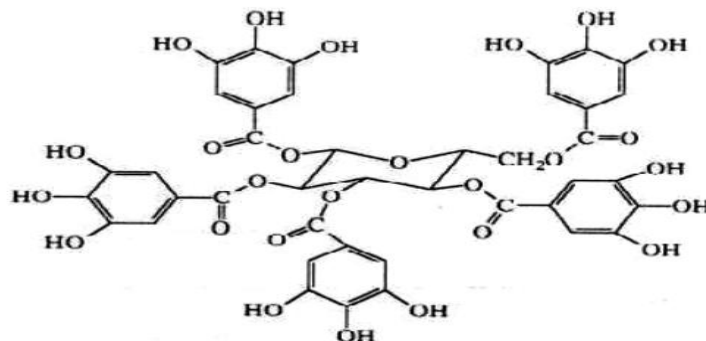


Figura 2. Estrutura química de tanino hidrolisado.

Fonte: Nozella, 2001.

De acordo com Angelo; Jorge, (2007); Monteiro et al. (2005), os taninos condensáveis são oligômeros e polímeros de flavan-3-ol (catequina) e/ou flavan-3,4-diol (leucocianidina), produtos do metabolismo do fenilpropanol. As proantocianidinas são assim denominadas provavelmente pelo fato de apresentarem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, como cianidina e delphinidina. Desta forma, observa-se que em leguminosas e vegetais os taninos são predominantemente de origem flavonóide (Figura 3).

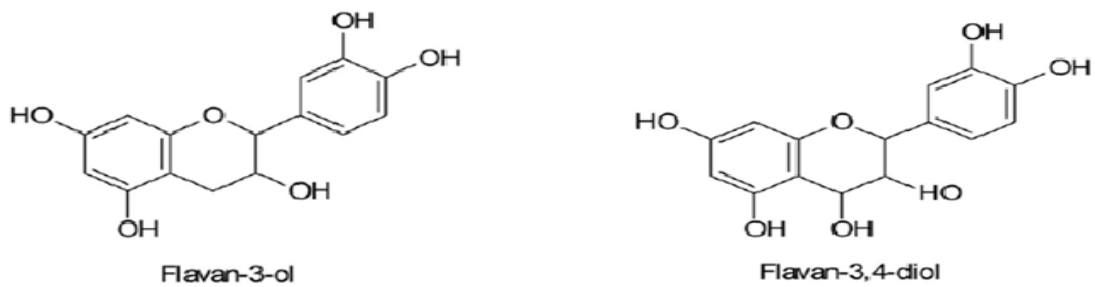


Figura 3. Estrutura química de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol.

Fonte: Angelo; Jorge, 2007.

Conforme Lima (2005); Rios; Abreu; Corrêa (2003), os taninos encontrados em maior quantidade e de maior importância em alimentos são os taninos condensados. Em leguminosas, os taninos são os fenólicos de maior importância, devido os possíveis efeitos sobre a biodisponibilidade de minerais e proteínas.

Os taninos e outros polifenóis das plantas despertam interesse crescente devido suas atividades antioxidantes. O conteúdo de taninos em feijões depende em grande parte da presença ou não do tegumento e de sua coloração. Ao comparar os teores de taninos na casca da semente e nas farinhas e frações protéicas do feijão-caupi, verificou-se a maior concentração de taninos (1,8 mg catequinas / g de amostra) na casca da semente (COSTA; ROSA, 2010; CHIARADIA; GOMES, 1997; SHOSHIMA; TAVANO; NEVES, 2005). Diante do exposto, a escolha da cultivar com grãos coloridos, BRS Aracê, para enriquecimento do pão de queijo objetiva um maior aporte de compostos fenólicos no produto.

AMINAS BIOATIVAS

De acordo com Diniz (2015); Glória (2005); Mendonça (2009); Moinard; Cynober; Bandt (2005) o termo poliaminas é utilizado para designar dois compostos, espermina e espermidina, derivados da ornitina após uma descarboxilação inicial que origina a putrescina (diamina) (Figura 4).

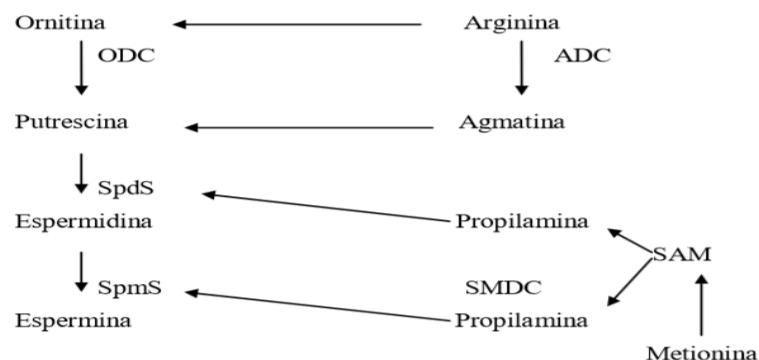


Figura 4. Síntese de poliaminas. ODC = ornitina descarboxilase; ADC = Arginina descarboxilase; SpmS = espermina sintase; SpdS = espermidina sintase; SAM = S-adenosilmetionina; SMDC = S-adenosilmetionina descarboxilase.
Fonte: Adaptado de GLÓRIA (2005).

A putrescina é obrigatoriamente um intermediário na síntese de poliaminas, sendo a via da agmatina uma via alternativa para sua produção pela arginina descarboxilase e pela citrulina. As poliaminas estão envolvidas na síntese de ácido ribonucleico (RNA), ácido desoxirribonucléico (DNA) e proteínas, na estabilização do RNA transportador e redução da taxa de degradação do RNA. São ainda importantes na estabilização das membranas. Assim, estas amins são componentes indispensáveis a todas as células vivas e essenciais à renovação, crescimento e metabolismo. Apesar de que as células são capazes de sintetizá-las, a ingestão de fontes alimentares (frutas, carnes, vegetais e leite humano) é essencial para que o requerimento seja alcançado (SOUZA et al., 2016).

As amins biogênicas são constituintes normais de células vivas, onde cumprem vários papéis fisiológicos importantes (neuroativos e vasoativos). Algumas amins estão naturalmente presentes nos alimentos e algumas podem ser formadas durante o processamento por descarboxilação de aminoácidos livres durante o tratamento térmico ou por enzimas de microorganismos adicionados ou contaminantes (BUÑKOVÁ et al., 2010; GLÓRIA, 2005; REDRUELLO et al., 2013; UBALDO et al., 2015) (Figura 5).

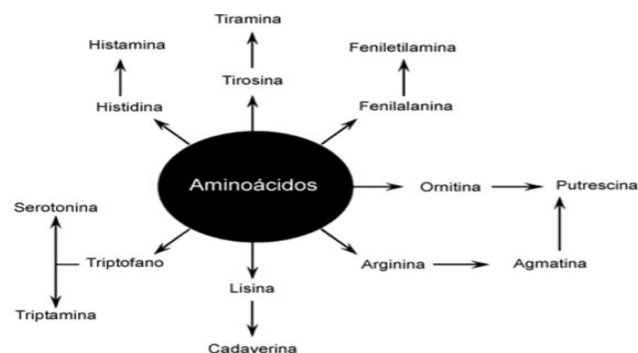


Figura 5. Vias de formação das amins biogênicas.
Fonte: Adaptado de GLÓRIA (2005).

Desta forma, as amins biogênicas podem ser usadas como parâmetro ou critério de qualidade, refletindo a má qualidade das matérias-primas utilizadas e/ou das condições higiênico-sanitárias prevalentes durante a fabricação dos alimentos. (DINIZ, 2015; GLORIA, 2005).

Embora as aminas desempenhem funções fisiológicas essenciais, podem se tornar um perigo à saúde, podendo causar intoxicação se consumidas em grandes quantidades, se as aminoxidasas são inibidas, se efeitos sinérgicos ou potencializadores (etanol e a presença concomitante de várias aminas) ocorrem, ou se houver deficiência genética. Alteração da pressão arterial, inflamação, cefaléia e problemas gastrointestinais são alguns dos principais acometimentos provenientes das intoxicações. Desta forma, os alimentos com teores significativos de aminas bioativas devem ter sua ingestão limitada (CACCIOPPOLI et al., 2006; HALÁSZ et al., 1994).

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Conforme Halliwell (1996); Rufino et al. (2007a), um antioxidante pode ser definido como uma substância que, em baixas concentrações, retarda ou previne a oxidação do substrato. Os efeitos defensivos de antioxidantes naturais em frutas e vegetais estão relacionados a três grandes grupos: ácido ascórbico e fenólicos como antioxidantes hidrofílicos e carotenóides como antioxidantes lipofílicos.

Em geral os compostos fenólicos são multifuncionais como antioxidantes, pois atuam de várias formas: combatendo os radicais livres pela doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) da sua estrutura aromática; quelando metais de transição, como o ferro (Fe^{2+}) e o cobre (Cu^+); interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica; modificando o potencial redox do meio ou reparando a lesão a moléculas atacadas por radicais livres (KYNGMI; EBELER, 2008; PODSEDEK, 2007; SUCUPIRA, 2012).

De acordo com Pérez-Jiménez; Saura-Calixto (2006), Valdés (2010) para avaliar o potencial e a efetividade da atividade antioxidante dos alimentos, na literatura científica tem sido descrito diferentes métodos já que nenhum ensaio usado isoladamente irá refletir exatamente a “atividade antioxidante total” de uma amostra. Neste estudo utilizaram-se métodos que se baseiam na capacidade de remoção de radicais orgânicos (DPPH e ABTS).

Conforme Sucupira et al. (2012), o DPPH é um radical de nitrogênio orgânico, estável e de cor violeta que participa de um método químico aplicado para determinar a capacidade antioxidante de um composto em sequestrar radicais livres. Esse é um dos métodos mais utilizados, pois é considerado rápido, prático e com boa estabilidade. Na presença de um doador de hidrogênio ou elétron a intensidade

de absorção diminui e a solução com o radical perde cor, tornando-se amarela, de acordo com o número de elétrons capturados (Figura 6).

Esta metodologia é limitada pelo fato dos radicais DPPH interagirem com outros radicais (alquil), e, a curva de resposta em tempo para atingir o estado estacionário não ser linear, com diferentes relações de antioxidante/DPPH•.

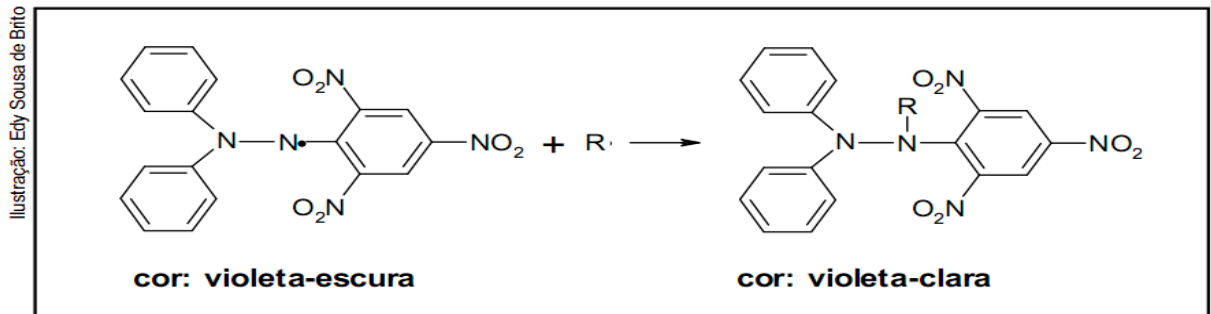


Figura 6. Estabilização do radical livre DPPH.

Fonte: Rufino et al., 2007b.

Em estudo de Lima (2005), mediu-se a atividade dos extratos etanólicos dos grãos de cultivares de feijão-caupi em sequestrar o radical estável DPPH. Obtiveram-se como resultados que aos 15 minutos todas as amostras apresentaram uma porcentagem de inibição da oxidação, superior a 70%, diferindo estatisticamente, do antioxidante sintético butil-hidroxitolueno (BHT) com 89% de inibição. Entre 30 e 45 minutos ocorreu uma elevação da porcentagem de inibição dos extratos para 78,98 a 83,21%, sendo o máximo alcançado aos 60 minutos quando a ação sequestrante foi comparável a do BHT.

Segundo Sucupira et al. (2012) o método do radical ABTS está baseado na habilidade dos antioxidantes em capturar o cátion $ABTS\bullet+$, ocorrendo a redução do $ABTS\bullet+$ a ABTS (Figura 7). Essa captura provoca um decréscimo na absorbância, que é lida a partir da mistura do radical com o antioxidante em diferentes tempos, sendo representadas graficamente.

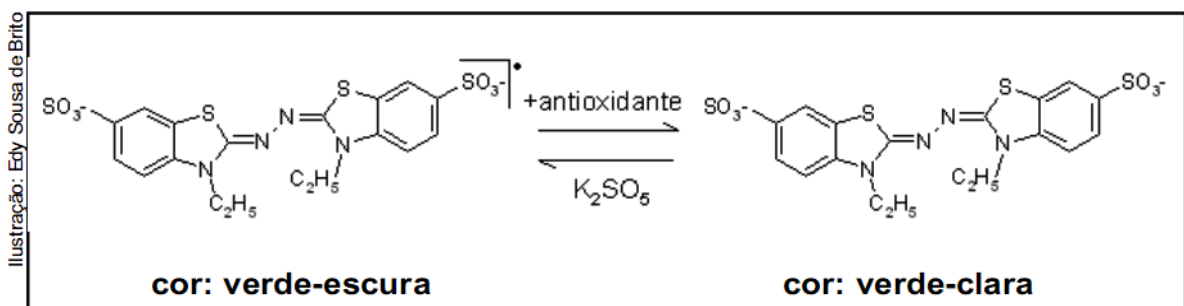


Figura 7. Estabilização do radical ABTS●+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.

Fonte: Rufino et al., 2007a.

Esse método apresenta excelente estabilidade, além de ser um dos testes mais rápidos de atividade antioxidante, podendo ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis (TIVERON, 2010).

Em relação à matéria-prima utilizada para enriquecimento, Barros et al. (2017) verificou a atividade antioxidante em grãos de quatro cultivares de feijão-caupi pelo método do radical ABTS e observou que o melhor resultado (660,1 μmol de Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox – TEAC / 100g) foi obtido nos grãos da cultivar BRS Aracê.

Diante do exposto, a relevância do trabalho está em enriquecer um produto que participa do hábito alimentar populacional e com ascensão de mercado, sendo uma importante estratégia para atender aos interesses dos consumidores por produtos com melhor valor nutritivo. Matérias-primas regionais, de fácil acesso, junto com a facilidade na elaboração do produto fazem com que o pão de queijo possa ser enriquecido com farinha de feijão-caupi biofortificado visando contribuir para o requerimento diário de nutrientes e compostos bioativos para a população.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, E. L.; MARANGONI, A. L.; STEEL, C. J. Starches from non – conventional sources to improve the technological characteristics of pound cake. **Ciência Rural**. v. 43, n. 11, p. 2101-2108, 2013.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

ANJOS, L. D.; PEREIRA, J.; COUTO, E. M.; CIRILLO, M. A. Modified starches or stabilizers in preparation of cheese bread. **Ciência Rural**. v. 44, n. 9, p. 1686-1691, 2014.

BARROS, N. V. A.; ROCHA, M. M.; GLÓRIA, M. B. A.; ARAÚJO, M. A. M.; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. Effect of cooking on the bioactive compounds and antioxidant activity in grains cowpea cultivars. **Revista Ciência Agronômica**. v. 28, n. 5, p. 824-831, 2017.

BENINGER, C.; HOSFIELD, G. L. Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 27, p. 7879-7883, 2003.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 30^o ed. São Paulo: Varela, 2001. p. 143.

BUNKOVÁ, L.; BUNKA, F.; MANTLOVÁ, G.; CABLOVÁ, I. S.; SEDLÁČEK, I.; ŠVEC, P. et al. The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in edam-cheese. **Food Microbiology**. v. 27, p. 880–888, 2010.

CACCIOPPOLI, J.; CUSTÓDIO, F.B.; VIEIRA, S.M.; COELHO, J.V.; GLÓRIA, M.B.A. Aminas bioativas e características físico-químicas de salames tipo italiano. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58, n. 4, p. 648-657, 2006.

CAI, R.; HETTIARACHCHY, N. S.; JALALUDDIN, M. High-performance liquid chromatography determination of phenolic constituents in 17 varieties of cowpeas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, n. 6, p. 1623-1627, 2003.

CARDOSO, M. J.; RIBEIRO, V. Q. Desempenho agrônômico do feijão-caupi, cv. Rouxinol, em função de espaçamento entre linhas e densidade de plantas sob regime de sequeiro. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, p. 102-105, 2006.

CARVALHO, A. F. U.; SOUSA, N. M.; FARIAS, D. F.; ROCHA-BEZERRA, L. C. B.; SILVA, R. M. P.; VIANA, M. P.; GOUVEIA, S. T.; SAMPAIO, S. S.; SOUSA, M. B.; LIMA, G. P. G.; MORAIS, S. M.; BARROS, C. C.; FREIRE-FILHO, F. R. Nutritional ranking of 30 Brazilian genotypes of cowpeas including determination of antioxidant capacity and vitamins. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 26, n. 1-2, p. 81-88, 2012.

CAVALCANTE, R. B. M.; ARAÚJO, M. A. M.; ROCHA, M. M.; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. Effect of thermal processing on chemical compositions, bioactive compounds, and antioxidant activities of cowpea cultivars. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 4, p. 1050-1058, 2017a.

CAVALCANTE, R. B. M.; ARAÚJO, M. A. M.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. Effect of thermal processing on total polyphenol content in the grain of cowpea cultivars. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 5, p. 806-810, 2017b.

CAVALCANTE, R. B. M. C.; MORGANO, M. A.; SILVA, K. J. D.; ROCHA, M. M.; ARAÚJO, M. A. M.; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. Cheese bread enriched with biofortified cowpea flour. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 40, n. 1, 2016.

CAPRILES, V. D.; ARÊAS, J. A. G. Avanços na produção de pães sem glúten: aspectos tecnológicos e nutricionais. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. v. 29, n. 1, p. 129-136, 2011.

- CHIARADIA, A. C.; GOMES, J. C. **Feijão: química, nutrição e tecnologia**. Viçosa-MG: Fundação Arthur Bernardes, 1997. p. 180.
- COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. **Alimentos funcionais – componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010.
- DINIZ, F. B. **Elaboração de tabela de aminos bioativas em alimentos e estimativa da ingestão no Brasil**. 2015. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- EWALD, C.; FJELKNER-MODIG, S.; JOHANSSON, K.; SJOHOLM, I.; AKESSON, B. Effect of processing on major flavonoids in processed onions Green beans and peãs. **Food Chemistry**, v. 64, p. 231-235, 1999.
- FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 81 p.
- FROTA, K. M. G.; MORGANO, M. A.; SILVA, M. G.; ARAÚJO, M. A. M.; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. Utilização da farinha de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) na elaboração de produtos de panificação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30, n. 1, p. 44-50, 2010.
- FROTA, K. M. G.; SOARES, R. A. M.; ARÊAS, J. A. G. Composição química do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), cultivar BRS-Milênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 28, n. 2, p. 470-476, 2008.
- GIL, A.; ORTEGA, R. M.; MALDONADO, J. Wholegrain cereals and bread: a duet of the Mediterranean diet for the prevention of chronic diseases. **Public Health Nutrition**. v. 14, n. 12A, p. 2316-2322, 2011.
- GLÓRIA, M.B.A. **Amines**. In: HUI, H., NOLLET, L.L. (Ed.) Handbook of Food Science. New York: Marcel Dekker, 2005.

HÁLASZ, A.; BARATH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science and Technology**. v. 5, p. 42-49, 1994.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, p. 33-50, 1996.

HARBORNE, J. B. General procedures and measurement of total phenolics. In: Harborne JB, (Ed.). **Methods in plant biochemistry: volume 1 Plant phenolics**. London: Academic Press, 1989.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. London: Chapman and Hall, 1973.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H.; MOSS, G. P. **Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants**. 2 ed. London: Taylor & Francis; 1999.

HEIMLER, D.; VIGNOLINI, P.; DINI, M. G.; ROMANI, A. Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3053-3056, 2005.

HOBBS, D. A.; ASHOURI, A.; T.W.GEORGE, T. W.; LOVEGROVE, J. A.; METHVEN, L. The consumer acceptance of novel vegetable-enriched bread products as a potential vehicle to increase vegetable consumption. **Food Research International**. v. 58, p. 15-22, 2014.

KUPPER, C. Dietary guidelines and implementation for celiac disease. **Gastroenterology**. v.128, n.4, p.121-127, 2005.

KYNGMI, M. S.; EBELER, E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 96-104, 2008.

LANDIM, L. A. S. R.; PESSOA, M. L. S. B.; BRANDÃO, A. C. A. S.; MORGANO, M. A.; ARAÚJO, M. A. M.; ROCHA, M. M.; ARÊAS, J. A. G.; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. Impact of the two different iron fortified cookies on treatment of anemia in preschool children in Brazil. **Nutrición Hospitalaria**, v. 33, p. 1142-1148, 2016.

LIMA, D. E. S. **Influência do melhoramento genético convencional sobre os constituintes do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)**. 2005. 55 f. Dissertação (mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MACHADO, A. V.; PEREIRA, J. Effect of scalding on technological and rheological properties of cheese bread dough and cheese bread. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 34, n. 2, p. 421-427, 2010.

MALHEIRO, M. G. **Desempenho simbiótico de rizóbios nativos do semiárido brasileiro em duas cultivares de feijão-caupi**. 2011. 121 f. Dissertação (Mestrado em Horticultura Irrigada) – Universidade do Estado da Bahia, Juazeiro.

