



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



**AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DE Cu, Fe E Zn EM
FEIJÃO - FAVA (*Phaseolus lunatus* L.)**

Marluce Miranda Amarante dos Santos

Dissertação de Mestrado

Teresina – PI

2016

Marluce Miranda Amarante dos Santos

**AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DE Cu, Fe E Zn EM
FEIJÃO - FAVA (*Phaseolus lunatus* L.)**

Dissertação de mestrado apresentada à
Universidade Federal do Piauí como parte dos
requisitos necessários à obtenção do título de
mestre em Química (Química Analítica).

Prof. Dr. Edivan Carvalho Vieira

Orientador

Teresina – PI

2016

Marluce Miranda Amarante dos Santos

**AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DE Cu, Fe E Zn EM
FEIJÃO - FAVA (*Phaseolus lunatus* L.)**

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal do Piauí
como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em
Química (Química Analítica).

Aprovada em 30.06.2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edivan Carvalho Vieira
Universidade Federal do Piauí
Orientador

Prof. Dr. Herbert de Sousa Barbosa
Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Marcos Yassuo Kamogawa
Universidade de São Paulo - ESALQ

Prof. Dr. Benedito Batista Farias Filho
Universidade Federal do Piauí (Suplente)

Dedico á Deus, ao meu esposo Ednardo Luiz, ao meu filho Emanuel Miranda, à minha mãe Maria Rosa e todos os meus amigos e irmãos que contribuíram para meu crescimento profissional e particular.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu SENHOR e SALVADOR, que me proporcionou sonhar e realizar meu sonho.

Ao meu esposo Ednardo Luiz pelo incentivo, pela compreensão, amor e dedicação e ao meu amado filho Emanuel Amarante por ter me ensinado o amor incondicional.

À minha mãe, Maria Rosa de Miranda, por confiar em mim e por investir na minha formação desde o tempo da educação básica.

Ao meu orientador, prof. Dr. Edivan Carvalho Vieira por ter aceitado o desafio de me orientar e por ser tão compreensivo. E por me incentivar a busca pelo conhecimento.

Ao Prof. Dr. Herbert de Sousa Barbosa, que participou da minha formação, obrigada pela amizade e parceria.

A profa. Dra. Naise Mary Caldas Silva pela ajuda e colaboração, mostrando-me o valor da mulher científica.

Ao prof. Dr. Jardes Figurêdo do Rêgo pela valorosa contribuição, incentivo e amizade.

Ao prof. Dr. Benedito Batista Farias Filho pela contribuição durante o exame de qualificação, mostrando-me a melhorar o trabalho.

Ao prof. Dr. Marcos Yassuo Kamogawa por aceitar avaliar o trabalho aqui apresentado.

Aos meus amigos da pós-graduação: Cleane Paz, Milton Falcão, Douglas Sousa, Patrícia Pitombeira, Laíse Macedo, Antônio Filho, Emannuel Sousa, Joaldo Lopes, Ronaldo Borges, Ronaldo Júnior, Lucivânia Santos, Nielson Furtado e Jéssica Sara pelos momentos de alegria, angústias e motivação.

Aos meus amigos do GRIAPA: Dino José, Tomas Magno, Gilmar Dias, Maria, Tiago Linus, Mikael Alburquerque, Ana Kledna, Raíza Lorena, Mônica Neres, Antoniel (Maranhão), Darlisson, Angélica Brito, Juracir Brito, Milton Thélío, Janny Kelly, Thábata Laís, Melquíades, Bárbara e Francislene pelos momentos de aprendizado.

A todos os professores do Departamento de Química e do Programa de Pós-Graduação em Química, em especial, ao prof. Dr. Welter Cantanhêde, a Profa. Dra. Luciana Nobre pela sua valorosa contribuição na minha formação como educadora e aos professores Prof. Sebastião Barros e a Profa. Dra. Graziella Ciaramella pelo apoio e incentivo.

A UESPI/GERATEC pela disponibilização do espectrômetro de absorção atômica.