MARTINEZ-VALVERDE, L.; PERIAGO, M. J.; ROS, G. Nutritional importance of phenolic compounds in the diet. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 50, p. 5-18, 2000.

MATUDA, T. G. **Estudo do congelamento da massa de pão: determinação experimental das propriedades termofísicas e desempenho de panificação**. 2008. 153 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

MENDONÇA, A.C. **Atividade antioxidante de poliaminas e comparação com produtos naturais e sintéticos**. 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MOINARD, C.; CYNOBER, L.; BANDT, J.P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clinical Nutrition**. v. 24, p. 184-197, 2005.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecológica. **Química Nova**. v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R.; SAMPAIO, G. R.; SOARES, R. A. M.; SILVA, C. P.; ARÊAS, J. A. G. Identification and qualification of antioxidant compounds in cowpea. **Revista Ciência Agronômica**. v. 48, p. 799-805, 2017.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, v. 1-2, p. 95-111, 2004.

NOZELLA, E. F. **Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes**. 2001, 72 f. DISSERTAÇÃO (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

PEREIRA, J.; CIACCO, C. F.; VILELA, E. R.; PEREIRA, R. G. F. A. Função dos ingredientes na consistência da massa e nas características do pão de queijo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 24, n. 4, p. 494-500, 2004.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, p. 791-800, 2006.

PINTO, R.G. **Avaliação das boas práticas de fabricação e da qualidade microbiológica na produção de pão de queijo**. 2001, 181p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants capacity of brassica vegetables: a review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 1-11, 2007.

REDRUELLO, B., LADERO, V., CUESTA, I., ÁLVAREZ-BUYLLA, J. R., MARTÍN, M. C., FERNÁNDEZ, M. et al. A fast, reliable, ultra high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of amino acids, biogenic amines and ammonium ions in cheese, using diethyl ethoxymethylenemalonate as a

derivatising agent. **Food Chemistry**. v. 139, p. 1029–1035, 2013.

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

ROMANI, A.; VIGNOLINI, P.; GALARDI, C.; MULINACCI, N.; BENEDETTELLI, S.; HEIMLER, D. Germplasm characterization of Zolfino landraces (*Phaseolus vulgaris* L.) by flavonoid content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3838-3842, 2004.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁺**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2007a. 4p. (Comunicado Técnico, n° 128).

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2007b. 4p. (Comunicado Técnico, n° 127).

SHOSHIMA, A. H. R.; TAVANO, O. L.; NEVES, V. A. Digestibilidade in vitro das proteínas do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) var. “Br-14 Mulato”: efeito dos fatores antinutricionais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 4, p. 299-304, 2005.

SIMPLÍCIO, A. P. M. **Desenvolvimento de pão integral enriquecido com farinha de cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)**. 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal do Piauí, Teresina.

SINGH, B. B.; EHLERS, J. D.; SHARMA, B.; FREIRE FILHO, F. R. Recent progress in cowpea breeding. In: FATOKUN, C. A.; TARAWALI, S.A.; SINGH, B. B.; KORMAWA, P. M.; TAMÒ, M. (Ed.). **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. Ibadan: International Institute of Tropical Agriculture, 2002. p. 22-40.

SOUZA, R. M.; GLÓRIA, M. B. A.; OLIVEIRA, A. L.; ALMEIDA, A. C.; COLEN, F.; SOUZA, C. F. A.; DIAS, M. I. A. Uso de aminos bioativas na dieta de aves de corte: uma revisão. **Hig. alimentar**. V. 30, n. 256/257, p. 18-25, 2016.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

TADDEI, J. A. A. C. T.; LANG, R. M. F.; LONGO-SILVA, G.; TOLONI, M. H. A. (Eds). **Nutrição em Saúde Pública**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2011.

TEMPLE, N. J.; KAISER, G. K. Fruit, vegetables, and the prevention of cancer: Research challenges. **Nutrition**. v. 19, p. 467–470, 2003.

THOMPSON, T.; DENNIS, M.; HIGGINS, L. A.; LEE, A. R.; SHARRETT, M. K. Gluten-free diet survey: are americans with celiac disease consuming recommended amounts of fiber, iron, calcium and grain foods? **Journal of Human Nutrition and Dietetics**. v.18, p.163–169, 2005.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010, 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo – Piracicaba.

UBALDO, J. C. S. R.; CARVALHO, A. F.; FONSECA, L. M.; GLÓRIA, M. B. A. **Food Chemistry**. v. 178, p. 229-235, 2015.

UGWUONA, F. U.; SUWABA, S. Effects of defatted jack bean flour and jack bean protein concentrate on physicochemical and sensory properties of bread. **Nigerian Food Journal**. v. 31, n. 2, p. 25-32, 2013.

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

VASCONCELOS, S. M. L.; SILVA, M. A. M.; GOULART, M. O. F. Pró-antioxidantes e antioxidantes de baixo peso molecular oriundos da dieta: estrutura e função. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 31, n. 3, p. 95-118, 2006.

VERARDO, V.; GLICERINA, V.; COCCI, E.; FRENICH, A. G.; ROMANI, S.; CABONI, M. F. Determination of free and bound phenolic compounds and their antioxidant activity in buckwheat bread loaf, crust and crumb. **LWT – Food Science and Technology**. v. 87, p.217-224, 2018.

WILLETT, W. Diet and health: What should we eat? **Science**. v. 264, p. 532–537, 1994.

YANG, R.; LIN, S.; KUO, G. Content and distribution of flavonoids among 91 edible plant species. **Asian Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 17, supp. 1, p. 275-279, 2008.

ZILIC, S.; SUKALOVIC, V. H. T.; DODIG, D.; MAKSIMOVI, V.; MAKSIMOVI, M.; BASIC, Z. Antioxidant activity of small grain cereals caused by phenolics and lipid soluble antioxidants. **Journal of Cereal Science**. v. 54, p. 417-424, 2011.

CAPÍTULO II – RESULTADOS E DISCUSSÃO

DEPÓSITO DO PEDIDO DE PATENTE

Depositou-se, por meio do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia (NINTEC) da UFPI, sob o número de protocolo do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) 000094, o pedido da patente de invenção intitulado “Pão de queijo enriquecido com farinha integral de feijão-caupi e seu respectivo processo de mistura e obtenção”, desenvolvido pelos inventores Rodrigo Barbosa Monteiro Cavalcante e Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo. O pedido de patente foi apresentado ao INPI sob o número de processo BR 10 2014 024706 8 (ANEXO 1).

RESUMO

“PÃO DE QUEIJO ENRIQUECIDO COM FARINHA INTEGRAL DE FEIJÃO-CAUPI E SEU RESPECTIVO PROCESSO DE MISTURA E OBTENÇÃO”

A patente de invenção é compreendida de um processo de produção e mistura para obtenção de pão de queijo enriquecido com farinha integral de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), visando sua aplicação na elaboração de um produto enriquecido que participa do hábito alimentar da população, auxiliando no controle das carências nutricionais e destinado principalmente a atender consumidores interessados em produtos com melhor valor nutritivo e funcional. Caracteriza-se por provê uma formulação composta pelas seguintes matérias-primas: polvilho doce (30-40%), leite integral (20-30%), óleo de soja (5-7%), sal iodado (0-2%), ovo branco (9-11%), queijo (10-12%) e farinha integral de feijão-caupi biofortificado (5-6%) em substituição parcial ao polvilho doce.

RELATÓRIO DESCRITIVO

“PÃO DE QUEIJO ENRIQUECIDO COM FARINHA INTEGRAL DE FEIJÃO-CAUPI E SEU RESPECTIVO PROCESSO DE MISTURA E OBTENÇÃO”

Refere-se a presente patente de invenção, que diz respeito à indústria de panificação, a um processo de produção e mistura para obtenção de pão de queijo enriquecido com farinha integral de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), visando sua aplicação na elaboração de um produto enriquecido que participa do hábito alimentar da população, auxiliando no controle das carências nutricionais, destinado principalmente a atender consumidores interessados em produtos com melhor valor nutritivo e funcional.

A fortificação ou enriquecimento de alimentos é um método utilizado atualmente na tentativa de reforçar o valor nutritivo dos alimentos, favorecendo a manutenção ou recuperação da saúde no sentido de prevenção às carências nutricionais.

Sendo assim, a fortificação de alimentos com adição de produtos fontes de vitaminas e minerais tem sido utilizada há várias décadas e tem se mostrado uma maneira eficaz de reduzir os riscos de deficiência de micronutrientes na população. A fortificação apresenta várias vantagens, entre elas a alta cobertura populacional, a não modificação dos hábitos alimentares e o baixo risco de toxicidade. De acordo com o Banco Mundial, nenhuma outra tecnologia oferece tão ampla oportunidade de melhorar o estado nutricional dos indivíduos a um custo tão baixo e em tão pouco espaço de tempo.

Não obstante, a escolha do feijão-caupi para fortificação foi devido o fato de o Brasil encontrar-se entre os três principais produtores mundiais dessa leguminosa, acompanhando Nigéria e Niger. No país, o feijão-caupi é cultivado predominantemente no sertão semi-árido na região Nordeste e em pequenas áreas na Amazônia. No Nordeste, a produção e a produtividade são de 429.375 toneladas e 303,5 kg.ha⁻¹, respectivamente. Os maiores produtores são os estados do Ceará, Piauí, Bahia, Maranhão e Rio Grande do Norte.

A qualidade nutricional do grão de feijão-caupi é muito importante e tem impactos positivos sobre a saúde humana. Nesse sentido, estudos têm avaliado as características nutricionais do aludido feijão, principalmente quanto aos teores de proteínas, carboidratos, fibras, vitaminas e minerais nos grãos secos. Entretanto em relação aos minerais, os teores de ferro e zinco tem tido ênfase dos programas de biofortificação de alimentos.

Nesse contexto, a introdução da farinha integral de feijão-caupi na formulação proporciona um aumento, não só das quantidades de proteínas, fibras e

carboidratos, como também dos teores de vitaminas e minerais como fósforo, ferro, potássio, magnésio, zinco, manganês e cobre. Este incremento é importante principalmente para os minerais ferro e zinco. O ferro porque sua deficiência é a mais comum e a mais grave deficiência de micronutrientes em todo o mundo. O zinco, pois sua deficiência marginal é um problema nutricional comum, acreditando-se que sua existência já produz sérias consequências para a saúde infantil.

O feijão-caupi, cultivar BRS Xiquexique, matéria-prima utilizada na presente invenção foi obtida da linhagem TE96-290-12G, a qual foi selecionada do cruzamento com o código TE96-290, que teve como parental feminino a linhagem TE87-108-6G, posteriormente lançada como cultivar Amapá, e como parental masculino a linhagem TE87-98-8G, posteriormente lançada como cultivar BRS Paraguaçu. Apresenta grãos brancos, bem formados, no padrão de preferência de uma grande faixa de consumidores das Regiões Norte e Nordeste. Bom conteúdo nutritivo e rica em ferro e zinco, o que lhe confere uma vantagem nutricional.

Diante da problemática da deficiência nutricional, novos enfoques são necessários para complementar as intervenções já em andamento. A introdução de produtos agrícolas biofortificados – variedades melhoradas que apresentam maiores conteúdos de vitaminas e minerais – complementa as intervenções em nutrição existentes, para alcançar as populações com limitado acesso aos sistemas formais de saúde e mercado.

Para tanto, a escolha do pão de queijo para o enriquecimento foi devido à importância dos produtos de panificação na lista de compra dos brasileiros, o qual ocupa a terceira colocação e representa em média, 12% do orçamento familiar para alimentação.

Em relação à utilização da farinha integral de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) na elaboração de produtos de panificação, ressalta-se que é conhecido o desenvolvimento de formulações de biscoito e rocambole e não de pão de queijo, além do fato da farinha empregada nesses produtos não ter sido integral, como na presente patente.

Não obstante, versando sobre o estado anterior da técnica, algumas patentes (BR1020120084775, BRMU8801430U2, BRPI0405756A, BRPI0504640A, BRPI0601869A, BRPI0701062A2, BRPI0803115A2, BRPI0901788A2, BRPI1001174A2, PI 9802798-0, PI 9900596-4 A2, PI 9903443-3 e WO2013152406A1) reivindicam a propriedade de processo, método e mistura para

obtenção de pão de queijo. Embora tais técnicas provesses o mesmo produto proposto na presente invenção, o principal diferencial da presente patente é a elaboração de pão de queijo enriquecido com matérias primas regionais (farinha integral de feijão-caupi), de fácil acesso, visando contribuir para o requerimento diário de nutrientes para a população.

Um dos objetos da presente invenção é provê uma mistura de pão de queijo enriquecida com farinha integral de feijão-caupi, caracterizada por empregar em sua formulação as matérias-primas:

-Polvilho doce: por facilitar a padronização do produto e apresentar características físico-químicas mais estáveis. A principal função do amido em produtos de panificação é absorver a água e, deste modo, estabelecer a estrutura do produto.

-Leite: em substituição total ao uso de água. A gordura presente no leite confere melhor aparência ao produto final. As proteínas contribuem para a maciez e umidade, enquanto os sais minerais alteram a consistência da massa aumentando o valor nutritivo do pão de queijo.

-Gordura: utilizada por atuar como lubrificante molecular, ajudando a massa a ter maior extensibilidade, maior elasticidade e melhor textura do miolo.

-Ovo: por propiciar aos pães de queijo melhor estrutura, textura mais leve, aerada, maior volume, característica de liga, cor amarelo natural, além do fornecimento de proteínas, vitaminas (A, D e E) e minerais.

-Queijo: por contribuir para o aroma, sabor, maior maciez e uniformidade das células do miolo.

-Farinha integral de feijão-caupi: por aumentar as quantidades de proteínas, fibras e carboidratos, bem como os teores de vitaminas e minerais como fósforo, ferro, potássio, magnésio, zinco, manganês e cobre.

Para obtenção da FFC integral inicialmente colocou-se os grãos da cultivar BRS Xiquexique (cultivar biofortificada em ferro e zinco) de molho em água destilada 1:2 (p/v) por 1 hora, seguida de secagem em estufa ventilada a 70°C, por 6 horas, e moagem em moinho semi-industrial. A farinha foi armazenada em sacos de polietileno sob refrigeração (-18 °C) até o momento de ser utilizada.

Outro objeto da presente invenção é o processo de mistura e obtenção do aludido pão de queijo enriquecido com farinha integral de feijão-caupi caracterizado pelo desenvolvimento das etapas discriminadas abaixo.

Etapa 1 - Homogeneização

Os ingredientes secos (polvilho doce e FFC integral) foram escaldados com os líquidos (leite juntamente com óleo e sal) aquecidos à temperatura de 85 °C. Essa mistura foi homogeneizada manualmente e após cinco minutos foi adicionado o ovo fresco, o qual teve a clara e a gema, previamente misturadas, para facilitar sua adição. Após três minutos, o queijo parmesão foi adicionado à formulação e a massa moldada.

Etapa 2 – Acabamento

A moldagem foi feita manualmente para que os pães adquirissem formato redondo.

Etapa 3 – Modo de Assar

As massas foram assadas em forno elétrico por 25 minutos a 180 °C.

O feijão-caupi apresentou eficiência no enriquecimento do pão de queijo. Segundo a Portaria nº 31, de 13 de janeiro de 1998 da Anvisa, alimentos sólidos adicionados de nutrientes que forneçam no mínimo 30% da IDR de referência (no estudo, crianças de 4 a 8 anos) podem receber o *claim* “alto conteúdo”. Por isso, a formulação apresenta alto conteúdo de cálcio (244 mg / 100g), fósforo (210 mg / 100g), sódio (649 mg / 100g), magnésio (22,6 mg / 100g) e zinco (2,39 mg / 100g). Em relação ao mineral ferro, dobrou-se a quantidade com o acréscimo de FFC integral em comparação à formulação padrão.

Versando sobre a composição química do pão de queijo enriquecido com farinha integral de feijão-caupi, ressaltamos o incremento nos teores de cinzas, proteínas e carboidratos.

Por fim, antes de lançar um produto no mercado é importante se fazer um estudo do impacto deste na população consumidora, para que o mesmo não resulte em prejuízos. Logo, utilizou-se a análise sensorial para avaliar a sensação resultante das interações dos órgãos humanos dos sentidos com o produto formulado. Assim, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos assessores (TCLE) (ANEXO 2), verificou-se durante a análise sensorial a aceitação do referido produto, por meio do teste de Escala Hedônica estruturada de nove pontos (1- desgostei extremamente e 9 – gostei extremamente). A nota obtida pelo produto

(7,3) está situada entre os pontos (7 – gostei regularmente) e (8 – gostei muito) da Escala Hedônica (ANEXO 3).

REIVINDICAÇÕES

1. “PÃO DE QUEIJO ENRIQUECIDO COM FARINHA INTEGRAL DE FEIJÃO-CAUPI E SEU RESPECTIVO PROCESSO DE MISTURA E OBTENÇÃO”, caracterizado por um processo de produção e mistura para obtenção de pão de queijo enriquecido com matéria-prima regional (farinha de feijão-caupi), de fácil acesso, visando contribuir para o requerimento diário de nutrientes para a população.

2. “PÃO DE QUEIJO ENRIQUECIDO COM FARINHA INTEGRAL DE FEIJÃO-CAUPI E SEU RESPECTIVO PROCESSO DE MISTURA E OBTENÇÃO”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por provê uma mistura de pão de queijo enriquecida com farinha de feijão-caupi, distinta por empregar em sua formulação as matérias-primas: polvilho doce (30-40%), leite integral (20-30%), óleo de soja (5-7%), sal iodado (0-2%), ovo branco (9-11%), queijo (10-12%), e farinha integral de feijão-caupi biofortificado (5-6%) em substituição parcial ao polvilho doce.

3. “PÃO DE QUEIJO ENRIQUECIDO COM FARINHA INTEGRAL DE FEIJÃO-CAUPI E SEU RESPECTIVO PROCESSO DE MISTURA E OBTENÇÃO”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo desenvolvimento das seguintes etapas: homogeneização dos ingredientes secos (polvilho e farinha integral de feijão-caupi biofortificado), escaldamento com os líquidos (leite juntamente com óleo e sal) aquecidos à temperatura de 85 °C, seguido de homogeneização manual dos ingredientes secos escaldados, após cinco minutos adicionou-se o ovo fresco, com clara e gema previamente misturadas, decorridos três minutos adicionou-se o queijo parmesão ralado, seguido da moldagem da massa, para adquirir formato redondo e assamento em forno elétrico por 25 minutos à 180 °C.

4. “PÃO DE QUEIJO ENRIQUECIDO COM FARINHA INTEGRAL DE FEIJÃO-CAUPI E SEU RESPECTIVO PROCESSO DE MISTURA E OBTENÇÃO”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por apresentar eficiência no enriquecimento do pão de queijo, tendo em vista aumentar as quantidades de proteínas, fibras e carboidratos, bem como os teores de vitaminas e minerais como fósforo, ferro, potássio, magnésio, zinco, manganês e cobre.

ARTIGO CIENTÍFICO

Ciência e Agrotecnologia 40(1):97-103, Jan/Feb. 2016.

CHEESE BREAD ENRICHED WITH BIOFORTIFIED COWPEA FLOUR**PÃO DE QUEIJO ENRIQUECIDO COM FARINHA DE FEIJÃO-CAUPI
BIOFORTIFICADO**

Rodrigo Barbosa Monteiro Cavalcante, Marcelo Antônio Morgano, Kaesel Jackson Damasceno e Silva, Maurisrael de Moura Rocha, Marcos Antônio da Mota Araújo, Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo.

ABSTRACT

This study aimed to develop enriched cheese bread with whole biofortified cowpea flour and evaluate their acceptance and chemical composition. Two formulations, F1 and F2, were prepared containing 5.6 and 8% of cowpea flour as a substitute for starch, respectively. To check acceptance, three sensory tests were used (Hedonic Scale, Purchase Intent, and Paired Comparison), F1 being sensory viable according to assessors, being chemically analyzed. Minerals were determined by atomic emission spectrometry with inductively coupled plasma source. The moisture was determined by drying at 105 °C, ash by calcination in muffle at 550 °C, proteins by the macro-Kjeldahl method, and lipids by hot extraction in a Soxhlet extractor. Carbohydrates were obtained by difference and the calories were calculated. The addition of cowpea increased the amounts of copper, iron, phosphorus, magnesium, manganese, and zinc, as well as protein and carbohydrate values. On the other hand, there was a reduction of the moisture concerning lipids and the total caloric value compared to the standard formulation. It was concluded, therefore, that the cowpea, a regional raw material in market expansion is presented as an option for the enrichment of baked foods that do not contain gluten, such as cheese bread.

Index terms: bakery product, fortification, bean-to-string.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de pão de queijo enriquecido com farinha integral de feijão-caupi biofortificado e avaliar sua aceitação e

composição química. Foram elaboradas duas formulações de pão de queijo, F1 e F2, contendo 5,6 e 8% de farinha de feijão-caupi em substituição ao polvilho, respectivamente. Para verificar a aceitação, utilizaram-se três testes sensoriais (Escala Hedônica, Intenção de Compra e Comparação Pareada) sendo a F1 viável sensorialmente de acordo com os assessores, sendo analisada quimicamente. Os minerais foram determinados por espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma indutivamente acoplado. Determinou-se a umidade por secagem em estufa a 105 °C, cinzas por calcinação em mufla a 550 °C, proteínas pelo método macro-Kjeldahl e lipídios por extração a quente em extrator de Soxhlet. Os carboidratos foram obtidos por diferença e calculou-se o valor calórico. O acréscimo de feijão-caupi aumentou os teores de cobre, ferro, fósforo, magnésio, manganês e zinco, além dos valores referentes às proteínas e carboidratos. Por outro lado, ocorreu a redução dos teores de umidade, lipídios e valor calórico total, quando comparado à formulação padrão. Conclui-se, portanto, que o feijão-caupi, uma matéria-prima regional e em expansão no mercado, apresenta-se como uma opção para o enriquecimento de alimentos de panificação sem glúten, como o pão de queijo.

Termos para indexação: produto de panificação, fortificação, feijão-de-corda.

INTRODUCTION

Cheese bread is a bakery product obtained primarily by scalding starch with water (or milk) and oil, mixing it with eggs, adding cheese and baking powder. The type of starch used (sweet, sour, or a mixture of the two) in cheese bread can also be varied. However, cheese breads made with sweet starch has its standardization facilitated for having more stable physicochemical characteristics. Cheese bread is a traditional product of the state of Minas Gerais, and its production has been increasing in recent years with the expansion of the market, which includes exportation (Anjos et al., 2014; Machado and Pereira, 2010).

The cowpea, also called black-eyed pea or Southern pea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), is a staple food for low-income populations of the Northeastern of Brazil, and its cultivation is a major source of income and employment in this region. Such vegetable has an important role in human nutrition because it is an important source of proteins and carbohydrates, presenting considerable contents of fibre, vitamins (thiamin, niacin, riboflavin, pyridoxine, and folacin), and minerals (phosphorus, iron,

potassium, magnesium, zinc and manganese), as well as low amounts of lipids, especially unsaturated fatty acids (Freire Filho et al., 2011).

According to the ordinance n^o 31 of January 13th of 1998, fortification and enrichment of food are terms used to describe the process of adding one or more essential nutrients that can be naturally contained in the food or not, to fortify its nutritional value and / or to prevent or correct deficiencies demonstrated in one or more nutrients of the diet of the general population or specific population groups (Brasil, 1998). Fortification has several advantages, including great acceptance by the population, since it does not change eating habits and presents low risks of toxicity because of its large margin of safety (Taddei et al., 2011).

In addition to the increase in nutrient content, the starch from cowpea improves the technology of quality of bakery products when compared to conventional sources of starch (cassava, corn, potato, and rice). With starch in beans, batters have lower amounts of specific gravity, which increases the product's specific volume, enlightens color, not allowing the reduction of humidity during the period of storage. And also, the best values regarding texture attributes during shelf life may lead to greater scores in the sensory evaluation, especially for attributes of crumb and texture (moisture, smoothness, and softness) (Almeida, Marangoni and Steel, 2013).

In the present study, we enriched a product commonly consumed by the general population, and whose market has been increasing. This practice represents an important strategy to serve the interests of the consumers by providing products with better nutritional value. Regional raw materials that are easy to obtain and prepare allow cheese bread to be enriched, contributing to the satisfaction of the daily nutrient requirements of the population. Thus, the objective of the present study was to develop a recipe of cheese bread enriched with whole biofortified cowpea flour (CF) of good sensory acceptance and with nutritional characteristics superior to the standard formulation.

MATERIAL AND METHODS

RAW MATERIALS

Samples of biofortified cowpea BRS Xiquexique came from the experimental field of the Brazilian Corporation of Agricultural Research (Embrapa Mid-North), Teresina, Piauí, Brazil, which is 72 meters high, being located 5°5' South latitude, and 42°48' West longitude. Other raw materials used in the formulations, such as

sweet starch, whole milk, soybean oil, parmesan cheese, eggs, and salt were obtained in local markets.

COWPEA FLOUR PRODUCTION

The whole cowpea flour was produced according to Frota et al. (2010). Grains of the BRS Xiquexique cultivar were milled in a semi-industrial mill (Tecnal model TE-651/2-T). The flour (0,5 *mesh*) was stored in polyethylene bags under refrigeration (8 °C) until the moment of use.

CHEESE BREAD'S FORMULATION

Formulations were prepared by following the steps described in Pereira et al. (2004). The dry raw materials (starch and CF) were mixed and then scalded with the liquids (water or milk with oil and salt), being heated to 85°C. The mixture was manually homogenised, and then, after five minutes, a fresh egg was added (the egg white and the yolk were premixed for easy addition). After three minutes, parmesan cheese was added to the formulation, and the dough was manually shaped into balls. The balls of dough were baked in an electric oven for 25 minutes at 180°C. In the standard formulation, only the sweet starch was considered dry material to be scalded. To obtain formulations, the same conditions of time and temperature were kept.

To obtain viable options for the next stage (sensory analysis of the products), different formulations and cooking times were tested, and the products were evaluated by trained assessors, who were participants of the project, with the objective of improving the formulations. Two formulations were prepared, in which the sweet starch and the CF were the only raw materials whose percentages varied (Table 2). Formulations were developed by tests conducted in the Laboratory of Product Development and Sensory Analysis of Food (Department of Nutrition - UFPI).

Table 2. Percentage of raw materials used in standard cheese bread formulations and in formulations enriched with CF after laboratory tests.

Raw materials	Standard (%)	F1 (%)	F2 (%)
---------------	--------------	--------	--------

Sweet starch	45	39,4	37
CF	-	5,6	8
Whole milk	27	27	27
Soybean oil	6	6	6
Iodised salt	1	1	1
Egg white	10	10	10
Parmesan cheese	11	11	11
TOTAL	100	100	100

SENSORY ANALYSIS

The sensory analysis of formulations F1 and F2 was performed by a team of 100 untrained assessors of both genders, aged between 18 and 50 years, who were potential consumers of the product, and who were recruited among students, staff, and professors of the Federal University of Piauí after signing an informed consent form.

To investigate the overall acceptance of the products, we used a nine-point hedonic scale (1 “extremely disliked” to 9 “extremely liked”), estimated purchase intent (1 “would certainly not buy it” to 5 “would certainly buy it”), and a discrimination test of paired comparison (in which the minimum preference number to establish a significant difference among samples at a significance level of 5% was of 100 assessors), to obtain at least 61 answers regarding the preferred formulation and identify differences (two-tailed), according to Dutcosky (2013); Ferreira et al. (2000) (ANEXO 3).

We used a completely randomized design, and all the sensory assessors evaluated the three samples of the product. We also have adopted the balanced presentation order, so that each cheese bread was presented many times and in every position to control the effects of first order and of reporting (Albuquerque et al., 2009).

MINERAL CONTENT

The calcium (Ca), copper (Cu), iron (Fe), phosphorus (P), sodium (Na), magnesium (Mg), manganese (Mn), and zinc (Zn) mineral contents were determined using an adapted Inductively Coupled Plasma-Optic Emission Spectrometry (ICP-OES) technique, by following Horwitz and Latimer Junior (2000). After the mineralisation, the samples were put in a muffle furnace at 450°C (model Q-318

M21, Quimis, São Paulo, Brazil). The original method was adapted regarding its wavelengths to analyze each mineral as follows: calcium, 317,933; copper, 324,754; iron, 259,940; phosphorus, 213,618; sodium, 589,592; magnesium, 279,553; manganese, 257,610; and zinc 206,200. Prior to the determination of the minerals, the materials used were decontaminated in a 20% nitric acid solution for 24 hours. These analyses were performed in triplicate at the Food Science and Quality Centre, ITAL, São Paulo (SP).

PROXIMATE COMPOSITION

The moisture was determined by drying in an oven (314D242 model, Quimis, São Paulo, Brazil) at 105°C until a constant weight was obtained. The ash content was determined after calcination in a muffle furnace (model Q-318 M21, Quimis, São Paulo, Brazil) at 550°C. The protein concentration was determined using the macro-Kjeldahl method with a conversion factor of 6.25, and the lipid content was determined by hot extraction using hexane as solvent in a Soxhlet apparatus (TE-044, Tecnal, São Paulo, Brazil) (Aoac, 2005). The carbohydrate content was calculated by difference, and the calorific value was calculated according to Atwater conversion factors (Watt and Merrill, 1963). These analyses were performed in triplicate at the Laboratory of Food Science and Food Biochemistry (Department of Nutrition - UFPI).

STATISTICAL ANALYSIS

The Statistical Package for the Social Sciences version 17 was used for the data analysis. We used the chi-square test for differences between the proportions of the paired comparisons, and the student's t-test for differences between the means of formulations. A significance level of 5% was adopted (Andrade, 2013).

ETHICAL ASPECTS

The participants of the study have voluntarily signed an informed consent form in accordance with the Resolution n^o 196/96 (Brasil, 1996) and the Resolution n^o 466/2012 of the National Health Council (Brasil, 2013). The study's protocol was examined and approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Piauí (CAAE: 0178.0.045.000-11).

RESULTS AND DISCUSSION

SENSORY EVALUATION

The formulations F1 and F2 underwent affective (hedonic scale and purchase intent), and discriminative (paired comparison) tests (Table 3).

Table 3. Overall acceptance of cheese bread enriched with whole biofortified cowpea flour (*Vigna unguiculata* (L.) Walp).

Samples	Overall acceptance (score)
	Mean \pm SD
F1	7.28 \pm 0.03 ^a
F2	6.62 \pm 0.01 ^b

F1 – cheese bread with 5.6% whole biofortified cowpea flour.

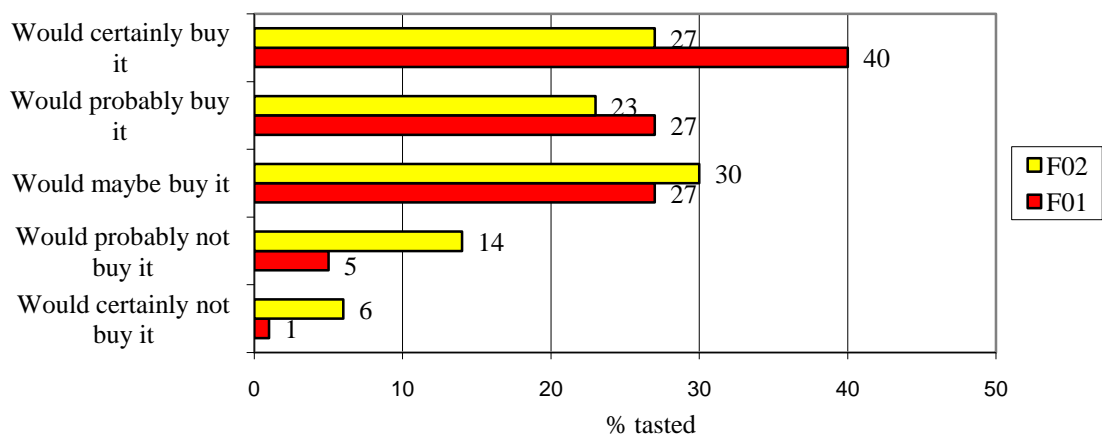
F2 – cheese bread with 8% whole biofortified cowpea flour.

Student t test at the level of 5%, 95% confidence interval (CI).

According to Table 3, both formulations obtained satisfactory acceptance levels with means greater than 6 (“slightly liked it”). The student’s t-test indicated a significant difference ($p < 0.05$) between formulations. The F1 accepting average showed values close to those obtained in a research by Andrade et al. (2011) developed with potatoes and cassava bread, both enriched with white bean flour, presenting averages of 7.2 and 7.4, respectively.

Almeida, Marangoni and Steel (2013) attribute the acceptance of bakery products enriched with cowpea to the technological properties of this vegetable starch in formulations, the obtaining of a product with a suitable texture and color, with greater air entrainment, and high specific volume.

The second test performed by the team of untrained assessors was the test of purchase intent (Figure 8).



F1 – cheese bread with 5.6% whole biofortified cowpea flour.

F2 – cheese bread with 8% whole biofortified cowpea flour.

Figure 8. Purchase intent for cheese bread formulations enriched with whole biofortified cowpea flour (*Vigna unguiculata* (L.) Walp).

As it was noted, advisers showed 67% and 50% of positive intentions (“would certainly buy” and “would probably buy” the product) for F1 and F2, respectively. The results of this test support the products’ acceptance by assessors, and show a greater tendency of purchase for F1.

The results of the paired comparison test were favourable for the F1 formulation. This result was similar to what was reported by Frota et al. (2010), which showed that the most widely accepted of the three formulations of different amounts of CF in cookies had the lowest CF content (Table 4).

Table 4. Paired comparison test between the cheese bread formulations.

Formulations	Number of assessors	%	Statistic
F1	67	67.0	$\chi^2=23.10$
F2	33	33.0	$p < 0.001$
TOTAL	100	100	

F1 – cheese bread with 5.6% whole biofortified cowpea flour.

F2 – cheese bread with 8% whole biofortified cowpea flour.

According to the sensory analysis, the F1 formulation had better commercial potential and acceptance, with more favourable results compared to the F2. Thus, the F1 was considered the sensorially selected sample. Subsequent proximate composition steps were performed using F1 to make comparisons with the standard product.

MINERAL CONTENT

Cowpea flour was considered appropriate for the enrichment of cheese bread. As CF was added to the product, the contents of the minerals analysed have increased, and only the calcium and sodium contents have reduced. The reduction in sodium was important, because such mineral is known to be highly present in the compositions of processed foods. Thus, to produce a product whose sodium concentration is significantly lower than in the standard is important. The CF in F1

has increased the amounts of copper, magnesium, and manganese by 2.3, 1.8, and 3.3-fold, respectively, when compared to the standard formulation (Table 5).

The cowpea flour doubled the amount of iron in F1 compared to the standard recipe. The increased iron and zinc values were expected because the BRS Xiquexique cultivar is biofortified and has high contents of these minerals, which are important to human nutrition since deficiency-related diseases are still highly prevalent.

Table 5. Mineral contents of the standard cheese bread and of the formulation F1 and the percentage of fulfilment of the recommended daily intake (RDI) for children aged between 4 and 6 years.

Minerals	Standard cheese bread mg/100 g		F1 (5.6%CF) mg/100 g	
	Mean + SD	%RDI*	Mean + SD	%RDI*
Calcium	251 ± 1.00 ^a	42	244 ± 5.00 ^b	41
Copper	0.021 ± 0.001 ^a	5	0.048 ± 0.002 ^b	11
Iron	0.34 ± 0.01 ^a	6	0.72 ± 0.01 ^b	12
Phosphorus	187 ± 1.00 ^a	37	210 ± 1.00 ^b	42
Sodium	699 ± 18.00 ^a	58	649 ± 26.00 ^b	54
Magnesium	12.3 ± 0.20 ^a	17	22.6 ± 0.30 ^b	31
Manganese	0.029 ± 0.003 ^a	2	0.097 ± 0.003 ^b	6
Zinc	1.87 ± 0.01 ^a	37	2.39 ± 0.04 ^b	48

F1 – cheese bread with 5.6% whole biofortified cowpea flour.

*The RDI for children aged between 4 and 6 years was considered (Brasil, 2005).

The same letter in a row indicates that there is no significant difference at the $p < 0.05$ level according to the Student's t-test.

Foods that are already part of the eating habits of the population should be fortified, mainly with regional raw materials that are easy to obtain and also sources of micronutrients, because the current food choices are poor regarding micronutrients. When comparing the RDI of reference with the amount of minerals present in 100 g of cheese bread, Table 5 shows that the formulation developed have met approximately half of the RDI for calcium, phosphorus and zinc and 12% of RDI for iron.

According to the Resolution 54 of November 12 of 2012, the Brazilian Health Surveillance Agency (Brasil, 2012), solid foods enriched with nutrients that provide at least 30% of the RDI of reference can receive the label “high content”. Therefore, F1 is a high content of calcium, phosphorus, sodium, magnesium, and zinc. The RDI of reference used was for children aged between 4 and 6 years, because this group has a greater susceptibility to deficiency-related diseases and are potential consumers of the product.

CHEMICAL COMPOSITION AND TOTAL ENERGY VALUE

According to Table 6, formulations showed no statistically significant difference compared to the ash content. This result can be derived from the percentage of CF in F1, as Frota et al. (2010) has observed by an increase in the ash content of baked products, in which the addition of cowpea was of 20%.

There was a decrease in moisture when sweet starch was partially substituted by CF (Table 6). Frota et al. (2010) have added CF in products such as cookies, and reported no significant differences between formulations with and without CF, but the authors did observe a decrease in the moisture content in Swiss rolls when the CF percentage increased, as seen in the present study.

Standard formulations and F1 have lower lipid levels than those determined by Lemos et al. (2012) in standard cheese bread formulation (20.7%). Despite the fact the addition of CF has promoted a decrease in lipid content of the formulation, Oladunmoye, Akinoso and Olapade (2010) have found the lipid content increases in breads that replaced wheat flour with cassava and cowpea.

Table 6. Mean and standard deviation of the proximate composition and total energy value (TEV) of cheese bread formulations.

Formulations	Ashes (%)	Moisture (%)	Lipids (%)	Protein (%)	Carbohydrates (%)	(Kcal/ KJoule)
Standard	2.6 ^a (±0.01)	29.9 ^a (±2.01)	11.8 ^a (±0.19)	8.8 ^a (±0.31)	46.9 ^a (±3.22)	329/1376.5 ^a
F1	2.9 ^a (±0.02)	26.9 ^b (±1.78)	8.1 ^b (±0.10)	10.6 ^b (±0.25)	51.5 ^b (±5.21)	321.3/1344 ^b

F1 – cheese bread with 5.6% whole biofortified cowpea flour.

The same letter in a column indicates that there is no significant difference between the means according to the Student's t-test ($p < 0.05$).

The increase in protein content, as shown in Table 6, was one of the goals of the preparation of fortified cheese breads, considering the protein content of vegetables is well known. Besides increasing the protein content, the cowpea improves the amino acids' profile, which is provided in the product, since such raw material presents all essential amino acids. Lysine is particularly deficient in cereals such as in flour, the main raw material of cheese breads. This partial substitution was relevant since F1 had higher protein content compared to the obtained by Lemos et al. (2012): 6.8 % in cheese breads with 10% amaranth flour.

The protein value of F1 was also higher than that of cookies with 10% CF and Swiss rolls with 10% and 20% CF developed by Frota et al. (2010).

Table 6 shows that the carbohydrate content was significant in cheese breads, which confirms the product is an energy-dense food. The use of a whole meal in the partial replacement of starch may have contributed to the increase in the carbohydrate content of F1, a relevant increase when considering the presence of dietary fiber in the product formulated.

Caloric values of both samples were smaller than the ones developed by Lemos et al. (2012) (356 kcal / 1489.5 KJoule).

The proximate composition emphasises the quality of the product. The percentage contribution to the RDI for carbohydrates and lipids was greater than 30%, and the percentage contribution to the RDI for protein was 55.8% (Table 7). Considering the F1 was accepted in the sensory analysis, and had increased contents of minerals and macronutrients, the partial replacement of sweet starch by CF in cheese bread production was found to be possible and relevant.

Table 7. Percentage of recommended daily intake (RDI) for macronutrients' fulfilment.

Macronutrients	% RDI
Carbohydrates	39.6
Lipids	32.4
Proteins	55.8

* The RDI for children aged between 4 and 6 years was considered (BRASIL, 2005).

CONCLUSIONS

Among the formulations enriched with whole-wheat flour cowpea, the F1 had higher acceptance values compared to F2, thus being the one selected.

It was observed that the cowpea addition has increased the levels of minerals, copper, iron, phosphorus, magnesium, manganese, and zinc and has decreased sodium and calcium levels.

The F1 has presented decreased moisture, lipids, and the total caloric value, with addition of proteins and carbohydrates when compared to the standard formulation.

It was concluded, therefore, that the cowpea, a regional raw material that has been gaining space in the market is a valid option for the enrichment of gluten free baked foods such as cheese breads.

REFERENCES

ALBUQUERQUE, T. L. et al. Processamento e aceitação sensorial de produto do tipo hambúrguer à base de soja (*Glycine max*) e atum (*Thunnus spp*). **Boletim do CEPPA**, 27(2): 191-198, 2009.

ALMEIDA, E. L.; MARANGONI, A. L.; STEEL, C. J. Starches from non – conventional sources to improve the technological characteristics of pound cake. **Ciência Rural**, 43(11): 2101-2108, 2013.

ANDRADE, A. A. de et al. Sensory evaluation of bakery flour enriched with white beans for celiac patients. **Nutrir Gerais**, 5(8):727-739, 2011.

ANDRADE, D. F. **Statistics for agrarian and biological sciences: experimental concepts**. 3 ed. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2013. 475p.

ANJOS, L. D. dos et al. Modified starches or stabilizers in preparation of cheese bread. **Ciência Rural**, 44(9):1686-1691, 2014.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY – AOAC. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 16 ed. Arlington: AOAC, 2005. 1025p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº. 54 de 12 de novembro de 2012. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília. DF. 19 de novembro de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº 269 de 22 de setembro de 2005. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília. DF. 22 de setembro de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº. 196 de 10 de outubro de 1996. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília. DF, 10 de outubro de 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº. 466 de 12 de dezembro de 2012. Dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília. DF, 13 de junho 2013.

BRASIL. Portaria nº 31 de 13 de janeiro de 1998. Aprova o regulamento técnico referente a alimentos adicionados de nutrientes essenciais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília. DF, 16 de janeiro de 1998.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 4º ed. Curitiba: Champagnat, 2013. 531p.

FERREIRA, V. L. P. et al. **Sensory Analysis: discriminative and affective tests**. v.1. Campinas: SBCTA, 2000. 127p.

FREIRE FILHO, F. R. et al. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. v.1. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 81p.

FROTA, K. M. G. et al. Utilisation of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) flour in the development of bakery products. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 30(1):44-50, 2010.