Ao CNPQ, a CAPES e a FAPEPI pelo apoio financeiro.

Obrigada a todos que contribuíram para chegar até aqui.

*“Não to mandei eu? Esforça-te, e tem bom ânimo; não temas, nem te espantes;
porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares.”*

Josué 1:9

RESUMO

Dos Santos, M.M. A. **Avaliação da biodisponibilidade de Cu, Fe e Zn em feijão - fava (*Phaseolus lunatus* L.)**. 65f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós- Graduação em Química. Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

O feijão - fava é uma fonte de renda alternativa e alimento para a população nordestina, além de ser a segunda leguminosa do gênero *Phaseolus* de importância econômica. Informações sobre a distribuição dos elementos nos alimentos é importante e necessária para estimar absorção de elementos essenciais e para avaliar os potenciais riscos à saúde, causados pela exposição a elementos tóxicos. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a biodisponibilidade de Cu, Fe e Zn em seis amostras de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) produzidos no estado do Piauí nas formas *in natura* e cozida por espectrometria de absorção atômica com atomização em chama. As amostras *in natura* e cozida foram inicialmente moídas e digeridas em microondas com cavidade utilizando 4 mL HNO₃ e 2 mL H₂O₂. Os teores totais encontrados para as amostras *in natura* apresentaram variação de cobre, ferro e zinco respectivamente de 2,43 - 4,30 mg kg⁻¹, de 31,61 - 47,03 mg kg⁻¹ e de 17,60 - 29,30 mg kg⁻¹ e no feijão-fava cozido de 2,94 - 3,68 mg kg⁻¹, de 21,85 - 38,40 mg kg⁻¹ e de 16,50 - 22,18 mg kg⁻¹. Para avaliação da biodisponibilidade dos minerais foi empregado procedimento *in vitro*, utilizando a simulação gastrointestinal e foram obtidas a biodisponibilidade em termos de porcentagem. A biodisponibilidade de ferro encontradas em amostras de feijão-fava cozido foram de 0,57 a 1,17% e para o zinco de 6,88 a 8,89%. Não foi possível realizar a avaliação do cobre biodisponível em amostras de feijão - fava pela técnica utilizada, pois as concentrações de cobre no feijão - fava apresentaram valores baixos de limites de detecção (0,0034 mg L⁻¹) para o método proposto.

Palavras chave: feijão - fava, metais, biodisponibilidade.

ABSTRACT

Dos Santos, M. M. A. **Avaliação da biodisponibilidade de Cu, Fe e Zn em feijão - fava (*Phaseolus lunatus* L.)**. 65f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós- Graduação em Química. Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

The lima bean is an alternative source of income and food for the Northeastern population, and is the second of the legume *Phaseolus* genus of economic importance. Information on the distribution of elements in food is important and necessary to estimate absorption of essential elements and to assess the health risks potential caused by toxic elements. This study aimed to evaluate the bioavailability of Cu, Fe and Zn in six lima bean samples (*Phaseolus lunatus* L.) produced in the state of Piauí in the forms in nature and cooked by atomic absorption spectrometry in flame. Samples raw and cooked were initially milled and digested in microwave cavity using 4 mL HNO₃ and 2 ml H₂O₂. The total contents found for the fresh samples showed variation copper, iron and zinc respectively 2.43 to 4.30 mg kg⁻¹, 31.61 to 47.03 mg kg⁻¹ and 17.60 to 29 , 30 mg kg⁻¹ and baked lima bean from 2.94 to 3.68 mg kg⁻¹, 21.85 to 38.40 mg kg⁻¹ and 16.50 to 22.18 mg kg⁻¹ . To evaluate the bioavailability of the metals was used in vitro procedure using the gastrointestinal simulation and were obtained bioavailability in terms of percentage. The bioavailability of iron found in samples cooked beans were 0.57 to 1.17% zinc and 6.88 to 8.89%. It was not possible to assess the bioavailable copper in lima bean samples by the technique used because the copper concentrations in the lima beans had low detection limits (0.0055 mg L⁻¹) for the proposed method.

Keywords: lima bean, metals, bioavailability.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

1. Processo de liberação do cianeto por enzima autócnas.....23

LISTA DE TABELAS

1- Áreas plantada e colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção de feijão – fava	21
2- Ingestão Diária Recomendada (IDR) para crianças e adultos.....	25
3 - Conteúdo de cobre em alimentos.....	26
4 - Conteúdo de ferro em alimentos.....	28
5 - Conteúdo de zinco em alimentos.....	29
6 - Programa de aquecimento em forno de microondas com cavidade com taxa de pressão: 0,5 bar s ⁻¹ , infravermelho: 240 °C, potência:1400 W.....	41
7 - Concentração de Cu, Fe e Zn em material certificado Apple Leaves (NIST 1515) após digestão total (n = 3).....	43
8 - Figuras de mérito de calibração para determinação dos teores totais de Cu, Fe e Zn para as amostras de feijão – fava <i>in natura</i>	45
9 - Figuras de mérito de calibração para determinação dos teores totais de Cu, Fe e Zn para as amostras de feijão – fava cozido.....	45
10 – Teores totais de Cu, Fe e Zn (em mg kg ⁻¹) em feijão – fava <i>in natura</i> e cozido.....	46
11 – Teores totais de Cu, Fe e Zn para fontes alimentares de origem vegetal.....	49
12 - Parâmetros utilizados na análise dos minerais em solução resultante da simulação do processo de digestão gastrointestinal.....	50
13 - Biodisponibilidade (%) de ferro e zinco em feijão – fava (<i>Phaseolus lunatus</i>) (n=3).....	51

LISTA DE ESQUEMAS

1- Instrumentação básica da técnica de absorção atômica.....	34
--	----

LISTA DE EQUAÇÕES

1 – Equação para cálculo da percentagem da biodisponibilidade do elemento (E) dialisado.....	42
2 – Limite de Detecção	44
3 – Limite de Quantificação.....	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFS	Espectrometria de Fluorescência atômica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
F AAS	Flame Atomic Absorption Spectrometry
GERATEC	Núcleo Interinstitucional de Estudo e Geração de Novas Tecnologias
GF AAS	Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry
ICP OES	Inductively Coupled Plasma - Optical Emission
IDR	Ingestão Diária Recomendada
INAA	Instrumental Neutron Activation Analysis
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
OMS	Organização Mundial de Saúde
PFA	Perfluoroalcóxido
UESPI	Universidade Estadual do Piauí
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
3.1 Feijão - fava.....	20
3.2 Metais essenciais para o metabolismo humano.....	24
3.2.1 O Cobre	25
3.4.2 O Ferro	26
3.4.4 O Zinco	28
3.3 Biodisponibilidade	29
3.4 Fatores que afetam a biodisponibilidade de metais.....	31
3.5 Técnicas empregadas para determinação de metais.....	33
4. PARTE EXPERIMENTAL	37
4.1 Instrumentação.....	37
4.2 Reagentes	38
4.3 Amostragem	38
4.3.1 Preparo de Amostras	39
4.4 Avaliação da biodisponibilidade dos metais	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
5.1 Avaliação do procedimento de preparo de amostras	43
5.2 Teores totais das amostras de feijão - fava	44
5.3 Avaliação da biodisponibilidade	50

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 55

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 56

1. INTRODUÇÃO

Depois do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), o feijão – fava (*Phaseolus lunatus* L.) é a segunda leguminosa de maior importância do gênero e largamente distribuída e cultivada por todo o mundo, principalmente em regiões tropicais (MAQUET; VEKEMANS; BALDOIN, 1999).

É considerada uma cultura de subsistência nos trópicos úmidos da América, constituindo uma importante fonte de proteína para populações rurais do Sul da América e África (LIOI et al., 1998). Essa leguminosa fornece em média 1,3% de gordura, 4% de cinza, 22% de proteínas, apresentando bom valor biológico, alto conteúdo de lisina e alta digestibilidade (GRANITO; TORRES, 2007).