HORWITZ, W.; LATIMER JUNIOR, G. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17 ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2000, v.2, Chap.50 (met. 985.35; 984.27, 15-18p.).

LEMOS, A. R. et al. Effect of incorporation of amaranth on the physical properties and nutritional value of cheese bread. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 32(3):427-431, 2012.

MACHADO, A. V.; PEREIRA, J. Effect of scalding on technological and rheological properties of cheese bread dough and cheese bread. **Ciência e Agrotecnologia**, 34(2):421-427, 2010.

OLADUNMOYE, O.; AKINOSO, R.; OLAPADE, A. Evaluation of some physical–chemical properties of wheat, cassava, maize and cowpea flours for bread making. **Journal of Food Quality**, 33(6):693-708, 2010.

PEREIRA, J. et al. Function of the ingredients in the consistency of the dough and the characteristics of the cheese breads. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 24(4):494-500, 2004.

TADDEI, J. A. A. C. T. et al. **Nutrition in Public Health**. v.1. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2011. 664p.

WATT, B.; MERRILL, A. L. **Composition of foods: raw, processed, prepared**. DC: Consumer and Food Economics Research. Division (USDA), Washington, 1963. 190p. (Agriculture Handbook, 8).

ARTIGO CIENTÍFICO

MINERAL CONTENT, PHENOLIC COMPOUNDS AND BIOACTIVE AMINES OF
CHEESE BREAD ENRICHED WITH COWPEA.

TEOR DE MINERAIS, COMPOSTOS FENÓLICOS E AMINAS BIOATIVAS DE PÃO
DE QUEIJO ENRIQUECIDO COM FEIJÃO-CAUPI.

Rodrigo Barbosa Monteiro Cavalcante, Marcelo Antônio Morgano, Maria Beatriz de
Abreu Glória, Maurisrael de Moura Rocha, Marcos Antônio da Mota Araújo, Regilda
Saraiva dos Reis Moreira-Araújo.

ABSTRACT

The objective of this work to determine the chemical composition of cheese bread enriched with biofortified cowpea from sensorially accepted formulations. Was created a database in the Statistical Packarge for the Social Sciences program. For comparison of averages between two variables was applied to the *Student's t* test and for multiple comparisons the *Tukey* test at the 5% level ($p > 0.05$). Quantification of inorganic elements was carried out by plasma emission spectroscopy with inductive coupling. The concentrations of bioactive compounds and antioxidant activity was determined by spectrophotometric method. The methodology used for the separation, detection and quantification of bioactive amines was the High Performance Liquid Chromatography by ion pairing in reversed-phase column. The cheese bread enriched is a source of copper, zinc and sodium and presents high content of calcium, phosphorus and magnesium. The concentrations of total phenolics, flavonoids, and condensed tannins increased in cheese bread enriched. This one presented low biogenic amines and polyamines. It was also found an increase in antioxidant activity of cheese bread enriched. Therefore, it was concluded that the cheese bread enriched, besides contributing to the intake of minerals, is a functional food, as it contains bioactive compounds and high antioxidant activity.

Keywords: *Vigna unguiculata*; bakery product; micronutrients; phenolic compounds; bioactive amines.

Practical Application: The study reports the technological innovation in the production process of a mixture of cheese bread enriched with wholemeal flour of

biofortified cowpea. The cheese bread was chosen due to the contribution of the bakery to feed the family budget. Cowpea were from a biofortified cultivation with high levels of iron, zinc, phenolics and polyamines. The product is designed to meet the interests of consumers in food with better nutritional value and functional.

INTRODUCTION

Cheese bread is a traditional product of the state of Minas Gerais, Brazil, whose production has increased considerably in recent years, in association with the growth of the market, including the export of the product. However, despite its increasing consumption, there is no standardization in manufacturing, identity and quality, being allowed innovations by manufacturers, such as the addition of raw materials that will enrich the product (Anjos et al., 2014; Machado & Pereira, 2010).

The fortification presents several advantages, among them the great adherence of the population, the low risk of toxicity, since the margin of harmlessness is very wide, and the non-modification of the eating habits (Taddei et al., 2011), especially when it includes legumes, The example of the cowpea, as a vehicle of fortification.

The cowpea provides significant amounts of proteins, 23 to 25% and carbohydrates 56.8%, and has a large quantity of food fibers (3.9%) and low fat (1.3%). This raw material is characterized as a source of minerals (potassium, phosphorus, iron, calcium, manganese, magnesium and zinc) and vitamins (thiamine, riboflavin, pyridoxine, folacin and niacin). There is also the occurrence of bioactive compounds such as phenols and polyamines (Carvalho et al., 2012; Cavalcante et al., 2017a).

Phenolic compounds are chemical structures that present hydroxyls and aromatic rings, which confers the antioxidant power. In simple forms or polymers, free or complexed to sugars and proteins, these compounds originate from the secondary metabolism of plants, being essential for their growth and reproduction, in addition, are formed in conditions of stress as Infections, injuries, ultraviolet radiation (UV), among others (Angelo & Jorge, 2007). According to Hobbs et al. (2014); Lima (2005); Martinez-Valverde et al. (2000) The growing interest in phenolic compounds stems from their association with the reduction of the risk of diseases such as atherosclerosis and cancer whose bioactivity is related to the fact that phenolic compounds help control of the autoxidation.

Bioactive amines are composed of the usual metabolic processes of animal cells, plants and micro-organisms. Polyamines (spermine and spermidine) are important in the maturation and recovery of the intestinal mucosa, mediation of hormones and growth factors, in the synthesis of DNA, RNA and proteins, in addition to presenting antioxidant activity. Biogenic amines, in turn, are neuro and vasoactive due to the effects on vascular and neural systems. In excessive quantities, in addition to the possible toxicological effects, biogenic amines indicate a quality parameter in the food manufacturing process (Cunha et al., 2012; Glória, 2005).

In this way, it was intended to determine the mineral content, bioactive compounds and antioxidant activity in cheese bread enriched with fortified cowpea.

MATERIAL AND METHODS

RAW MATERIALS

The cowpea grains of the biofortified cultivar BRS Aracê were from cultivation 2017 of the experimental field of Embrapa Mid-North of Teresina-PI, which is 72 meters high, 5° 5' South Latitude and 42° 48' West Longitude. The grains were kept in the laboratory in low density polyethylene bags and film 0.08 mm thick at a temperature of 8° C until the time of analysis.

The other raw materials such as flour sweet, whole milk, soybean oil, parmesan cheese, eggs and salt, used in formulation, were obtained in local markets.

OBTAINING OF COWPEA FLOUR (FFC)

According to Frota et al. (2010) the cowpea beans were milled in semi-industrial mill to obtain the integral of cowpea flour (0,5 *mesh*). The flour was used immediately after your manufacture.

PREPARATION OF THE CHEESE BREAD

According to methodology adapted from Cavalcante et al. (2016) for preparation of the cheese bread, the dry ingredients (sweet starch, FFC, cheese and salt) were homogenized and then added this mixture the remaining raw materials (milk, egg and oil). The mass was homogenized and then shaped manually so that the loaves to acquire round shape. The breads, arranged in greased baking tin, roasted (260° C / 25 min.) in pre-heated electric oven (260° C / 10 min.). In table 8, is the elaborate formulation (F3).

Table 8. Percentages of the raw materials used in the formulation.

Raw materials	F3
Sweet starch	80-100
FFC	20
Milk	10-50
Oil	5-20
Egg	10-30
Cheese	5-25
Salt	0-15

MINERALS

All glassware used, after washing with Extran detergent (Merck), remained previously immersed in nitric acid solution (HNO₃) 25% (v/v) for 24 hours. Then the glassware was rinsed with distilled and demineralized water (resistivity of 18.2 MΩ cm⁻¹).

For the preparation of the sample, dry digestion was used (Horwitz & Latimer Júnior, 2000). The minerals were determined using the plasma emission spectrometry technique with inductive coupling (ICP OES) (Varian – Vista MPX - Mulgrave Victoria - Austrália).

TOTAL PHENOLS, TOTAL FLAVONOIDS AND CONDENSED TANNINS

For preparation of the extracts the samples were previously degreased by hot extraction using the ether as solvent.

To obtain the extract the procedure was adapted from Rufino et al. (2007). The extract methanol 50% - acetone 70% - water (2:2:1) was what resulted in better extraction yields.

The contents of the bioactive compounds were determined by spectrophotometric method (BEL 1102 – Monza – Milão - Itália). Total phenolic (Rossi & Singleton, 1965), total flavonoids (Kim et al., 2003) modified by Blasa et al. (2006) and condensed tannins (Price et al., 1978) (APÊNDICES 1, 2, 3).

BIOACTIVE AMINES

Ten bioactive amines were researched and the methodology used for the separation, detection and quantification of amines was the High Performance Liquid

Chromatography (HPLC) by pairing of ions in phase column reverse (LC – 10AD – SIL – 10AD VP – Shimadzu – Kioto - Japão) (Adão & Glória, 2005).

ANTIOXIDANT ACTIVITY

It was determined by the methods *2,2-Diphenyl-1-Pikryl-hydrazil* (DPPH) described by Brand-Williams et al. (1995) and *2,2'Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6sulfonic acid)* (ABTS), described by Re et al. (1999) (APÊNDICES 4, 5).

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis of the data was carried out using the *Statistical Packarge for the Social Sciences* (SPSS) program, version 21.0 (Spss, 2016). For comparison of the averages between two variables was applied the *Student's t* test and in the multiple compares, the *Tukey* test was used at the level of 5%, with a confidence interval of 95% for the tests (Andrade, 2013).

RESULTS AND DISCUSSION

According to resolution N°. 54 of 12 november 2012, the Brazilian Health Surveillance Agency (Brazil, 2012), foods that provide at least 15% and 30% from dietary reference intakes (DRI) reference can receive the claim "source" and "high content", respectively. On the exposed, the cheese bread with FFC presents itself as a source of copper, zinc and sodium with high content of calcium, phosphorus and magnesium (Table 9).

The supply of minerals in the formulated product can be a result of the use of a raw biofortified, with high levels of iron and zinc in grains. Simplício (2013) developed bread enriched with 25% of the same grains grow FFC (BRS Aracê) and determined larger levels of minerals analyzed, with the exception of calcium (59 mg / 100 g). This result may be due to the mix of flour used for bread (especially wheat flour, whole wheat flour and FFC).

Ugwuona & Suwaba (2013) verified an increase in the levels of calcium, iron, phosphorus and zinc in breads enriched with 20% of defatted Jack bean (*Canavalia ensiformis*) flour or 20% of concentrated protein of Jack bean. For your time, the levels of calcium (33 mg / 100 g), phosphorus (13 mg / 100 g) were lower than those obtained in the present study.

Table 9. Mineral content in cheese bread enriched with FFC and the percentage of coverage of the DRI.

Minerals	Cheese bread with FFC (mg/100g) (average \pm DP)	% DRI*
Calcium	211 \pm 7	35,2
Copper	0,07 \pm 0,01	15
Iron	0,8 \pm 0,004	13
Phosphorus	187 \pm 5	37,4
Magnesium	25,6 \pm 0,2	35
Manganese	0,2 \pm 0,001	11,5
Potassium	204 \pm 10	5,4
Sodium	347 \pm 14	29,0
Zinc	1,3 \pm 0,04	26,5

*Was considered the DRI to children from 4 to 6 years (Brazil, 2005).

Rybicka & Gliszczynska-Swiglo (2017) report that bakery products enriched with raw materials less popular as amaranth, chickpeas, Acorn, buckwheat, oats, millet and quinoa are best source of minerals than the same products manufactured from raw materials such as rice, corn, potatoes and wheat. So, incorporate products enriched in the diet improves the intake of micronutrients for population, this resource, indispensable in countries with nutritional deficiencies.

The addition of cowpea in formulation of cheese bread promoted the increase in concentrations of total phenolics, flavonoids and tannins and condensed as shown in table 10. As Verardo et al. (2018) formulations of multigrãos breads displays increase the amount of polyphenols, greater bioaccessibilidade of polyphenols and antioxidant power than standard bread.

The integument in cowpea beans is the main source of phenolic compounds, where, for your time, the colorful integuments have the largest concentrations. The beans of the plant variety BRS Aracê with colorful integuments showed concentrations of total phenolics (205.1 mg equivalent to gallic acid (GAE) / 100 g) larger than the grains of the cultivars BRS Millennium (133 mg GAE / 100 g), BRS Tumucumaque (177 mg GAE / 100 g), BRS Xiquexique (199 mg GAE / 100 g), BRS Itaim (132.3 mg GAE / 100 g), BRS Cauamé (98.1 mg GAE / 100 g) and BRS

Guariba (89.4 mg GAE / 100 g), both of grain with white integument (Barros et al., 2017; Cavalcante et al., 2017b; Mesquita et al., 2007).

Table 10. Levels of phenolic compounds in standard cheese bread and enriched.

Bioactive compounds	Standard Cheese Bread (average \pm DP)	Cheese bread with FFC (average \pm DP)
Total Phenolics (mg GAE/100g)	105,29 \pm 5,16 ^a	188,39 \pm 8,92 ^b
Total Flavonoids (mg EQ/100g)	51,75 \pm 1,6 ^a	85,89 \pm 2,77 ^b
Condensed Tannins (mg EC/100g)	3,54 \pm 0,0 ^a	7,04 \pm 0,28 ^b

Equal letters overlapped between standard cheese bread and cheese bread with FFC, there is no significant difference between means, *Student t* test at the level of 5%, 95% confidence interval (CI).

Coelho (2014) also checked the increase in total phenolics content of 197.2 to 261.9 μ g GAE / g breads that were enriched with flour of chia (*Salvia hispanica L.*).

Ferreira et al. (2015) developed cheese bread containing ginger and obtained 104.93 mg GAE / 100 g of total phenolics, this smaller value when compared to enriched bread of this study.

The compounds present in the class of total flavonoids have significant contribution to the total phenolic content. Verardo et al. (2018) enriched bread with 30% buckwheat and reported that the addition of whole grains in increments mainly contents of total flavonoids and phenolic acids. In this study it was observed an increase of 72 for 139 mg / kg in total flavonoids content and 37 to 97 mg / Kg in the total quantity of phenolic acids.

Barros et al. (2017) verified the presence of total flavonoids in four cowpea cultivars, where the beans of the plant variety BRS Aracê obtained medium 58.35 mg equivalent to quercetin (EQ) / 100 g, justifying the increase observed in levels of total flavonoids in bread enriched.

The condensed tannins present reduced contribution 3.5 and 7.0 mg equivalent to catechin (EC) / 100 g in levels of flavonoids in default and enriched breads, respectively (table 10).

In relation to the bioactive amine content, Diniz (2015) reports cheese, in addition to fish, a food associated with outbreaks of histamine intoxication, with cheddar, gouda, gruyere and swiss cheeses being the most involved due to their high maturation periods. However, histamine concentrations in cheeses that were already implicated in outbreaks ranged from 850 to 1870 mg / kg, much higher than that found in enriched cheese bread (Table 11). Tyramine, often involved in food poisoning, tryptamine and phenylethylamine, which have adverse effects in people sensitive to detoxification, are absent on bread with FFC.

Table 11. Bioactive amine content in cowpea (BRS Aracê), Standard cheese bread and cheese bread enriched with FFC.

Bioactive Amines (mg/kg)	Cowpea (average \pm DP)	Standard cheese bread (average \pm DP)	Cheese bread with FFC (average \pm DP)
Tyramine	nd	nd	nd
Putrescine	1,9 \pm 1,7 ^b	2,5 \pm 1,2 ^a	3,6 \pm 3,0 ^a
Cadaverine	2,9 \pm 0,9 ^{ca}	3,8 \pm 1,2 ^a	7,2 \pm 2,7 ^b
Histamine	2,8 \pm 4,8 ^b	7,9 \pm 3,9 ^a	7,3 \pm 1,8 ^a
Serotonin	nd	nd	nd
Agmatine	nd	1,2 \pm 2,0 ^a	3,3 \pm 3,9 ^b
Spermidine	129,4 \pm 32,1 ^c	9,7 \pm 9,7 ^a	14,1 \pm 7,3 ^b
Phenylethylamine	nd	0,4 \pm 0,6 ^a	0,1 \pm 0,2 ^a
Tryptamine	nd	nd	nd
Spermine	na	na	na

nd – not determined, na – not reviewed. Letters alike between the Cowpea flour and bread the standard cheese and with FFC no significant difference between the means. Through the One Way ANOVA test: Post Hoc Multiple Comparisons, the *Tukey* test at the level of 5%, 95% CI.

According to Table 11, spermidine is the bioactive amine in greater concentration in developed products. According to the Table of Contents of Bioactive Amines in Foods (TAMIN), the cowpea has a high content of spermidine (106.9 mg /

kg). The high content of spermidine in plants is due to the participation of this polyamine in the processes of morphogenesis, rooting, flowering and senescence. Cowpea is the raw material responsible for the increase of spermidine in cheese bread enriched and this increase is considered appropriate when considering the antioxidant and growth effects of the polyamines (DINIZ, 2015).

According to data reported to bioactive amines, can verify that the parmesan cheese is the raw material that most contributes to the levels of biogenic amines in formulations. Still according to TAMIN the legumes have little or no biogenic amine (DINIZ, 2015).

Second Galgano et al. (2012); Linares et al. (2012); Pachlová et al. (2012); Santos et al. (2003); Spizzirri et al. (2013); Ubaldo et al. (2015) the cheese contains significant levels of histamine, putrescine, cadaverine, and spermidine. The main factors affecting the formation and accumulation of biogenic amines in cheese are the availability of amino acids, the presence of micro-organisms with the appropriate catabolic pathway activated and environmental conditions favorable to the decarboxylation activity.

In this way, the reduced levels of biogenic amines in formulated products can be a result of the quality of raw materials, among them, the parmesan cheese. So, it can be affirmed that factors such as quality of milk, initial culture used, concentration of NaCl, time and temperature of storage and maturation, pH and post-maturation technological processes have been properly considered during the manufacture of cheese used in the formulations, since the content of biogenic amines in cheese can reach concentrations of up to 2000 mg / kg (LINARES et al., 2012).

On the exposed, the cheese bread enriched with FFC presents low content of polyamines (≤ 35 mg / kg) and biogenic amines (DINIZ, 2015). The main raw materials that contributed to the concentration of bioactive amines were the Cowpea and the parmesan cheese.

The introduction of cowpea in standard formulation increased the concentration of bioactive compounds in the product and, consequently, the ability to kidnap free radicals. This increase is in accordance to the work of Barros et al. (2017) that determined in the grains of the cultivar BRS Aracê antioxidant activity of 614.7 and 660.1 μmol antioxidant capacity equivalent to Trolox (TEAC) / 100 g by DPPH and ABTS, respectively. These values were higher than those obtained in the grains of the cultivars BRS Millennium, BRS Tumucumaque and BRS Xiquexique.

As can be seen in table 12 the cheese bread enriched has the highest antioxidant activity in both methods and ABTS, DPPH 497.5 and 735.1 $\mu\text{mol TEAC} / 100 \text{ g}$, respectively.

Two methods were employed because of the different characteristics and mechanisms of action of bioactive compounds as well as the principles of the methods and the nature of the radicals.

You can check that the increase of raw materials sources of bioactive compounds improves the antioxidant activity of bakery products. In search of Lin & Zhou (2018) it was observed that the gradual fortification of quercetin in bread formulation resulted in a significant increase in antioxidant activity in vitro. This increase was 2.9 to 285.8 mg TEAC / 100 g and 8.4 to 298.5 mg TEAC / 100 g, using the radical ABTS and DPPH, respectively.

Table 12. Antioxidant activity in standard cheese bread and enriched with full cowpea bean flour.

Antioxidant Activity	Standard cheese bread (average \pm DP)	Cheese bread with FFC (average \pm DP)
DPPH ($\mu\text{mol TEAC}/100\text{g}$)	307,43 \pm 14,67 ^a	497,5 \pm 14,65 ^b
ABTS ($\mu\text{mol TEAC}/100\text{g}$)	464,07 \pm 8,12 ^a	735,1 \pm 14,05 ^b

Equal letters between standard cheese bread and cheese bread with FFC, there is no significant difference between the averages, Student t test at 5% p, CI 95%.

Despite the bread with FFC have statistically greater antioxidant activity, the standard formulation presents significant content what according to Buchner et al. (2006); Lin & Zhou (2018); Sivam et al. (2010); Virág et al. (2013) may be due to the antioxidant properties of *Maillard* reaction products formed in the crust of the bread. The phenolic compounds intrinsic food, intermediate products of thermal degradation of phenolic compounds, as well as the compounds from the complex polyphenol-protein/starch can contribute to the antioxidant property of the products formulated.

CONCLUSIONS

In relation to the mineral content, the product formulated is a source of copper, zinc and sodium and with high content of calcium, phosphorus and magnesium.

The total phenolic content, total flavonoids and condensed tannins increased in the enriched cheese bread.

Enriched cheese bread shows an increase in spermidine contents and low levels of biogenic amines.

With the increase in the concentration of the bioactive compounds, it was possible to verify the improvement of the antioxidant activity of the cheese bread with cowpea by the two methods determined *in vitro*.