O feijão – fava tem significativa importância econômica no Piauí, onde seu consumo está relacionado à fácil condução de seu cultivo e poucos gastos para sua produção. A cultura do feijão - fava no estado do Piauí apresenta-se como cultura de subsistência, especialmente para aqueles que trabalham no segmento da agricultura familiar (CEPRO, 2013).

Os metais estão presentes em muitos alimentos que são consumidos pela população e são nutrientes indispensáveis para o bom funcionamento do organismo humano e sua carência pode provocar diversos problemas à saúde (FENNEMA, 2000).

Apesar da intensa redução da desnutrição em crianças, as deficiências de micronutrientes ainda prevalecem em grupos vulneráveis da população, como crianças e mulheres (BRASIL, 2014). A carência ou excesso de minerais podem provocar prejuízos à saúde, como a anemia que é uma doença causada pela falta de ferro.

O estudo da interação da dieta alimentar e dos elementos traço possui um problema particular para os cientistas, pois muitos desses elementos não são efetivamente absorvidos pelo organismo (FAIRWEATHER – TAIT, 1992).

Em relação à segurança alimentar é importante mencionar que nem todos os compostos ingeridos são eficazmente utilizados pelo organismo humano, tendo em conta que durante o processo de digestão os compostos

são submetidos a processos de biotransformação, ou seja, são convertidos a compostos que serão utilizados pelo organismo (PEIXOTO; MAZOM; CADORE, 2013).

Partindo desse ponto de vista, o termo biodisponibilidade é definido como a proporção do nutriente que pode ser utilizada para funções fisiológicas normais (EKMEKCIOGLU, 2002).

A escolha da técnica para este tipo de estudo depende do nível do elemento a ser determinado, o que requer frequentemente a utilização de técnicas analíticas que detecta elementos com baixos limites de detecção (PEIXOTO; MAZOM; CADORE, 2013).

As técnicas analíticas mais utilizadas para avaliar a biodisponibilidade de metais reportadas na literatura são a Espectrometria de Absorção Atômica com atomização em chama (FAAS) e em forno de grafite (GF AAS) como o utilizados por CÁMARA et al. (2005) para avaliar a bioacessibilidade de minerais em alimentos escolares, e a técnica de Espectrometria de Emissão óptico com plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES) como fora utilizado por LIMA et al, 2015 ao realizarem estudo de bioacessibilidade *in vitro* de suco e fibra de caju.

Outras técnicas analíticas são utilizadas como a Análise Instrumental de Ativação de Nêutrons (INAA) utilizadas por KULKARNI et al. (2007) para avaliar a biodisponibilidade de elementos essenciais nos cotilédone de trigo e a espectrometria de Fluorescência Atômica (AFS) para determinação da bioacessibilidade de Se e Hg em amostras de peixes, utilizando geração de hidreto para quantificação do Se e para quantificação do Hg, o vapor de mercúrio, ambos, acoplados com sistema de injeção em fluxo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar os teores totais de cobre, ferro e zinco e avaliar a biodisponibilidade desses minerais em amostras de feijão-fava (*Phaseolus lunatus L.*) produzidas nos municípios no estado do Piauí.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliação comparativa dos teores totais de cobre, ferro e zinco em feijão-fava *in natura* e cozido por Espectrometria de Absorção Atômica em atomização em Chama;
- ✓ Avaliar a biodisponibilidade de cobre, ferro e zinco em feijão-fava cozido através de procedimento simulado do processo gastrointestinal.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Feijão – fava

Estudos mostraram que as leguminosas são excelentes fontes de energia, proteínas, fibras alimentares, carboidratos, vitaminas e minerais. Os feijões são comuns na alimentação brasileira e juntamente com o arroz fornecem um adequado balanço de aminoácidos. (BARRUETO – GONZALEZ, 2008)

O feijão - fava (*Phaseolus lunatus* L.), que dependendo da região de cultivo, pode apresentar outros nomes como fava-lima, feijoal, bongue, mangalô-amargo, fava-belém, fava-terra, feijão-espadinho, feijão-farinha, feijão-fígado-de-galinha ou feijão-favona (LOPES et al., 2010).

O feijão - fava pode ser utilizado tanto na alimentação humana como animal, na cobertura para proteção do solo contra erosão devido às intensas chuvas e como adubo verde. O consumo pela população, alvo dessa dissertação, é realizado na forma de grãos verdes e secos e de vagens verdes cozidos (VIEIRA, 1992).

O feijão- fava é uma fonte de renda alternativa e alimento para a população nordestina, além de ser a segunda leguminosa do gênero *Phaseolus* de importância econômica, perdendo somente para o feijão comum (ALVES et al., 2008).

Os estados da região nordeste produziram 7 416 toneladas das 7 680 toneladas de feijão - fava produzidos em todo território brasileiro em 2014, o que corresponde a quase 97% da produção anual brasileira (IBGE, 2014).

Segundo o IBGE, no ano de 2014, os dois maiores estados produtores de feijão - fava em grãos no Brasil são os estados do Ceará e da Paraíba com uma produção de 3 116 e 2 181 toneladas de grãos produzidas nesse ano, respectivamente.

A tabela 1 apresenta dados referentes à produção do feijão-fava em grãos no ano de 2014 como a quantidade produzida e a área plantada.

Tabela 1 - Área plantada e colhida, quantidade produzida, rendimento médio da produção do feijão – fava no ano de 2014 em diferentes estados brasileiros.

	Área plantada (ha)	Área colhida (ha)	Quant. Produzida (t)	Rend. Médio (kg ha ⁻¹)
Brasil	24 651	21 591	7 680	356
Nordeste	23 697	20 931	7 416	354
MA	360	360	117	324
PI	2 055	1 775	616	347
CE	8 041	8 022	3 116	388
RN	1 755	848	433	511
PB	9 197	7 649	2 181	285
PE	1 910	1 904	787	413
AL	169	164	75	457
SE	210	209	91	435
MG	915	621	162	261
RS	39	39	102	2 65

Fonte: IBGE, 2014.

Quando se compara a produção de feijão – fava (*Phaseolus lunatus*) com a produção do feijão – comum (*Phaseolus vulgaris*), observa-se uma significativa diferença, uma vez que foi produzido 7 680 toneladas de feijão-fava frente a uma produção de 3 294 586 toneladas de feijão comum (IBGE, 2014).

Essa baixa produção feijão - fava quando comparada ao feijão comum ocorre principalmente devido à tradição do consumo de feijões tipo carioca, ao seu sabor diferenciado, ao tempo de cocção mais longo e a forma como ela é produzida, geralmente advinda de pequenos produtores que plantam este tipo de feijão consorciado com outras culturas (LYMMAN, 1983).

Na plantação consorciada o feijão – fava é plantado concomitante a outras culturas como mandioca, milho e mamona que servem como suporte para este tipo de feijoeiro possa desenvolver-se (DE AZEVEDO; FRANCO; ARAÚJO, 2003).

SANTOS (2002) relata que a falta de emprego de tecnologia que tenha como finalidade o aumento da produção do feijão – fava é outro fator para a baixa produção no Brasil.

O feijão - fava tem sua relativa importância social, devido a sua rusticidade, tendo sua colheita prolongada e realizada em período seco. É uma leguminosa tropical caracterizada por elevada diversidade genética e se adapta as mais diversas condições climáticas, mas desenvolve-se melhor em climas quentes e úmidos (MAQUET et al., 1999).

As sementes apresentam grande variedade de tamanho e cor do tegumento (SANTOS, 2002).

O tegumento pode ser branco, verde, cinza, amarelo a marrom, róseo, vermelho, púrpuro, preto ou manchado e sarapintado (VIEIRA, 1992).

O consumidor nordestino possui preferência pelo feijão - fava com tegumento branco (DE AZEVEDO; FRANCO; ARAÚJO, 2003).