REFERENCES

- Adão, R. C., & Glória, M. B. A. (2005). Bioactive amines and carbohydrate changes during ripening of 'Prata' banana (*Musa acuminata* x *M. balbisiana*). *Food Chemistry*, 90(4), 705-711.
- Anjos, L. D., Pereira, J., Couto, E. M., & Cirillo, M. A. (2014). Modified starches or stabilizers in preparation of cheese bread. *Ciência Rural*, 44(9), 1686-1691.
- Andrade, D. F. (2013). *Statistics for agrarian and biological sciences: experimental concepts* (3th ed.). Florianópolis: Ed. da UFSC.
- Angelo, P. M., & Jorge, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 66(1), 232-240.
- Barros, N. V. A., Rocha, M. M., Glória, M. B. A., Araújo, M. A. M., & Moreira-Araújo, R. S. R. (2017). Effect of cooking on the bioactive compounds and antioxidant activity in grains cowpea cultivars. *Revista Ciência Agronômica*, 28(5), 824-831.
- Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, M. P., Albertini, M. C., & Piatti, E. (2006). Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chemistry*, 97(2) 217–222.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology-Leb.-Wis. & Technologie*, 28(1), 25-30.

Brasil, Ministério da Saúde. (2012). *Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar* (Resolução nº. 54, de 12 de novembro de 2012). Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

Brasil, Ministério da Saúde. (2005). *Dispõe sobre o regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais* (Resolução nº 269, de 22 de setembro de 2005). Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

Buchner, N., Krumbein, A., Rohn, S., & Kroh, L. W. (2006). Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(21), 3229–3235.

Carvalho, A. F. U., Sousa, N. M., Farias, D. F., Rocha-Bezerra, L. C. B., Silva, R. M. P., Viana, M. P., Gouveia, S. T., Sampaio, S. S., Sousa, M. B., Lima, G. P. G., Morais, S. M., Barros, C. C., & Freire-Filho, F. R. (2012). Nutritional ranking of 30 Brazilian genotypes of cowpeas including determination of antioxidant capacity and vitamins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1-2), 81-88.

Cavalcante, R. B. M., Araújo, M. A. M., Rocha, M. M., & Moreira-Araujo, R. S. R. (2017a). Effect of thermal processing on chemical compositions, bioactive compounds, and antioxidant activities of cowpea cultivars. *Revista Caatinga*, 30(4), 1050-1058.

Cavalcante, R. B. M., Araújo, M. A. M., Rocha, M. M., Silva, K. J. D., & Moreira-Araújo, R. S. R. (2017b). Effect of thermal processing on total polyphenol content in the grain of cowpea cultivars. *Revista Ciência Agronômica*, 48(5), 806-810.

Cavalcante, R. B. M. C., Morgano, M. A., Silva, K. J. D., Rocha, M. M., Araújo, M. A. M., & Moreira-Araújo, R. S. R. (2016). Cheese bread enriched with biofortified cowpea flour. *Ciência e Agrotecnologia*, 40(1), 97-103.

- Coelho, M. S. (2014). *Pão enriquecido com chia (Salvia hispanica L.): desenvolvimento de um produto funcional* (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- Cunha, F. L., Conte Junior, C. A., Lázaro, C. A., Santos, L. R., Mársico, E. T., & Mano, S. B. (2012). Determinação de aminas biogênicas em diferentes tipos de queijos por cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 71(1), 69-75.
- Diniz, F. B. (2015). *Elaboração de tabela de aminas bioativas em alimentos e estimativa da ingestão no Brasil* (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Ferreira, L. F. D., Caliman, F. R. B., Costa, E. T. L., Vieira, K. C., Pirozi, M. R., Gomes, F. S., & Borges, J. T. S. (2015). Atividade antioxidante e aceitação sensorial de pão de queijo contendo gengibre. In: *Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos* (SLACA), Campinas, São Paulo.
- Frota, K. M. G., Morgano, M. A., Silva, M. G., Araújo, M. A. M., & Moreira-Araújo, R. S. R. (2010). Utilização da farinha de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) na elaboração de produtos de panificação. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(1), 44-50.
- Galgano, F., Caruso, M., Condelli, N., & Favati, F. (2012). Focused: agmatine in fermented foods. *Frontiers in Microbiology*, 3(1), 1–7.
- Glória, M. B. A. (2005). Amines. In: Hui, H., & Nollet, L. L. (Eds.), *Handbook of Food Science* (cap. 13; p. 38). New York: Marcel Dekker.
- Hobbs, D. A., Ashouri, A., George, T. W., Lovegrove, J. A., & Methven, L. (2014). The consumer acceptance of novel vegetable-enriched bread products as a potential vehicle to increase vegetable consumption. *Food Research International*, 58(1), 15-22.

Horwitz, W., & Latimer Junior, G. (2000). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (17 ed.). Maryland: AOAC.

Kim, D., Jeong, S. W., & Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81(1), 321-326.

Lima, D. E. S. (2005). *Influência do melhoramento genético convencional sobre os constituintes do feijão-caupi (Vigna unguiculata (L.) Walp)* (Dissertação de mestrado) Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Lin, J., & Zhou, W. (2018). Role of quercetin in the physicochemical properties, antioxidant and antiglycation activities of bread. *Journal of Functional Foods*, 40(1), 299–306.

Linares, D. M., Del Río, B., Ladero, V., Martínez, N., Fernández, M., Martín, M. C., & Álvarez, M. A. (2012). Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in microbiology*, 3(180), 1-10.

Machado, A. V., & Pereira, J. (2010). Effect of scalding on technological and rheological properties of cheese bread dough and cheese bread. *Ciência e Agrotecnologia*, 34(2), 421-427.

Martinez-Valverde, L., Periago, M. J., & Ros, G. (2000). Nutritional importance of phenolic compounds in the diet. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 50(1), 5-18.

Mesquita, F. R., Corrêa, A. D., Abreu, C. M. P., Lima, R. A. Z., & Abreu, A. F. B. (2007). Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. *Ciência e Agrotecnologia*, 31(4), 1114-1121.

Pachlová, V., Bunka, F., Flasarová, R., Válková, P., & Bunková, L. (2012). The effect of elevated temperature on ripening of dutch type cheese. *Food Chemistry*, 132(1), 1846–1854.

Price, M. L., Scoyoc, S. V., & Butler, L. G. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 26(1), 1214-1218.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231–1237.

Rossi, J. A., & Singleton, V. L. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 20(2), 144-158.

Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. D. (2007). Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. In: *Comunicado Técnico, n° 127* (Embrapa Meio-Norte).

Rybicka, I., & Gliszczynska-Swiglo, A. (2017). Minerals in grain gluten-free products. The content of calcium, potassium, magnesium, sodium, copper, iron, manganese and zinc. *Journal of Food Composition and Analysis*, 59(1), 61-67.

Santos, W. C., Souza, M. R., Cerqueira, M. O. P., & Gloria, M. B. A. (2003). Bioactive amines formation in milk by Lactococcus in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. *Food Chemistry*, 81(1), 595–606.

Simplício, A. P. M. (2013). *Desenvolvimento de pão integral enriquecido com farinha de cultivares de feijão-caupi (Vigna unguiculata (L.) Walp)* Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Piauí, Teresina.

Sivam, A. S., Sun-Waterhouse, D., Quek, S., & Perera, C. O. (2010). Properties of bread dough with added fiber polysaccharides and phenolic antioxidants: A review. *Journal of Food Science*, v. 75(8), R163–R174.

Spizzirri, U. G., Restuccia, D., Curcio, M., Parisi, O. I., Iemma, F., & Picci, N. (2013). Determination of biogenic amines in different cheese samples by LC with vaporative light scattering detector. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29(1), 43–51.

Spss, *Statistical Package for the Social Sciences – SPSS*, versão 21.0, 2016.

Taddei, J. A. A. C. T., Lang, R. M. F., Longo-Silva, G., & Toloni, M. H. A. (Eds). (2011). *Nutrição em Saúde Pública*. Rio de Janeiro: Rubio.

Ubaldo, J. C. S. R., Carvalho, A. F., Fonseca, L. M., & Glória, M. B. A. (2015). Bioactive amines in Mozzarella cheese from milk with varying somatic cell counts. *Food Chemistry*, 178(1), 229-235.

Ugwuona, F. U., & Suwaba, S. (2013). Effects of defatted jack bean flour and jack bean protein concentrate on physicochemical and sensory properties of bread. *Nigerian Food Journal*, 31(2), 25-32.

Verardo, V., Glicerina, V., Cocci, E., Frenich, A. G., Romani, S., & Caboni, M. F. (2018). Determination of free and bound phenolic compounds and their antioxidant activity in buckwheat bread loaf, crust and crumb. *LWT – Food Science and Technology*, 87(1), 217-224.

Virág, D., Kiss, A., Forgó, P., Csutorás, C., & Molnár, S. (2013). Study on Maillard-reaction driven transformations and increase of antioxidant activity in lysine fortified biscuits. *Microchemical Journal*, 107(1), 172-177.

CAPÍTULO III – PEDIDO DE PATENTE

Será depositado, por meio do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia (NINTEC) da UFPI, o pedido da patente de invenção intitulado “Pão de queijo enriquecido com farinha integral de feijão-caupi biofortificado e seu respectivo processo de mistura e obtenção”, desenvolvido pelos inventores Rodrigo Barbosa Monteiro Cavalcante e Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo.

RESUMO

“PÃO DE QUEIJO ENRIQUECIDO COM FARINHA INTEGRAL DE FEIJÃO-CAUPI BIOFORTIFICADO E SEU RESPECTIVO PROCESSO DE MISTURA E OBTENÇÃO”

A patente de invenção é compreendida de um processo de produção e mistura para obtenção de pão de queijo enriquecido com farinha integral de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) biofortificado, visando sua aplicação na elaboração de um produto enriquecido que participa do hábito alimentar da população, auxiliando no aporte de fibras alimentares, micronutrientes e compostos bioativos, destinado principalmente a atender consumidores interessados em produtos com melhor valor nutritivo e funcional. Caracteriza-se por provê uma formulação composta pelas seguintes matérias-primas: polvilho doce (80-100%), leite integral (10-50%), óleo de soja (5-20%), sal iodado (0-15%), ovo branco (10-30%), queijo (5-25%) e farinha integral de feijão-caupi biofortificado (20%) em substituição parcial ao polvilho doce.

RELATÓRIO DESCRITIVO

“PÃO DE QUEIJO ENRIQUECIDO COM FARINHA INTEGRAL DE FEIJÃO-CAUPI BIOFORTIFICADO E SEU RESPECTIVO PROCESSO DE MISTURA E OBTENÇÃO”

Refere-se a presente patente de invenção, que diz respeito à indústria de panificação, a um processo de produção e mistura para obtenção de pão de queijo enriquecido com farinha integral de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)

biofortificado, visando sua aplicação na elaboração de um produto enriquecido que participa do hábito alimentar da população, auxiliando no aporte de fibras alimentares, micronutrientes e compostos bioativos, destinado principalmente a atender consumidores interessados em produtos com melhor valor nutritivo e funcional.

A fortificação ou enriquecimento de alimentos é um método utilizado atualmente na tentativa de reforçar o valor nutritivo dos alimentos, favorecendo a manutenção ou recuperação da saúde.

A fortificação apresenta várias vantagens, entre elas a alta cobertura populacional, a não modificação dos hábitos alimentares e o baixo risco de toxicidade. De acordo com o Banco Mundial, nenhuma outra tecnologia oferece tão ampla oportunidade de melhorar o estado nutricional dos indivíduos a um custo tão baixo e em tão pouco espaço de tempo.

Não obstante, a escolha do feijão-caupi para fortificação foi devido o fato de o Brasil encontrar-se entre os três principais produtores mundiais dessa leguminosa, acompanhando Nigéria e Niger. Os maiores produtores são os estados do Mato Grosso, Ceará, Piauí, Pernambuco, Bahia e Paraíba.

A qualidade nutritiva do grão de feijão-caupi é muito importante e tem impactos positivos sobre a saúde humana. Nesse sentido, estudos têm avaliado as características nutricionais do aludido feijão, principalmente quanto aos teores de proteínas, fibras alimentares, vitaminas, minerais, compostos fenólicos e amins bioativas nos grãos secos.

Nesse contexto, a introdução da farinha integral de feijão-caupi biofortificado na formulação proporciona um aumento, não só das quantidades de proteínas, fibras alimentares e carboidratos, como também, dos teores de compostos bioativos, vitaminas e minerais como fósforo, ferro, potássio, magnésio, zinco, manganês e cobre.

Os grãos utilizados para obtenção da farinha integral foram provenientes da cultivar biofortificada BRS Aracê. Esta se caracteriza por sua adaptação ao bioma Caatinga, sendo indicada para produtores da região Nordeste, além de pertencer ao grupo comercial cores, subclasse verde e com alto teor de ferro e zinco no grão.

A introdução de produtos agrícolas biofortificados – variedades melhoradas que apresentam maiores teores de micronutrientes e compostos bioativos –

complementa as intervenções em nutrição existentes, para alcançar as populações com limitado acesso aos sistemas formais de saúde e mercado.

Para tanto, a escolha do pão de queijo para o enriquecimento foi devido à importância dos produtos de panificação na lista de compra dos brasileiros. Essa estratégia de fortificação tem apelo não apenas regional, como também, mundial, visto que países como a Nigéria apresenta esforços para promover farinhas compostas por cereais e leguminosas como base para produtos de panificação.

Em relação à utilização da farinha integral de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) biofortificado na elaboração de produtos de panificação, ressalta-se que é conhecido o desenvolvimento de formulações de biscoito e rocambole, mas sem o uso de farinha integral, e de pão de queijo, mas utilizando grãos de outra cultivar e com processo de mistura e obtenção diferente da presente patente.

Não obstante, versando sobre o estado anterior da técnica, algumas patentes (BR1020120084775, BRMU8801430U2, BRPI0405756A, BRPI0504640A, BRPI0601869A, BRPI0701062A2, BRPI0803115A2, BRPI0901788A2, BRPI1001174A2, PI 9802798-0, PI 9900596-4 A2, PI 9903443-3 e WO2013152406A1) reivindicam a propriedade de processo, método e mistura para obtenção de pão de queijo. Embora tais técnicas provesses o mesmo produto proposto na presente invenção, o principal diferencial da presente patente é a elaboração de pão de queijo enriquecido com matéria-prima biofortificada, regional, de fácil acesso, visando contribuir para o requerimento diário de micronutrientes e compostos bioativos para a população.

Um dos objetos da presente invenção é provê uma mistura de pão de queijo enriquecida com farinha integral de feijão-caupi biofortificado, caracterizada por empregar em sua formulação as matérias-primas:

-Polvilho doce: por facilitar a padronização do produto e apresentar características físico-químicas mais estáveis. A principal função do amido em produtos de panificação é absorver a água e, deste modo, estabelecer a estrutura do produto.

-Leite: em substituição total ao uso de água. A gordura presente no leite confere melhor aparência ao produto final. As proteínas contribuem para a maciez e umidade, enquanto os sais minerais alteram a consistência da massa aumentando o valor nutritivo do pão de queijo.

-Gordura: utilizada por atuar como lubrificante molecular, ajudando a massa a ter maior extensibilidade, maior elasticidade e melhor textura do miolo.

-Ovo: por propiciar aos pães de queijo melhor estrutura, textura mais leve, aerada, maior volume, característica de liga, cor amarelo natural, além do fornecimento de proteínas, vitaminas (A, D e E) e minerais.

-Queijo: por contribuir para o aroma, sabor, maior maciez e uniformidade das células do miolo.

-Farinha integral de feijão-caupi: por melhorar as características nutritivas e funcionais da formulação.

Para obtenção da farinha integral de feijão-caupi biofortificado, os grãos da cultivar BRS Aracê, provenientes do campo experimental da Embrapa Meio Norte de Teresina-PI, que está a 72 m de altitude, 5° 5' de latitude sul e 42° 48' de longitude oeste, foram moídos em moinho semi-industrial (Tecnal, modelo TE-651/2-T) e a farinha (0,5 *mesh*) utilizada imediatamente após sua fabricação.

Outro objeto da presente invenção é o processo de mistura e obtenção do aludido pão de queijo enriquecido com farinha integral de feijão-caupi biofortificado caracterizado pelo desenvolvimento das etapas discriminadas abaixo.

Etapa 1 - Homogeneização

Os ingredientes secos (polvilho doce, farinha integral de feijão-caupi biofortificado, queijo e sal) foram homogeneizados e, em seguida, acrescentou-se nessa mistura as demais matérias-primas (leite, ovo e óleo). Essa mistura foi homogeneizada manualmente.

Etapa 2 – Acabamento

A moldagem foi feita manualmente para que os pães adquirissem formato redondo.

Etapa 3 – Modo de Assar

As massas foram assadas por 20 minutos a 260 °C em forno elétrico pré-aquecido (260 °C / 10 min).

O feijão-caupi apresentou eficiência no enriquecimento do pão de queijo, visto que o produto elaborado é fonte de proteínas e apresenta alto conteúdo de fibras

alimentares. Em relação ao teor de minerais, o produto formulado apresenta-se como fonte de cobre, zinco e sódio e com alto conteúdo de cálcio, fósforo e magnésio. Os teores de fenólicos totais, flavonóides totais, taninos condensados e espermidina aumentaram no pão de queijo enriquecido. Observou-se também baixos teores de amins biogênicas no produto formulado.

Com o incremento na concentração dos compostos bioativos, foi possível verificar a melhora da atividade antioxidante do pão de queijo com feijão-caupi por dois métodos determinados *in vitro* (DPPH e ABTS).

REIVINDICAÇÕES

1. “PÃO DE QUEIJO ENRIQUECIDO COM FARINHA INTEGRAL DE FEIJÃO-CAUPI BIOFORTIFICADO E SEU RESPECTIVO PROCESSO DE MISTURA E OBTENÇÃO”, caracterizado por um processo de produção e mistura para obtenção de pão de queijo enriquecido com matéria-prima regional (farinha integral de feijão-caupi biofortificado), de fácil acesso, visando contribuir para o requerimento diário de micronutrientes e compostos bioativos para a população.

2. “PÃO DE QUEIJO ENRIQUECIDO COM FARINHA INTEGRAL DE FEIJÃO-CAUPI BIOFORTIFICADO E SEU RESPECTIVO PROCESSO DE MISTURA E OBTENÇÃO”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por provê uma mistura de pão de queijo enriquecida com farinha integral de feijão-caupi biofortificado, distinta por empregar em sua formulação as matérias-primas: polvilho doce (80-100%), leite integral (10-50%), óleo de soja (5-20%), sal iodado (0-15%), ovo branco (10-30%), queijo (5-25%), e farinha integral de feijão-caupi biofortificado (20%) em substituição parcial ao polvilho doce.

3. “PÃO DE QUEIJO ENRIQUECIDO COM FARINHA INTEGRAL DE FEIJÃO-CAUPI BIOFORTIFICADO E SEU RESPECTIVO PROCESSO DE MISTURA E OBTENÇÃO”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo desenvolvimento das seguintes etapas: homogeneização dos ingredientes secos (polvilho, farinha integral de feijão-caupi biofortificado, queijo e sal), em seguida, acrescentou-se nessa mistura as demais matérias-primas (leite, ovo e óleo). Posteriormente, a moldagem foi feita manualmente para que os pães adquirissem formato redondo e o assamento foi realizado por 20 min. a 260 °C em forno elétrico pré-aquecido (260 °C / 10 min).

4. “PÃO DE QUEIJO ENRIQUECIDO COM FARINHA INTEGRAL DE FEIJÃO-CAUPI BIOFORTIFICADO E SEU RESPECTIVO PROCESSO DE MISTURA E OBTENÇÃO”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por apresentar eficiência no enriquecimento do pão de queijo, visto que o produto elaborado é fonte de proteínas e apresenta alto conteúdo de fibras alimentares. Em relação ao teor de minerais, o produto formulado apresenta-se como fonte de cobre, zinco e sódio e com alto conteúdo de cálcio, fósforo e magnésio. Os teores de fenólicos totais, flavonóides totais, taninos condensados e espermidina aumentaram no pão de queijo enriquecido. Observou-se também baixos teores de amins biogênicas no produto formulado.

Com o incremento na concentração dos compostos bioativos, foi possível verificar a melhora da atividade antioxidante do pão de queijo com feijão-caupi por dois métodos determinados *in vitro* (DPPH e ABTS).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Desenvolveu-se pão de queijo enriquecido com farinha integral de feijão-caupi biofortificado a partir de formulações aceitas sensorialmente. O produto elaborado é fonte de proteínas e apresenta alto conteúdo de fibras alimentares. O acréscimo de feijão-caupi foi acompanhado do aumento do valor energético total do produto.
- Em relação ao teor de minerais, o produto formulado apresenta-se como fonte de cobre, zinco e sódio e com alto conteúdo de cálcio, fósforo e magnésio.
- O teor de fenólicos totais, flavonóides totais e taninos condensados aumentaram no pão de queijo enriquecido.
- O pão de queijo enriquecido apresenta um incremento no teor de espermidina e baixos teores de amins biogênicas.
- Com o incremento na concentração dos compostos bioativos, foi possível verificar a melhora da atividade antioxidante do pão de queijo com feijão-caupi pelos dois métodos determinados *in vitro*.
- Conclui-se, portanto, que o feijão-caupi, uma matéria-prima regional e com expansão de mercado se apresenta como uma opção viável para o enriquecimento de alimentos de panificação sem glúten, como o pão de queijo. Além do fornecimento de nutrientes importantes, o produto formulado se apresenta como um veículo compostos bioativos.

ANEXOS

ANEXO 1 - DEPÓSITO DO PEDIDO DE PATENTE

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA
*Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10
Bairro Ininga CEP: 64049-550-Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638*

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a Universidade Federal do Piauí, através do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI – NINTEC –, efetuou às 10:26 horas do dia 24/09/2014, sob o número de Protocolo do INPI: 000094 o depósito de Pedido de Patente de Invenção intitulado **"Pão de queijo enriquecido com farinha integral de feijão-caupi e seu respectivo processo de mistura e obtenção"**, desenvolvido pelos inventores:

Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araujo

Rodrigo Barbosa Monteiro Cavalcante

Teresina, 06/03/2015.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Maria Rita de Moraes Chaves Santos'.