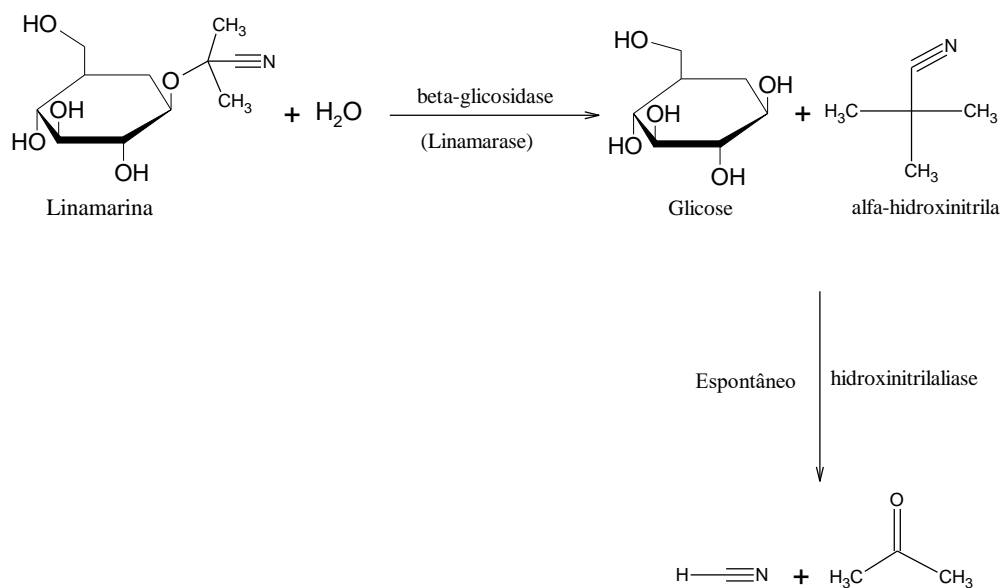
Dentre todas as leguminosas, o feijão - fava é a única que produz HCN em quantidades elevadas caracterizado pelo sabor amargo das suas sementes (DE AZEVEDO; FRANCO; ARAÚJO, 2003).

O HCN liberado na hidrólise do glicogênio cianogênico possui grande afinidade pela forma heme-férrica da citocromo - oxidase, formando complexo estável de ciano - citocromo- oxidase, deixando o ferro em estado trivalente, interrompendo o transporte de elétrons ao longo da cadeia respiratória

paralisando-a e o indivíduo vem a óbito. (AMORIM; MEDEIROS; RIET - CORREA 2006)

Na figura 1 pode-se observar a formação do HCN responsável pelo sabor característico do feijão - fava e pelo potencial tóxico.

Figura 1 - Processo de liberação do cianeto por enzimas autóctones



Fonte: Adaptado de AMORIM; MEDEIROS; RIET - CORREA (2006) (Desenhado no programa ChemSketch*)

O teor de HCN pode variar, uma vez que, a concentração de glicosídeos cianogênico dependem do clima, de condições que influenciam o crescimento da planta como adubação nitrogenada, deficiência de água e a idade da planta, quanto mais jovem for a planta maior a concentração de glicosídeos cianogênicos. (AMORIM; MEDEIROS; RIET – CORREA, 2006).

A dose letal para 50% de ocorrência (DL_{50}) de HCN em alimentos aceita pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é de 10 mg Kg^{-1} (CHISTÉ et al., 2010).

No trabalho desenvolvido por DE AZEVEDO; FRANCO; ARAÚJO (2003) ao estudar a composição química de sete variedades de feijão - fava observou

que a faixa de concentração de HCN para as amostras analisadas foram de 3 - 8 mg Kg⁻¹.

Para minimizar o potencial tóxico alguns cuidados devem ser realizados como deixar os grãos de milho uma noite anterior à cocção ou trocar a água durante o processo de cocção com substituição total da mesma cerca de três a cinco vezes (DE AZEVED; FRANCO; ARAÚJO, 2003).

3.2 Metais essenciais para o metabolismo humano

A alimentação é a principal fonte de acesso aos nutrientes essenciais para o metabolismo humano que participam de diversos processos biológicos e o excesso ou a escassez podem comprometer a saúde dos seres humanos (FENNEMA, 2000).

Os metais atuam de diversas maneiras, como na formação de tecidos rígidos do corpo (Ca, P, F, Mg, etc), como cofatores de enzimas (Mn, Cu, Zn, Na, etc), como integrantes de vitaminas, mioglobina e hemoglobina (Fe, Co, I, etc), no controle da pressão osmótica de fluidos celulares e do pH (Na, K, Cl, etc). (BAUDI DERGAL, 2006).

A deficiência de nutrientes traz prejuízos sociais, uma vez que, a desnutrição afeta o aprendizado das crianças, diminui o rendimento de adultos trabalhadores, aumenta a taxa de mortalidade e conseqüentemente eleva os gastos com saúde, diminuindo assim o desenvolvimento econômico do país e o potencial humano (WELCH, 2004).

Informações sobre a distribuição dos metais nos alimentos é importante e necessária para estimar absorção de elementos essenciais e para avaliar os potenciais riscos à saúde causados pela exposição a elementos tóxicos (KANNAMKUMARATHET al., 2004).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a Ingestão Diária Recomendada (IDR) para adultos e crianças dos elementos cobre, ferro e zinco são mostrados na tabela 2:

Tabela 2 - Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Cu, Fe e Zn para crianças e adultos

Elemento	IDR (crianças de 4- 6 anos)	IDR (crianças de 7-10 anos)	IDR (adultos)
Cu	440 µg	440µg	900µg
Fe	6mg	9mg	14mg
Zn	5,1mg	5,6mg	7mg

Fonte: ANVISA, 2005.

3.2.1 O Cobre

O cobre é um elemento essencial encontrado em todos os seres humanos nos estados de oxidação Cu^{+2} e na forma reduzida Cu^{+1} e é importante cofator catalítico na reação redox de enzimas de proteínas que realizam funções fundamentais para o desenvolvimento e crescimento (TAPIERO, 2003).

A deficiência ou o excesso de cobre no homem pode ser evidenciado através de duas patologias, a síndrome de Menkes, na qual há um defeito na absorção intestinal de cobre que realiza a captura de cobre de forma defeituosa provocando deficiência funcional grave de cobre na corrente sanguínea e a doença de Wilson em que há um defeito na excreção de cobre pela bile, levando a um excesso de cobre pelos tecidos (COZZOLINO, 2012).

O cobre participa do metabolismo do esqueleto, do sistema imunológico e na redução do risco de doenças cardiovasculares. Diferente dos outros metais, as patologias decorrentes a deficiência de cobre são menos frequentes

e foi identificado em bebês prematuros, crianças desnutridas e pessoas que apresentam uma dieta pobre em cobre (CORDANO, 1998; MENEZES, 2010).

As principais fontes de cobre quando se trata de alimentação são fígado sementes, grãos, feijões, nozes, mariscos e peixe (TAPIEIRO, 2003). O conteúdo de cobre em alimentos em principais fontes alimentares está disposta na tabela 3.

Tabela 3 - Conteúdo de cobre em alimentos

Alimento	Cobre (mg/100g)
Fígado de boi	4,50
Feijão – preto cozido	0,21
Ervilha seca cozida	0,18
Arroz integral cozido	0,10
Arroz Branco cozido	0,06

Fonte: Adaptado de COZZOLINO, 2012.

3.2.2 O Ferro

O ferro tem funções enzimáticas e metabólicas importantes no organismo, ele é considerado um elemento vital para a homeostase celular, pois é essencial para o transporte de oxigênio, para a síntese do DNA e metabolismo energético (GROTTO, 2008).

Ele atua como um cofator enzimático da cadeia respiratória e nos mamíferos é utilizado na síntese da hemoglobina nos eritrócitos e da mioglobina nos músculos e dos citocromos do fígado (GROTTO, 2008).