Profª. Drª. Maria Rita de Moraes Chaves Santos
Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: ELABORAÇÃO DE PÃO DE QUEIJO ENRIQUECIDO COM FARINHA DE FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) BIOFORTIFICADO.

Pesquisador responsável: Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo

Instituição/Departamento: Universidade Federal do Piauí / Departamento de Nutrição

Telefone para contato (inclusive a cobrar): (86) 3215-5863

Pesquisadores Participantes: Msc. Marcos Antônio de Mota Araújo; Rodrigo Barbosa Monteiro Cavalcante.

Prezado (a) Senhor (a):

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Você precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver. Após ser **esclarecido** (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma.

- ◆ Você será requisitado (a) para a realização de testes de Análise Sensorial, onde deverá provar pães de queijo enriquecidos com farinha de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) biofortificado, que fazem parte desta pesquisa, e responder alguns testes específicos esse tipo de análise.
- ◆ Os testes que você irá realizar não apresentam risco, prejuízo, desconforto ou provocam lesões.
- No caso de recusa ou rejeição aos produtos, você terá o direito de retirar o seu consentimento a qualquer tempo da realização da pesquisa.

- ◆ Se você concordar em participar do estudo, seu nome e identidade serão mantidos em sigilo. A menos que requerido por lei ou por sua solicitação, somente o pesquisador, a equipe do estudo, representantes do patrocinador (quando presente), Comitê de Ética independente e setores de agências regulamentadoras do governo (quando necessário) terão acesso a suas informações para verificar as informações do estudo.
- ◆ A sua participação se restringe ao momento da realização dos testes sensoriais. Mesmo após a assinatura do termo de consentimento, você terá o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG/ CPF / n.º de matrícula _____, concordo em participar do estudo como sujeito. Fui suficientemente informado a respeito das informações que li, descrevendo o estudo “Elaboração de pão de queijo enriquecido com farinha de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) biofortificado”. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu acompanhamento / assistência / tratamento neste Serviço.

Local e data _____

Nome e Assinatura do sujeito ou responsável: _____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

Teresina, ____ de ____ de _____

Assinatura do pesquisador responsável

ANEXO 3 – TESTES SENSORIAIS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

NOME: _____ DATA: _____

1. Você está recebendo duas amostras codificadas. Por favor, prove cada amostra e avalie usando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou do produto.

1. Desgostei muitíssimo
2. Desgostei muito
3. Desgostei regularmente
4. Desgostei ligeiramente
5. Indiferente
6. Gostei ligeiramente
7. Gostei regularmente
8. Gostei muito
9. Gostei muitíssimo

AMOSTRAS

2. Compare as amostras codificadas e identifique sua intenção de compra do produto utilizando-se a escala abaixo:

1. Certamente não compraria
2. Provavelmente não compraria
3. Talvez compraria
4. Provavelmente compraria
5. Certamente compraria

AMOSTRAS

3. Você está recebendo duas amostras codificadas. Compare-as em relação ao aspecto global do produto. Identifique com um círculo a amostra de maior aceitação.

ANEXO 4 – OUTRAS PRODUÇÕES

ARTIGO CIENTÍFICO

Caatinga 30(4):1050-1058, Out/Dez. 2017.

EFFECT OF THERMAL PROCESSING ON CHEMICAL COMPOSITIONS,
BIOACTIVE COMPOUNDS, AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF COWPEA
CULTIVARS

EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA,
COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CULTIVARES DE
FEIJÃO-CAUPI

RODRIGO BARBOSA MONTEIRO CAVALCANTE, MARCOS ANTÔNIO DA MOTA
ARAÚJO, MAURISRAEL DE MOURA ROCHA, REGILDA SARAIVA DOS REIS
MOREIRA-ARAÚJO

ABSTRACT

This study aimed to determine the effect of cooking on the centesimal compositions, the content of bioactive compounds, and antioxidant activities in beans of the cowpea cultivars. The beans were cooked without soaking (1:5 w/v) in a pressure cooker for 780 seconds. Statistical analysis was performed using Student's t-test to determine the difference between means of raw and cooked beans. One-way ANOVA: post-hoc Tukey's test was applied at 5% to compare the data of the cultivars. Significant difference ($p < 0.05$) was noted between the moisture contents of samples, with values ranging from 10.69 to 11.37% in the raw beans and 63.32 to 75.43% in the cooked ones. Only BRS Marataoã showed a slight reduction (1.24%) in the energy value. The total polyphenol content in cooked beans decreased on discarding the broth. BRS Marataoã showed the highest levels of total polyphenols and flavonoids in raw beans, cooked beans, and broth. The raw beans of the cultivar BRS Itaim had greater content of condensed tannins and total anthocyanins. The raw beans, cooked beans, and broth showed statistically significant differences between their antioxidant activities, and the best results were found in the samples not subjected to thermal

processing, particularly in BRS Marataoã. In conclusion, cooking influenced the concentration of bioactive compounds and antioxidant activities of the beans. Therefore, it is recommended that cooked cowpea beans should be consumed with the cooking broth for optimization of antioxidants.

Keywords: Functional foods. Antioxidants. Cooking. *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

RESUMO

Este trabalho objetivou verificar o efeito da cocção na composição centesimal, no conteúdo de compostos bioativos e na atividade antioxidante em grãos de cultivares de feijão-caupi. Estes foram cozidos sem maceração (1:5 p/v) em panela de pressão por 13 minutos. Na análise estatística utilizou-se o teste t de *Student* para verificar diferença entre a média dos grãos crus e cozidos. Por meio do método de *one-way ANOVA: post-hoc*, aplicou-se o teste de médias de *Tukey* ao nível de 5% para as demais variáveis. Em relação à composição centesimal, houve diferença significativa ($p < 0,05$) apenas para o teor de umidade, com valores de 10,69 a 11,37% nos grãos crus e 63,32 a 75,43% nos cozidos. Apenas a cultivar BRS Marataoã apresentou discreta redução (1,24%) no valor energético. Quanto aos polifenóis totais, observou-se uma diminuição do conteúdo nos grãos cozidos, com retenção no caldo. A cultivar BRS Marataoã destacou-se com os maiores teores de polifenóis totais e flavonóides totais nos grãos crus, cozidos e caldo. Observou-se, nos grãos crus da cultivar BRS Itaim os maiores teores de taninos condensados e antocianinas totais. Os grãos crus, cozidos e caldo apresentaram diferença estatisticamente significativa na atividade antioxidante, sendo os melhores resultados nas amostras sem tratamento térmico, com destaque para a BRS Marataoã. Concluiu-se que o cozimento influenciou a concentração dos compostos bioativos e a atividade antioxidante dos grãos, recomendando-se o consumo do feijão-caupi com o caldo de cocção para aproveitamento dos compostos antioxidantes.

Palavras-chave: Alimentos funcionais. Antioxidantes. Cocção. *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

INTRODUCTION

The cowpea bean, a leguminous plant of the genus *Vigna*, is widely cultivated in North and Northeast regions of Brazil and in the African continent. It is of interest as a food product owing to its easy climatic adaptability and functional and nutraceutical

properties (FROTA et al., 2008; FALADE; KOLAWOLE, 2013; MARQUES et al., 2015). Recently, genetic breeding techniques, in pursuit of desirable characteristics in an ideal cultivar, have been used to produce various materials that make up the cowpea genebanks (FROTA; SOARES; ARÊAS, 2008).

The cowpea has an excellent nutritive composition: proteins (23 to 25%, mostly globulins and albumins); carbohydrates (56.8%), B vitamins, minerals (potassium, phosphorus, iron, calcium, manganese, magnesium, and zinc), dietary fiber (3.9%), and low fat content (1.3%), with a substantial amount of unsaturated fatty acids (45.6 to 78.1%). It also contains non-digestible oligosaccharides (raffinose, stachyose, and verbascose) (CARVALHO et al., 2012).

The increasing demand for healthy dietary foods has driven research for foodstuffs that can meet these needs. Vitamin C, α -tocopherol, carotenoids, and phenolic compounds that are present in plant products have the ability to reduce oxidative damage associated with many diseases including cancer, cardiovascular disease, atherosclerosis, diabetes, arthritis, among others (SIDDHURAJU; BECKER, 2007).

Polyphenols are chemical structures with hydroxyl groups and aromatic rings (monomers or polymers), showing antioxidant properties. Major polyphenols include flavonoids, phenolic acids, simple phenols, coumarins, tannins, lignins, and tocopherols (ANGELO; JORGE, 2007). These phytochemicals complement the endogenous antioxidants, which regulate the various oxidation-reduction reactions that occur continuously in the body. In turn, phenolic compounds are known to be unstable and are influenced, among other factors, by the temperature used during food processing (SULTANA; ANWAR; IQBAL, 2008).

Thermal processing allows optimal nutrient intake in beans, thus improving their digestion, nutrient absorption, and sensory characteristics. Proper cooking can also reduce non-digestible oligosaccharides and thermolabile anti-nutritional factors, such as trypsin inhibitors and phytates. As a result of the antioxidant properties of these compounds, thermal processing results in substantial changes in the antioxidant capacities of the grains (BENEVIDES et al. 2013; FERNANDES; CALVO; PROENÇA, 2012; KALPANADEVI; MOHAN, 2013).

Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of domestic thermal processing (cooking) on the chemical compositions and antioxidant activities in grains of five cultivars of cowpea.

MATERIAL AND METHODS

EXPERIMENTAL PROTOCOL

Samples of cowpea grains were collected from the experimental field of Embrapa Meio-Norte in Teresina-PI (72 meters altitude, 5° 5' South Latitude and 42° 48' West Longitude) from the first crop of 2013. The grains were kept at the Laboratory of Bromatology and Food Biochemistry (LABROMBIOQ) in the Nutrition Department of the Federal University of Piauí (UFPI) in hermetic packagings at 8 °C until their analysis.

Five cultivars were analyzed: BRS Marataoã, BR 17-Gurguéia, BRS Itaim, BRS Cauamé, and BRS Guariba. The first two cultivars have colorful seed coats, while the other cultivars have white seed coats.

SAMPLE PREPARATION

The beans were manually scanned for removal of impurities and unhealthy grains. The grains of each cultivar were subjected to two different preparation procedures. The raw beans were ground using a rotor mill (Tecnal, TE-651/2-T) to a homogeneous powder (0.5 mesh). Another batch of beans was cooked without soaking in a 1:5 beans: water ratio (w/v) in a 2 L domestic pressure cooker for 780 seconds after constant steam output from the pressure valve. Then, the cooked grains were separated from the cooking broth with the aid of plastic sieves and homogenized in a grau with pistil for further analysis. The homogeneous powders obtained from the raw beans and cooked beans were stored in bags of low density polyethylene and 0.08-mm thick film, and the cooking broths were stored in plastic tubes (0.05 L), both under refrigeration (8 °C) until analysis. All analyses were performed in triplicate in the period from March 2014 to December 2014.

PROXIMATE COMPOSITION AND TOTAL ENERGY VALUE

Moisture was determined until constant weight was observed after drying in an oven (314D242, Quimis, São Paulo, Brazil) at 105 °C. Ash content was determined after calcination of the samples in a muffle furnace (Q-318M21, Quimis, São Paulo, Brazil) at 550 °C up to constant mass. Protein concentration was determined using the Macro-Kjeldahl method with a conversion factor of 5.75 (for plant proteins), and lipid content was determined by intermittent hot extraction using hexane as a solvent in a Soxhlet apparatus (ET-044, Tecnal, São Paulo, Brazil) (AOAC, 2005).

Carbohydrate content was calculated using the difference method, and the total energy value was determined according to Atwater conversion factors (WATT; MERRILL, 1963).

BIOACTIVE COMPOUNDS

Several solvents (water, 80% acetone, and ethanol) were tested because the solubility of phenols, their degree of polymerization, and their interactions with other constituents of food vary according to the polarity of the solvent. The best extraction yields were obtained using 50% methanol-70% acetone-water extract (2:2:1). To obtain the extracts, the procedure was adapted from Rufino et al. (2007).

The levels of the following bioactive compounds were determined using the spectrophotometric method: total phenolic compounds (ROSSI; SINGLETON, 1965), total flavonoids (KIM; JEONG; LEE, 2003 modified by Blasa et al., 2006), anthocyanins (GIUSTI; WROLSTAD, 2001), and condensed tannins (PRICE; SCOYOC; BUTLER, 1978).

ANTIOXIDANT ACTIVITY

Antioxidant activity was determined using the following methods: 2,2' azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) method described by Re et al. (1999) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) method described by Brand-Williams, Cuvier, and Berset (1995).

STATISTICAL ANALYSIS

Data analysis was performed using the software program 'statistical package for social sciences' (SPSS) version 17.0 (SPSS, 2006). The results were presented as means and standard deviations. Before starting the statistical analysis, the non-parametric Kolmogorov-Smirnov normality test was applied. Normal distribution ($p < 0.05$) was not observed between the means of the three replications for each cowpea cultivar. Thereafter, Student's t-test was used to verify the differences between the means of raw and cooked grains (centesimal composition), and one-way ANOVA: post-hoc, Tukey's test was applied at 5% probability ($p < 0.05$) with a 95% confidence level to analyze differences between the means of the cultivars (HILBE, 2013).

RESULTS AND DISCUSSION

PROXIMATE COMPOSITION AND TOTAL ENERGY VALUE

The grains absorbed water after cooking (see Table 13). This result is in agreement with results of several previous studies (DELFINI; CANNIATTI-BRAZACA, 2008; RAMÍREZ-CÁRDENAS; LEONEL; COSTA, 2008; SILVA; BRIGIDE; CANNIATTI-BRAZACA, 2013). Water absorption capacity is influenced by seed coat characteristics of the grains: thickness, weight, adherence to cotyledons, elasticity, porosity, and colloidal properties. Hence, the analyzed cultivar grains had similar seed coat characteristics because they showed similar grain moisture contents after cooking. The levels of ashes, proteins, lipids, and carbohydrates from the grains of the five cultivars were also not affected by the heat treatment (Table 13).

It is likely that ash content in the cooked grain samples remained unchanged because cooking favors the release of some mineral complexes present in grains, such as the phytic acid-mineral complex, replacing the mineral diffusion losses in the cooking broth (RAMÍREZ-CÁRDENAS; LEONEL; COSTA, 2008).

The presence of the cooking broth associated with grains during the determination of proximate composition may have contributed to the quantification of solubilized proteins, lipids, and carbohydrates, as observed by Silva, Brigide and Canniatti-Brazaca (2013) and Ramirez-Cardenas, Leonel and Costa (2008).

The cultivar BRS Marataoã showed a significant difference ($p < 0.05$) in the total energy value after cooking, which can be explained by lower levels of lipids and carbohydrates in the grain of this cultivar (Table 13).

Table 13. Proximate compositions and total energy values of the grains of five cowpea cultivars before and after thermal processing.

Nutrient* g / 100g	Cultivar	Raw Bean Mean \pm SD	Cooked Bean Mean \pm SD
Moisture	BRS Marataoã	10.7 \pm 1.3 ^{aA}	72.5 \pm 2.0 ^{aB}
	BR 17 – Gurguéia	10.7 \pm 1.7 ^{aA}	74.8 \pm 3.1 ^{aB}
	BRS Itaim	11.4 \pm 0.9 ^{aA}	75.4 \pm 7.1 ^{aB}
	BRS Cauamé	11.0 \pm 0.9 ^{aA}	63.3 \pm 8.7 ^{aB}
	BRS Guariba	11.2 \pm 1.5 ^{aA}	69.0 \pm 4.4 ^{aB}
Ash	BRS Marataoã	4.5 \pm 0.4 ^{aA}	5.3 \pm 0.0 ^{aA}
	BR 17 – Gurguéia	3.8 \pm 0.1 ^{aA}	4.4 \pm 0.4 ^{aA}
	BRS Itaim	3.7 \pm 0.2 ^{aA}	3.9 \pm 0.2 ^{aA}
	Cauamé	3.7 \pm 0.2 ^{aA}	3.7 \pm 0.3 ^{aA}

	Guariba	3.7 ± 0.1 ^{aA}	4.5 ± 0.2 ^{aA}
Proteins	BRS Marataoã	16.3 ± 0.6 ^{aA}	16.8 ± 1.5 ^{aA}
	BR 17 – Gurguéia	17.6 ± 1.9 ^{aA}	17.2 ± 1.3 ^{aA}
	BRS Itaim	16.6 ± 0.9 ^{aA}	16.6 ± 0.3 ^{aA}
	BRS Cauamé	17.4 ± 0.7 ^{aA}	17.5 ± 0.2 ^{aA}
	BRS Guariba	14.5 ± 0.4 ^{aA}	14.8 ± 1.4 ^{aA}
Lipids	BRS Marataoã	1.3 ± 0.2 ^{aA}	1 ± 0.1 ^{aA}
	BR 17 – Gurguéia	1.5 ± 0.4 ^{aA}	1.3 ± 0.5 ^{aA}
	BRS Itaim	2.1 ± 0.3 ^{aA}	2 ± 0.3 ^{aA}
	Cauamé	1.4 ± 0.3 ^{aA}	1.9 ± 0.7 ^{aA}
	Guariba	1.3 ± 0.3 ^{aA}	1.6 ± 0.3 ^{aA}
Carbohydrates	Marataoã	77.9 ^{aA}	76.9 ^{aA}
	BR 17 – Gurguéia	77.1 ^{aA}	77.1 ^{aA}
	BRS Itaim	77.6 ^{aA}	77.5 ^{aA}
	BRS Cauamé	77.5 ^{aA}	76.8 ^{aA}
	BRS Guariba	80.5 ^{aA}	79.1 ^{aA}
Total energy value (Kcal/g)	BRS Marataoã	388.6 ± 0.7 ^{aA}	383.75 ± 0.7 ^{aB}
	BR 17 – Gurguéia	393.9 ± 2.5 ^{aA}	389.27 ± 0.9 ^{aA}
	BRS Itaim	395.7 ± 1.9 ^{aA}	394.04 ± 2.4 ^{aA}
	BRS Cauamé	391.9 ± 1.5 ^{aA}	394.70 ± 2.8 ^{aA}
	BRS Guariba	391.8 ± 1.8 ^{aA}	390.10 ± 2.0 ^{aA}

Means of data from three replications. Same capital letters between raw and cooked beans imply that there is no significant difference, based on the Student's t-test. Same lowercase letters between cultivars in the same column in raw and cooked beans imply that there is no significant difference, based on the Tukey's test. Both tests compare the means at asignificance level of 5%.

* Results expressed on a dry basis.

BIOACTIVE COMPOUNDS

After thermal processing, there was a decrease in the total polyphenol content in the grains of the five cowpea cultivars (Table 14), as observed by Delfini and Canniatti-Brazaca (2008) and Siddhuraju and Becker (2007) in the genotypes of cowpea and common beans.

Table 14. Total polyphenols in grains of cowpea cultivars before and after thermal processing and in the cooking broth.

Cultivar	Total Polyphenols (mg GAE ⁻¹)		
	Raw Bean Mean ± SD	Cooked Bean Mean ± SD	Cooking Broth Mean ± SD
BRS Marataoã	295.2 ± 24.8 ^{aA}	131.6 ± 22.3 ^{aB}	274.3 ± 21.2 ^{aC}

BR 17-Gurguéia	255.7 ± 10.6 ^b A	91.7 ± 3.3 ^b B	163.6 ± 52.5 ^b C
BRS Itaim	132.3 ± 11.4 ^c A	66.5 ± 7.0 ^c B	95.2 ± 21.8 ^c C
BRS Cauamé	98.1 ± 9.0 ^d A	55.0 ± 10.0 ^d B	72.8 ± 7.1 ^d C
BRS Guariba	89.4 ± 11.1 ^e A	49.0 ± 8.0 ^e B	62.9 ± 12.2 ^e C

Means of data from three replications. Same lowercase letters between cultivars in the same column indicate that there is no significant difference, based on Tukey's test. Same capital letters between raw bean, cooked bean, and cooking broth indicate that there is no significant difference, based on Tukey's test. The means were compared at a significance level of 5%.

Results expressed on wet basis.

In the present study, the contents of phenolic compounds were significant, considering the sum of the contents obtained in the cooked grains and respective cooking broths, justified through the reduction of proteins bound to polyphenols on cooking. Therefore, the transfer of compounds to the broth occurs because of the water solubility of these compounds.

Total flavonoid contents in the grains and their cooking broths are shown in Table 15. After thermal processing, there was an increase in the total flavonoid contents in the five cultivars, considering cooked beans and cooking broth. Sultana, Anwar and Iqbal (2008) found an increase in the phenolic content in vegetable samples after thermal processing. These authors attributed this increase to the possibly increased solubilization and extraction of these compounds as a result of softening or breakdown of plant cell walls.

Table 15. Total flavonoids in grains of cowpea cultivars before and after thermal processing and in the cooking broth.

Cultivar	Total Flavonoids (mg EQ ⁻¹)		
	Raw Bean Mean ± SD	Cooked Bean Mean ± SD	Cooking Broth Mean ± SD
BRS Marataoã	164.0 ± 14.1 ^a A	207.7 ± 28.9 ^a B	350.4 ± 49.1 ^a C
BR 17-Gurguéia	158.7 ± 25.3 ^a A	137.2 ± 32.9 ^b B	189.0 ± 3.0 ^b C
BRS Itaim	126.9 ± 13.7 ^b A	86.8 ± 25.1 ^c B	121.9 ± 38.6 ^c A
BRS Cauamé	124.4 ± 5.6 ^b A	62.9 ± 11.1 ^d B	75.6 ± 4.5 ^d B
BRS Guariba	109.0 ± 15.8 ^c A	69.3 ± 20.0 ^d B	59.8 ± 8.4 ^e C

Means of data from three replications. Same lowercase letters between cultivars in the same column indicate that there is no significant difference, based on Tukey's test. Same capital letters between raw bean, cooked bean, and cooking broth indicate that there is no significant difference, based on Tukey's test. The means were compared at a significance level of 5%. Results expressed on wet basis.

According to Machado et al. (2008), losses during processing of these compounds vary, depending on the kinds of food and preparation that are used. Thus, the stability of flavonoids and their glycosylated chemical structures may have contributed to higher extraction of these compounds in samples, in some cases, exceeding the phenolic content, as proteins are possible complexation substrates and may cause underestimation of the levels of total polyphenols.

The concentrations of anthocyanins in the samples are shown in Table 16. Among the analyzed cultivars, raw grains of BRS Itaim showed the highest anthocyanin content ($p < 0.05$).

Table 16. Total anthocyanins in grains of cowpea cultivars before and after thermal processing and in the cooking broth.

Cultivar	Anthocyanins (mg cy-3-glu ⁻¹)		
	Raw Bean Mean \pm SD	Baked Bean Mean \pm SD	Cooking Broth Mean \pm SD
BRS Marataoã	0.2 \pm 0.0 ^a A	ND*	0.1 \pm 0.0 ^a C
BR17–Gurguéia	0.6 \pm 0.0 ^b A	0.1 \pm 0.0 ^a B	0.1 \pm 0.0 ^a B
BRS Itaim	1.8 \pm 0.0 ^c A	0.1 \pm 0.0 ^a B	0.1 \pm 0.0 ^a B
BRS Cauamé	0.3 \pm 0.0 ^{ad}	ND	ND
BRS Guariba	0.1 \pm 0.0 ^e A	ND	ND

Means of data from three replications. Same lowercase letters between cultivars in the same column indicate that there is no significant difference, based on Tukey's test. Same capital letters between raw bean, cooked bean, and cooking broth indicate that there is no significant difference, based on Tukey's test. The means were compared at a significance level of 5%.

Results expressed on wet basis.

*ND (not detected).

The emphasis on the content of anthocyanins in the grains of BRS Itaim can be justified by the fact that genetic variability may contribute to a change in the profile of phenolic compounds of each grain.

Andrade and Ogliari (2010), in a study on anthocyanin content in cowpea, determined a content of 2.20 mg^{-1} in grains of the cultivar BRS Marataoã, a value greater than the one determined in the present study. However, anthocyanin contents in grains of both BRS Novaera and BRS Tumucumaque cultivars were 1.02 mg^{-1} .

Ha, Noh and Lee (2010) identified five types of anthocyanins in cowpea: delphinidin 3-glucoside, cyanidin 3-glucoside, petunidin 3-glucoside, 3-glucoside peonidin, and malvidin-3-glucoside.

Thermal processing caused a decrease in the total anthocyanin contents in the grains of the five cowpea cultivars. Thus, the sum of the levels of these phytochemicals in the cooked grains and cooking broth did not exceed the levels found in the raw grains. This factor can be explained by the effect of temperature on the stability of anthocyanins, wherein degradation is greater at higher temperatures.

As shown in Table 17, thermal processing may cause attenuation of the contents of condensed tannin in BRS Itaim and BRS Cauamé cultivars, owing to the ability of tannins to diffuse from the cotyledon into the endosperm and bind to proteins. This decrease was also observed by Benevides et al. (2013) and Ramirez-Cardenas, Leonel and Costa (2008) while evaluating different beans with 64–83% reduction.

Table 17. Condensed tannins in grains of cowpea cultivars before and after thermal processing and in the cooking broth.

Cultivar	Condensed Tannins (mg EC^{-1})		
	Raw Bean Mean \pm SD	Cooked Bean Mean \pm SD	Cooking Broth Mean \pm SD
BRS Marataoã	$2.9 \pm 0.8^{\text{aA}}$	$2.0 \pm 0.3^{\text{aB}}$	$1.5 \pm 0.1^{\text{aC}}$
BR 17-Gurguéia	$1.9 \pm 0.7^{\text{aA}}$	$1.8 \pm 0.4^{\text{aA}}$	$0.4 \pm 0.0^{\text{aB}}$
BRS Itaim	$4.9 \pm 1.0^{\text{bA}}$	$2.6 \pm 0.2^{\text{aB}}$	ND*
BRS Cauamé	$2.1 \pm 0.1^{\text{aA}}$	$1.5 \pm 1.0^{\text{aB}}$	ND
BRS Guariba	$1.9 \pm 0.1^{\text{aA}}$	$1.8 \pm 0.2^{\text{aA}}$	$0.3 \pm 0.0^{\text{aB}}$

Means of data from three replications. Same lowercase letters between cultivars in the same column indicate that there is no significant difference, based on Tukey's test. Same capital letters between raw bean, cooked bean, and cooking broth indicate that there is no significant difference, based on Tukey's test. The means were compared at a significance level of 5%.

Results expressed on wet basis.

*ND (not detected).

In turn, the contents of condensed tannins of cultivars BRS Marataoã, BR 17-Gurguéia and BRS Guariba, increased after thermal processing, possibly considering the compounds that migrated to the cooking broth. In the study by Avanza et al. (2013), the cowpea grain variety "Colorado" showed the same levels of tannins after three cooking times (20, 40, and 60 minutes).

According to Barampama and Simard (1995) and Oliveira et al. (2001), although the broth is a possible source for these compounds, insoluble molecular complexes may be formed between tannins and related compounds that are present in the broth during cooking (proteins, lipids, and oligosaccharides), which cannot be extracted and quantified by analytical techniques, resulting in underestimation of their values.

ANTIOXIDANT ACTIVITY

As shown in Table 18, thermal processing also affected the antioxidant activity of cowpea grains of the cultivars. BRS Marataoã cultivar showed the highest antioxidant activity in both methods, both before and after processing and in the cooking broth, followed by BR 17-Gurguéia.

Table 18. Antioxidant activity of grains of cowpea cultivars before and after thermal processing and in the cooking broth.

Antioxidant Activity ($\mu\text{mol TEAC}^{-1}$)				
Method	Cultivar	Raw Bean Mean \pm SD	Cooked Bean Mean \pm SD	Cooking Broth Mean \pm SD
DPPH	BRS Marataoã	2586.3 \pm 72.7 ^a A	917.4 \pm 64.9 ^a B	2479.1 \pm 83.8 ^a C
	BR 17-Gurguéia	2008.1 \pm 63.4 ^b A	559.6 \pm 59.7 ^b B	1181.8 \pm 92.5 ^b C
	BRS Itaim	736.2 \pm 28.5 ^c A	227.1 \pm 22.8 ^c B	495.3 \pm 40.1 ^c C
	BRS Cauamé	465.6 \pm 16.5 ^d A	169.7 \pm 54.0 ^d B	279.4 \pm 83.4 ^d C
	BRS Guariba	362.9 \pm 17.4 ^e A	130.7 \pm 41.9 ^e B	179.2 \pm 65.3 ^e C
	BRS Marataoã	2982.1 \pm 22.6 ^a A	896.0 \pm 20.0 ^a B	2850.3 \pm 58.8 ^a C
	BR17-Gurguéia	2025.4 \pm 22.0 ^b A	691.3 \pm 48.1 ^b B	1040.3 \pm 10.0 ^b C

ABTS	BRS Itaim	723.6 ± 11.1 ^c A	430.4 ± 77.9 ^c B	523.9 ± 41.3 ^c C
	BRS Cauamé	581.3 ± 64.4 ^d A	303.2 ± 97.7 ^d B	423.2 ± 56.5 ^d C
	BRS Guariba	515.7 ± 21.5 ^e A	326.5 ± 94.3 ^e B	387.1 ± 73.7 ^e C

Means of data from three replications. Same lowercase letters between cultivars in the same column indicate that there is no significant difference, based on Tukey's test. Same capital letters between raw bean, cooked bean, and cooking broth indicate that there is no significant difference, based on Tukey's test. The means were compared at a significance level of 5%.

Results expressed on wet basis.

Both these cultivars have dark seed coats, similar to the observation of the study by Silva, Rocha and Canniatti-Brazaca (2009), where the grains of colored varieties showed higher levels of phenolic compounds, resulting in higher antioxidant activities of the grains. The antioxidant activity evaluated by the two methods is attributed to the presence of phenolic compounds. Among these compounds, total flavonoids are possibly the main components that are responsible for this activity, since they are in greater quantities in the grains and cooking broths.

Cooking promoted a decrease in the antioxidant activities of grains, as observed by Siddhuraju and Becker (2007), who analyzed the effect of thermal processing on two cowpea genotypes, in which the raw grains had EC50 (concentration of the sample required to inhibit 50% of the DPPH radical) contents of 618 and 705 mg⁻¹ of DPPH, compared with 1238 and 1922 mg⁻¹ of DPPH after processing.

However, despite the reduction in antioxidant activity in the cooked grains, there was an increase in the antioxidant activities on considering broth and cooked grains together.

CONCLUSION

The ash, proteins, lipids, and carbohydrates contents in the five cowpea cultivar grains were not affected by heat treatment. After cooking, cowpea cultivars showed high contents of bioactive compounds, considering both the grains and cooking broth. The polyphenols and total flavonoids contents were highest in the BRS Marataoã and BR 17-Gurguéia cultivars, and they also showed the highest antioxidant activities. BRS Itaim cultivar showed high contents of anthocyanins and condensed tannins. The antioxidant activities of the cowpea cultivars were higher in raw beans and cooking broth and lower in cooked grains in both methods. Therefore,

it is recommended that cowpea should be consumed through preparations that use cooked beans with the cooking broth.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the CNPq via Universal Notice - process number 482292 / 2011-3, the CAPES-CNPq via Casadinho-PROCAD Notice - process number 552239/2011-8, the Embrapa Meio-Norte via 01/2012 Macroprograma Notice, for the financial support provided, and CAPES for the master's scholarship.

REFERENCES

- ANDRADE, D. F.; OGLIARI, P. J. **Estatística para as ciências agrárias e biológicas**: com noções de experimentação. 2. ed. Florianópolis, SC: Editora UFSC, p. 470, 2010.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.
- AOAC - **ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS**. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists. 15 ed. Washington, DC, 2005.
- AVANZA, M. et al. Nutritional and anti-nutritional components of four cowpea varieties under thermal treatments: principal component analysis. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 51, n. 1, p. 148-157, 2013.
- BARAMPAMA, Z.; SIMARD, R. E. Effects of soaking, cooking and fermentation on composition, in-vitro starch digestibility and nutritive value of common beans. **Plant Foods for Human Nutrition**, Alemanha, v. 48, n. 4, p. 349-365, 1995.
- BENEVIDES, C. M. J. et al. Efeito do processamento sobre os teores de oxalato e tanino em maxixe (*Cucumis anguria* L.), jiló (*Solanum gilo*), feijão verde (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) e feijão andu (*Cajanus cajan* (L.) Mill sp). **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 24, n. 3, p. 321-327, 2013.

BLASA, M. et al. Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. **Food Chemistry**, United Kingdom, v. 97, n. 2, p. 217-222, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CARVALHO, A. F. U. 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, n. 1-2, p. 81-88, 2012.

DELFINI, R. A.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Polyphenols and their interaction with digestibility and cooking time in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.19, n.4, p. 401-407, 2008.

FALADE, K. O.; KOLAWOLE, T. A. Effect of irradiation dose on physical, functional and pasting properties of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) cultivars. **Journal of Food Process Engineering**, v. 36, n. 2, p.147–59, 2013.

FERNANDES, A. C.; CALVO, M. C. M.; PROENÇA, R. P. C. Técnicas de pré-preparo de feijões em unidades produtoras de refeições das regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 259-269, 2012.

FROTA, K. M. G. et al. Cholesterol-lowering properties of whole cowpea seed and its protein isolate in hamsters. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 9, p. 235-240, 2008.

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

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-Visible Spectroscopy. In: WROLSTAD, R. E. (Ed.). **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, Unit. v. 1, n. 2., p. 1-13, 2001.

HA, D.; NOH, M.; LEE, Y. Bias reduction of likelihood estimators in semi-parametric frailty models. **Scandinavian Journal of Statistics**. v. 37, n. 2, p. 307–320, 2010.

HILBE, J. **Methods of Statistical Model Estimation**. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC Press, p. 255, 2013.

KALPANADEV, V.; MOHAN, V. R. Effect of processing on antinutrients and in vitro protein digestibility of the underutilized legume, *Vigna unguiculata* L. Walp subsp. *Unguiculata*. **LWT – Food Science and Technology**, v. 51, n. 2, p. 455-461, 2013.

KIM, D.; JEONG, S. W.; LEE, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, United Kingdom, v. 81, n. 3, p. 321-326, 2003.

MACHADO, H. et al. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MARQUES, M. R. et al. Effect of cooking on the thermal behavior of the cowpea bean oil (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 120, p. 289-296, 2015.

OLIVEIRA, A. C. et al. The elimination of the not absorbed water during common bean soaking resulted in weight gain in rats. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 153-155, 2001.

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

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

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, 1999.

ROSSI, J. A.; SINGLETON, V. L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 20, n. 2, p. 144-158, 1965.

RUFINO, M. S. M. et al. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Teresina: Embrapa Agroindústria Tropical (Embrapa Agroindústria Tropical, Comunicado Técnico, 127), p. 4, 2007.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. **Food Chemistry**, United Kingdom, v. 101, n. 1, p. 10-19, 2007.

SILVA, A. G., ROCHA, L. C., CANNIATTI BRAZACA, S. G. Caracterização físico-química, digestibilidade protéica e atividade antioxidante de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 20, n. 4, p. 591-598, 2009.

SILVA, M. O.; BRIGIDE, P.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Caracterização da composição centesimal e mineral de diferentes cultivares de feijão comum crus e cozidos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 24, n. 3, p. 339-346, 2013.

SPSS, **Statistical Package for the Social Sciences – SPSS**, versão 17.0, 2006.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; IQBAL, S. Effect of different cooking methods on the antioxidant activity of some vegetables from Pakistan. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 560-567, 2008.

WATT, B.; MERRILL, A. L. **Composition of foods: raw, processed, prepared.**
Washington DC: Consumer and Food Economics Research. Divison/Agricultural
Service (Agriculture Handbook, 8), 1963.

ARTIGO CIENTÍFICO

Ciência Agrônômica 48(5):806-810, 2017.

EFFECT OF THERMAL PROCESSING ON TOTAL POLYPHENOL CONTENT IN
THE GRAIN OF COWPEA CULTIVARS

EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO NO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS
EM GRÃOS DE CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI

RODRIGO BARBOSA MONTEIRO CAVALCANTE, MARCOS ANTÔNIO DA MOTA
ARAÚJO, MAURISRAEL DE MOURA ROCHA, KAESEL JACKSON DAMASCENO E
SILVA, REGILDA SARAIVA DOS REIS MOREIRA-ARAÚJO

RESUMO

Os grãos de feijão-caupi se destacam devido suas propriedades funcionais, provavelmente, pelas ações sinérgicas dos seus nutrientes e compostos bioativos. Visto que estes compostos sofrem efeitos do processamento térmico, o presente trabalho objetivou verificar a influência da cocção no conteúdo de polifenóis totais em grãos de cultivares de feijão-caupi. As amostras foram provenientes do campo experimental da Embrapa Meio-Norte, que está a 72 metros de altitude, 5° 5' de Latitude Sul e 42° 48' de Longitude Oeste. As farinhas (0,5 *mesh*) resultantes dos grãos crus moídos em moinho rotor tipo ciclone (Tecnal modelo TE-651/2-T) e os grãos cozidos (sem maceração em uma proporção feijão:água de 1:5 (p/v) em panela de pressão doméstica (2 L), durante 780 segundos) foram armazenados em embalagens herméticas sob refrigeração (8°C) até o momento das análises, realizadas em triplicata. O conteúdo de fenólicos totais foi determinado espectrofotometricamente ($\lambda = 765$ nm), utilizando-se reagente *Folin-Ciocalteu*. Os teores de fenólicos totais, mg GAE (equivalente a ácido gálico)/100g, nos grãos crus das cultivares BRS Marataoã, BR 17 - Gurguéia, BRS Itaim, BRS Cauamé e BRS Guariba foram 295,23; 255,67; 132,32; 98,14 e 89,43, respectivamente. Após a cocção, esses teores foram 405,87; 255,4; 161,71; 127,79 e 111,92, respectivamente, considerando-se grãos mais caldo. Este incremento pode ser resultado do aumento na solubilização e extração desses compostos, em virtude do

amolecimento ou rompimento das células vegetais. Concluiu-se que após o cozimento os teores dos fenólicos totais aumentaram considerando-se grãos mais caldo; as cultivares BRS Marataoã e BR 17 – Gurguéia apresentaram os maiores teores.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Cocção. Compostos bioativos.

ABSTRACT

Cowpea grain is noteworthy due to its functional properties, which are probably a result of the synergistic action of its nutrients and bioactive compounds. Since these compounds undergo the effects of thermal processing, the aim of the present study was to verify the influence of cooking on the total polyphenol content of the grain of cowpea cultivars. Samples were obtained from the experimental area of Embrapa Meio-Norte, located at 5°5' S and 42°48' W, at an altitude of 72 metres. Meal (0.5 mesh) resulting from the raw grain being ground in a cyclone rotor mill (Tecnal model TE-651/2-T), and cooked beans (with no maceration, at a bean to water ratio of 1:5 (w/v), cooked in a domestic pressure cooker (2 L) for 780 seconds) were stored in airtight containers under refrigeration (8°C) for analysis, which was carried out in triplicate. Total phenolic content was determined by spectrophotometry ($\lambda = 765$ nm), using Folin-Ciocalteu reagent. The total phenolic content, mg GAE (gallic acid equivalent)/100g, in the raw grain of the BRS Marataoã, BR 17-Gurguéia, BRS Itaim, BRS Cauamé and BRS Guariba cultivars was 295.23, 255.67, 132.32, 98.14 and 89.43 respectively. After cooking, the content was 405.87, 255.4, 161.71, 127.79 and 111.92 respectively, considering both grain and broth. This rise may have been the result of increased solubilisation and extraction of the compounds, due to the softening or rupture of the plant cells. It was concluded that, considering both grain and broth, the total phenolic content increased after cooking; the BRS Marataoã and BR 17-Gurguéia cultivars showed the highest levels.

Keywords: *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Cooking. Bioactive compounds.

INTRODUCTION

Cowpea grain (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) is an important component in the diet of developing countries in Africa, Latin America and Asia, and is a valuable source of low-cost protein. In the north and northeast of Brazil, the grain is one of the

foods which are most consumed by the low-income population who suffer from deficiency diseases such as malnutrition and micronutrient deficiency (FROTA *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2014).

Of African origin, the cowpea was introduced to Brazil in the second half of the 16th century by Portuguese settlers in the State of Bahia. The states of Ceará, Piauí, Mato Grosso, Pernambuco, Bahia and Paraíba rank as the largest producers in the country. Consumption has been spreading more intensively to the mid-west and southeast of Brazil (FREIRE FILHO *et al.*, 2011).

In addition to being a significant source of carbohydrates, proteins, vitamins, minerals and dietary fibre, bioactive compounds are found in the grain; these compounds, due to their antioxidant action, help reduce the risk of diseases such as cancer, diabetes and cardiovascular disorders (RAMÍREZ-CÁRDENAS; LEONEL; COSTA, 2008).

Phenolic compounds are chemical structures that present hydroxyl and aromatic rings which confer antioxidant ability. In simple form or as polymers, free or complexed with sugars and proteins, these compounds originate in the secondary metabolism of plants, being essential for their growth and reproduction, and are also produced under such stress conditions as infection, injury and ultraviolet radiation (UV), among others. The structural diversity of phenolic compounds is due to the great variety of combinations that occur in nature; the resulting compounds are called polyphenols, which in food are responsible for colour, astringency, aroma and oxidative stability (ANGELO; JORGE, 2007).

Data which refer to beans after thermal processing are pertinent, since this food is usually consumed when cooked. The methods of preparing beans influence the sensory quality and nutritional value of the food. As the cooked form of these legumes is the most consumed, heating allows the grains to be utilised, improving digestion, nutrient absorption and sensorial characteristics (appearance, aroma, taste and texture). In general, thermal processing affects the nutritional quality of grain, with changes seen in the levels of macronutrients, vitamins, minerals and phytochemicals (FERNANDES; CALVO; PROENÇA, 2012; TOLEDO; CANNIATTI-BRAZACA, 2008).

The aim of this study therefore, was to evaluate the effect of the domestic cooking process on the total polyphenol content of the grain of five cowpea cultivars.

MATERIAL AND METHODS

The analysis was carried out from March to December 2014 in the Food Science Laboratory (LABROMBIOQ) of the Department of Nutrition (DN), at the Centre for Health Science (CCS) on the Ministro Petrônio Portella Campus of the Federal University of Piauí - UFPI.

The cowpea samples came from the experimental area of Embrapa Meio-Norte in Teresina, in the State of Piauí, located at 5°5' S and 42°48' W, at an altitude of 72 metres. The samples were kept in sealed containers at a temperature of 8°C for analysis.

The grain from five cultivars were analysed: BRS Marataoã, BR 17-Gurguéia, BRS Itaim, BRS Cauamé and BRS Guariba.

The cowpea grain was manually selected to remove dirt and any grains that did not look to be intact. Intact grains from each cultivar were submitted to two different procedures to carry out the analysis:

- RAW GRAIN: ground in a cyclone rotor mill (Tecnal model TE-651/2-T) until a meal was obtained (0.5 mesh), that was stored in low-density polyethylene bags, 0.08 mm thick, under refrigeration at 8°C for analysis, which was carried out in triplicate.

- COOKED GRAIN: cooked with no maceration, at a bean to water ratio of 1:5 (w/v) in a 2 L domestic pressure cooker for 780 seconds from the start of a constant flow of steam through the pressure valve. The cooked grain was then separated from the broth with the aid of plastic sieves, and homogenised with a pestle and mortar for later analysis.

The cooked grain was also stored in low-density polyethylene bags of 0.08 mm thick film, and the broths stored in plastic Falcon tubes (0.05 L), both were kept under refrigeration (8°C) for analysis, which was carried out in triplicate.

The extracts were obtained following a procedure adapted from Rufino *et al.* (2007), with tests using several solvents (water, 80% acetone and ethanol), as the solubility of phenolic compounds varies according to the polarity of the solvent, the degree of polymerisation of the compounds and their interaction. However, an extractant of 50% methanol - 70% acetone - water (2:2:1) resulted in better extraction yields.

A 0.05 L Falcon tube was used to weigh 0.003 kg of the sample, with the addition of 0.01 L of 50% methanol. The sample was homogenised and extracted for

1,800 seconds with ultrasound. The sample was then centrifuged at 4000 rpm for 900 seconds, and the supernatant transferred to a 0.025 L volumetric flask.

The residue of the first extraction was taken and 0.01 L of 70% acetone was added, followed by homogenisation and extraction for 1,800 seconds with ultrasound. This was centrifuged at 4000 rpm for 900 seconds, and the supernatant transferred to the same flask. The volume was topped up using Milli-Q water.

The total phenolic content was determined by spectrophotometry, using Folin-Ciocalteu reagent (ROSSI; SINGLETON, 1965). The methodology was characterised by adding 0.002 L of deionised water to a 0.01 L volumetric flask, followed by 100 µL of the extract from the sample (deionised water was used for the blank). Subsequently, 0.0005 L of pure Folin-Ciocalteu reactant was added, while vigorously shaking to homogenise the mixture. After 30 seconds and before 480 seconds, 0.0015 L of 20% (w/v) sodium carbonate solution was incorporated into the flask. The volume in the flask (0.01 L) was topped up with deionised water, and the mixture kept in the dark for 7,200 seconds at 24°C. At the end of this time, the absorbance at a wavelength of 765 nm was measured with a spectrophotometer (BEL 1102, Monza, Milan, Italy).

The phenolic compounds were quantified by interpolating the absorbances in a previously-constructed standard curve of gallic acid, and the values expressed in mg of gallic acid equivalent per 100 g fresh weight (mg GAE/100g).

Data analysis was carried out using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 17.0 software (SPSS, 2006). The results were presented with mean value and standard deviation. By means of the One-Way ANOVA post hoc method, Tukey's test was applied at a level of 5% probability ($p < 0.05$) and a confidence level of 95% respectively, to analyse differences between the mean values for the cultivars, and between the raw grain, cooked grain and the broth (HILBE, 2013).

RESULTS AND DISCUSSION

According to Marathe *et al.*, legumes are classified according to their phenolic content, as low (<100 mg GAE/100 g), medium (100-200 mg GAE/100 g), or high (>200 mg GAE/100 g). Among the cultivars under analysis, the raw grain of BRS Marataoã and BR 17-Gurguéia showed a high total polyphenol content, followed by

the grain of BRS Itaim with a medium content, and BRS Cauamé and Guariba with a low content.

In this study, the total polyphenol content of the raw grain from the five cultivars was within the range obtained by Cai, Hettiarachchy and Jalaluddin (2003), of 34.6 to 376.6 mg/100 g⁻¹ in 17 varieties of the legume. Also in this study, the presence of phenolic acids was identified, where the major component was protocatechic acid, followed by p-hydroxybenzoic, caffeic, p-coumaric, ferulic and cinnamic acids.

After thermal processing, there was a decrease in total polyphenol content in the grain from the five cowpea cultivars, as seen by Delfini and Canniatti-Brazaca (2008) and Siddhuraju and Becker (2007) in genotypes of the cowpea and the common bean, however the presence of these compounds was found in the broth. According to Afonso (2010), Avanza *et al.* (2013) and Granito, Paolini and Pérez (2008), this transfer can be explained by the water solubility of the phenolic compounds; the literature emphasises that during maceration and cooking these are released into the water used respectively in the maceration and cooking process.

The BRS Marataoã cultivar also stood out among the cooked grains and the broths, with values of 131.59 and 274.28 mg GAE/100g respectively (Table 19); BR 17-Gurguéia displayed the second-highest levels; this can be explained by these cultivars having grains with coloured integuments.

Table 19. Total polyphenols in the grain of cowpea cultivars before and after thermal processing, and in the cooking broth.

Cultivar	Total Polyphenols (mg GAE/100g)			
	Raw Grain	Cooked Grain (CdG)	Cooking Broth (CBr)	CdG + CBr
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	
BRS Marataoã	295.23±24.80 ^a A	131.59±22.29 ^a B	274.28±21.18 ^a C	405.87
BR 17–Gurguéia	255.67±10.65 ^b A	91.74±3.26 ^b B	163.65±52.49 ^b C	255.39
BRS Itaim	132.32±11.42 ^c A	66.50±6.96 ^c B	95.21±21.84 ^c C	161.71
BRS Cauamé	98.14±9.05 ^d A	55.00±10.00 ^d B	72.79±7.14 ^d C	127.79
BRS Guariba	89.43±11.08 ^e A	48.97±8.03 ^e B	62.95±12.18 ^e C	111.92

For the same superscript letters in a row, and uppercase letters in a column, there is no significant difference between mean values at a level of 5%. Tukey's test was applied in the columns and rows.

The integument is recognisably the principal source of polyphenols in legume grain, as expected due to its protective function. In turn, coloured integuments display the highest levels. Mesquita *et al.* (2007) obtained higher levels of phenolic compounds in lines of *Phaseolus vulgaris* L. with integuments that were red, beige with brown streaks and beige with pink streaks. The line with the lowest content was "Small White", which has a white integument. According to Marathe *et al.* (2011) and Silva, Rocha and Canniatti Brazaca (2009), this variation in the levels of phenolic compounds is known to be due to genetic factors, the degree of maturity and environmental conditions.

When the total polyphenol content was determined in the broths, a high level of these compounds was found in the broth from the BRS Marataoã grain, which probably displays the highest levels due to being differentiated because of its technological and genetic characteristics.

In a study with three genotypes of the common bean, IAPAR 81, Uirapuru and BAF 55, Valdés (2010) found that the broth showed the highest mean value for total phenolic content, of 655.6 mg GAE/100 g, followed by the raw grain with 450.57 mg GAE/100g and cooked grain with a mean value of 232.43 mg GAE/100g. The higher polyphenol content of the broth may be explained by a decrease in protein-bound polyphenols as a result of the cooking process.

In the present study, it was found that after cooking, the level of phenolic compounds tends to increase when summing the content for both the cooked grains and their respective broths. In a study by Sultana, Anwar and Iqbal (2008), the total phenolic content of pea samples also increased after thermal processing (microwave cooking). The authors explain this rise by a possible increase in the solubilisation and extraction of these compounds, which results from the softening or rupture of the plant cell walls and disruption of the structure of complex phenolic compounds.

The presence of phenolic compounds in the grain of cowpea cultivars, as well as the antioxidant activity they carry out, make this legume a food that can help reduce the risk of diseases such as cancer, cardiovascular disorders, atherosclerosis and diabetes.

CONCLUSION

With the domestic cooking process, the presence of total polyphenols is found in the broth. There is an increase in the content of these phytochemicals when considering both grain and broth; after cooking, BRS Marataoã and BR 17-Gurguéia display a high phenolic content, and BRS Itaim, BRS Cauamé and BRS Guariba, a moderate content.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the National Council for Scientific and Technological Development – CNPq for their financial support (General Notice, Case no 482292/2011-3 and PQ Notice 10/2012, Case no 301939/2012-8). The authors also wish to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - CAPES for the scholarship, and the Brazilian Agricultural Research Corporation - Embrapa-Meio Norte for donating the seeds.

REFERENCES

- AFONSO, S. M. E. **Caracterização físico-química e atividade antioxidante de novas variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2010. 52 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) – Escola Superior – Bragança, 2010.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.
- AVANZA, M.; ACEVEDO, B.; CHAVES, M.; AÑÓN, M. Nutritional and anti-nutritional components of four cowpea varieties under thermal treatments: principal component analysis. **LWT – Food Science and Technology**. v. 51, p. 148-157, 2013.
- CAI, R.; HETTIARACHCHY, N. S.; JALALUDDIN, M. High-performance liquid chromatography determination of phenolic constituents in 17 varieties of cowpeas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, n. 6, p. 1623-1627, 2003.
- DELFINI, R. A.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Polyphenols and their interaction with digestibility and cooking time in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.4, p.401-407, 2008.

FERNANDES, A. C.; CALVO, M. C. M.; PROENÇA, R. P. C. Técnicas de pré-preparo de feijões em unidades produtoras de refeições das regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Revista de Nutrição**, vol. 25, n. 2, p. 259-269, 2012.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 81 p.

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

GRANITO, M.; PAOLINI, M.; PÉREZ. Polyphenols and antioxidant capacity of *Phaseolus vulgaris* stored under extreme conditions and processed. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 994-999, 2008.

HILBE, J. **Methods of Statistical Model Estimation**. Chapman & Hall/CRC Press, Boca Rato. ISBN 978-1-4398-5802-8, 2013.

MARATHE, S. A.; RAJALAKSHMI, V.; JAMDAR, S. N.; SHARMA, A. Comparative study on antioxidant activity of different varieties of commonly consumed legumes in India. **Food and Chemical Toxicology**. v. 49, n. 9, p. 2005–2012, 2011.

MESQUITA, F. R.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; LIMA, R. A. Z.; ABREU, A. F. B. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1114-1121, 2007.

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 & Nutrition Research**. v. 58, p. 20694, 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.

ROSSI, J. A.; SINGLETON, V. L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 20, n. 2, p. 144-158, 1965.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2007. 4p. (Comunicado Técnico, nº 127).

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. **Food Chemistry**. v. 101, p. 10-19, 2007.

SILVA, A. G., ROCHA, L. C., CANNIATTI BRAZACA, S. G. Caracterização físico-química, digestibilidade protéica e atividade antioxidante de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 4, p. 591-598, 2009.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; IQBAL, S. Effect of different cooking methods on the antioxidant activity of some vegetables from Pakistan. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 43, p. 560-567, 2008.

SPSS, **Statistical Package for the Social Sciences – SPSS**, versão 17.0, 2006.

TOLEDO, T. C. F.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Avaliação química e nutricional do feijão carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) cozido por diferentes métodos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 355-360, 2008.

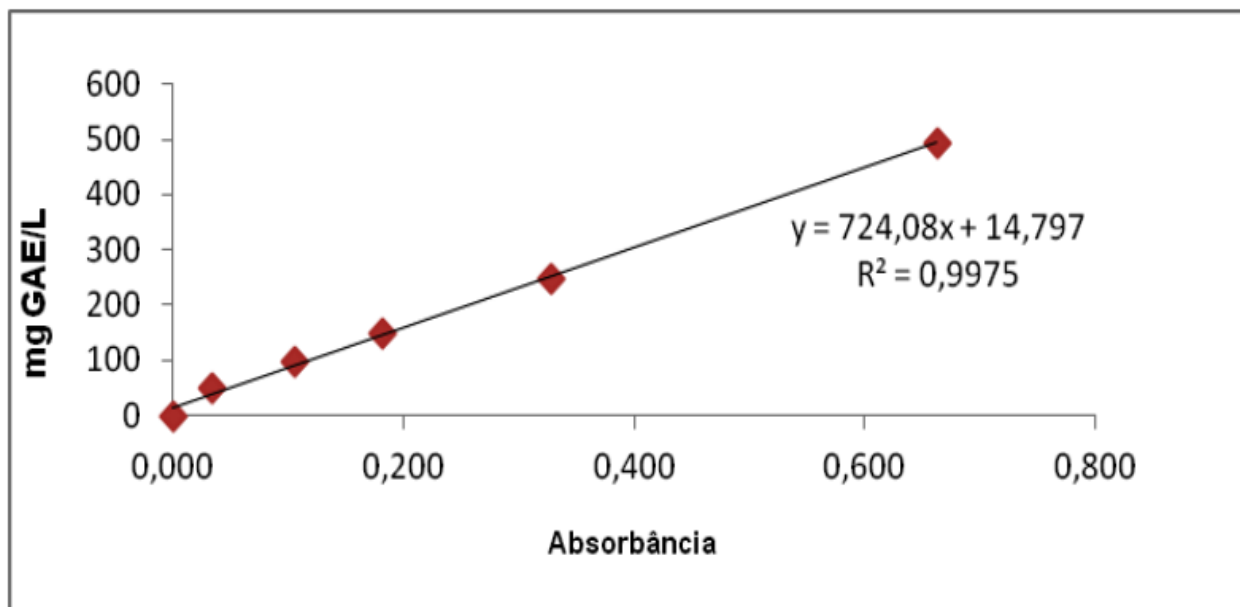
VALDÉS, S. T. **O efeito de genótipos de feijão e das formas usuais de preparo sobre a atividade antioxidante e a composição nutricional**. 2010. 101 f.

Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, 2010.

APÊNDICES

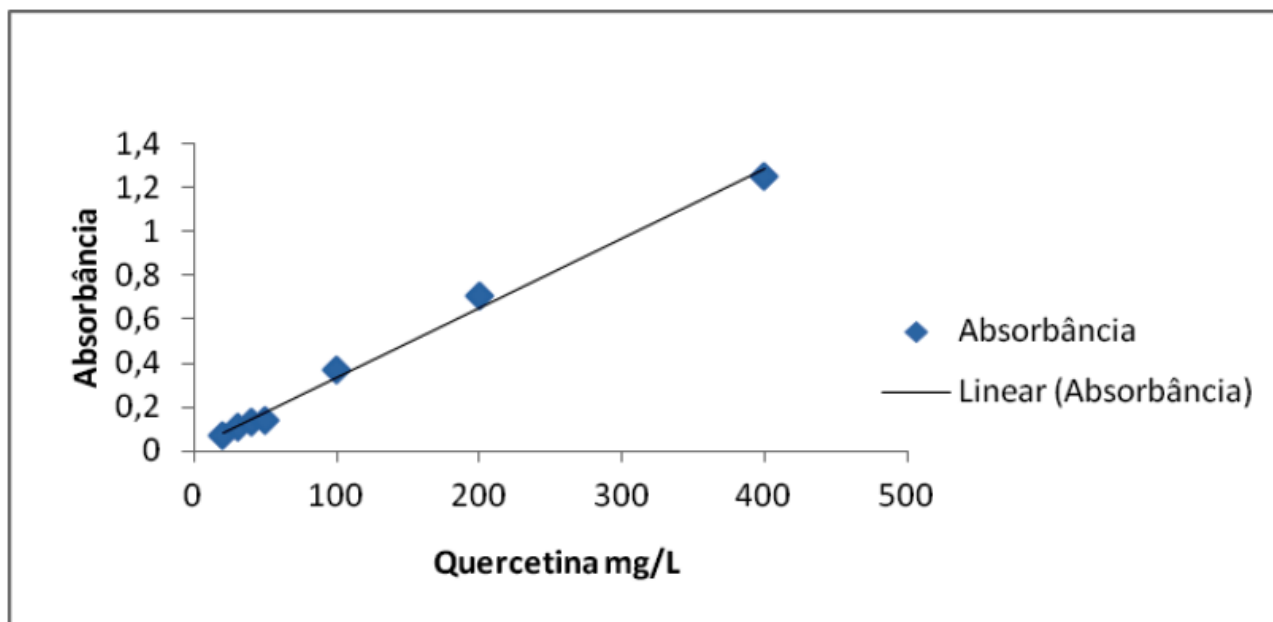
APÊNDICE 1

Curva padrão de ácido gálico para determinação dos compostos fenólicos totais.



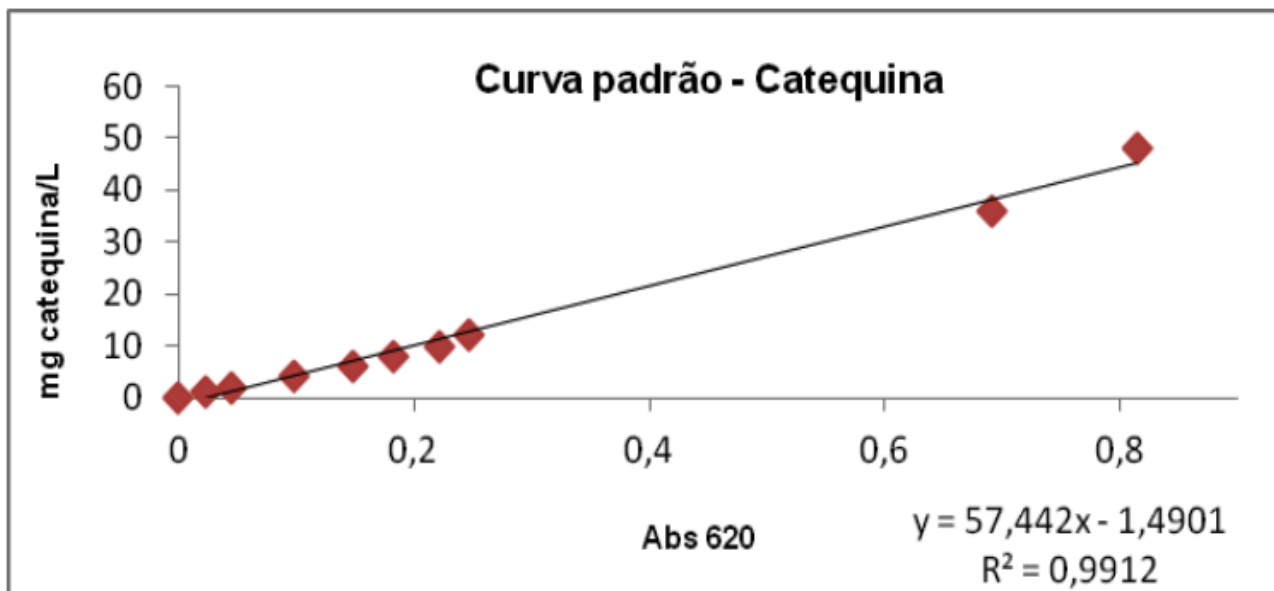
APÊNDICE 2

Curva padrão de quercetina para determinação de flavonóides totais.



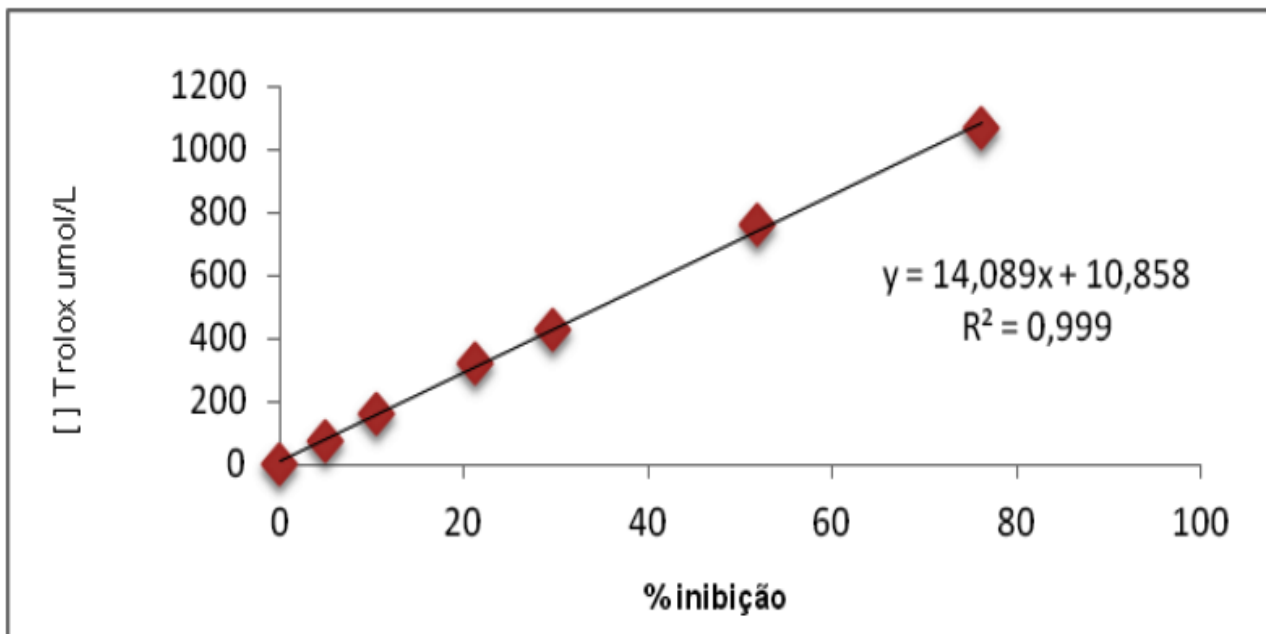
APÊNDICE 3

Curva padrão de catequina para determinação de taninos condensados.



APÊNDICE 4

Curva padrão de Trolox utilizada na análise da capacidade antioxidante pelo método DPPH.



APÊNDICE 5

Curva padrão de Trolox utilizada na análise da capacidade antioxidante pelo método ABTS.