A anemia ferropriva, a anemia por deficiência de ferro é uma das mais simples e persistentes doença do mundo, chegando a ser 95% dos casos de

anemia e ocorre com mais frequência em crianças em países em desenvolvimento, como no Brasil que apresenta essa doença como um problema de saúde pública (BURIOLA, 2010).

No mundo, 85% das crianças em idade escolar, 81,3% das mulheres não grávidas, 83,2% das mulheres grávidas e 81,5% das mulheres em idade reprodutiva estão anêmicas (WHO, 2011).

Os sinais clínicos da anemia reportados na literatura são a redução da capacidade de trabalho, cansaço persistente, respiração curta, dores de cabeça, tontura, apatia e irritabilidade. (COZZOLINO, 2012).

Há dois tipos de ferro nos alimentos: o heme presente em alimentos de origem animal e o não –heme presente em alimentos de origem vegetal e animal. O ferro não – heme presente em alimentos de origem vegetal como o feijão – fava, sofre maior interação com outros nutrientes presentes na dieta que podem aumentar ou diminuir a sua absorção (BURIOLA, 2010).

Para potencializar a absorção do ferro não –heme recomenda-se a ingestão de ácido ascórbico, pois o ácido ascórbico mantém o ferro no estado de oxidação +2 , mais solúvel no trato gastrointestinal (ANTUNES; SGARBIERI, 1980; PETRY, 2014).

O ferro total presente na alimentação humana, em geral encontra-se em maiores concentrações que as recomendações diárias necessárias para suprir as necessidades metabólicas do organismo dos seres humanos desse mineral e a anemia é decorrente da baixa biodisponibilidade de ferro nos alimentos, principalmente nos alimentos de origem vegetal (BIANCHI; SILVA; DUTRA, 1992).

Alimentos como espinafre, ostras, fígado, ervilhas, carnes e legumes são os alimentos que possuem as maiores densidades de ferro (mg kcal^{-1}) (COZZOLINO, 2012).

O conteúdo de ferro em alguns alimentos consumidos pela população se encontra na tabela 4:

Tabela 4 - Conteúdo de ferro em alimentos

Alimento	Ferro (mg 100g⁻¹)
Fígado de boi	6,30
Ervilha verde cozida	1,65
Arroz Branco	1,00
Arroz integral cozido	0,41
Broto de feijão cozido	0,65

Fonte: Adaptado de COZZOLINO, 2012.

3.2.3 O Zinco

O segundo metal mais abundante no corpo humano é o zinco. Ele possui três funções essenciais no organismo: estrutural, pois determina a forma e a disposição espacial de enzimas e proteínas; enzimática, pois muitas enzimas necessitam de zinco para realização da ação catalítica e reguladora, uma vez que, o zinco é necessário para a síntese de proteínas, replicação dos ácidos nucleicos, divisão celular, na ação da insulina e hormônios como os que atuam na tireoide, suprarrenal e testículos (COZZOLINO, 2012).

O conteúdo total de zinco no corpo humano varia de 1,5g a 2,5g, concentrando-se principalmente nos ossos, músculos, fígado e na pele. (MAFRA; COZZOLINO, 2004).

A deficiência de zinco afeta o crescimento e o desenvolvimento intelectual e há uma relação com alterações de atenção ou de comportamento, disfunção imunológica e distúrbios na área sexual do indivíduo como

impotência e atraso na maturação sexual (MESÍAS; SEIQUER; NAVARRO, 2012; PRASAD, 2014).

As principais fontes alimentares de zinco são as ostras, o camarão, carnes bovina, de frango, de peixe, fígado, gérmen de trigo, grãos integrais, castanhas, cereais e legumes (COZZOLINO, 2012). Na tabela 5 pode-se observar o conteúdo de zinco em alguns alimentos.

Tabela 5 – Conteúdo de zinco em alimentos

Alimento	Zinco (mg 100g⁻¹)
Ostras	39,0
Feijão cozido	1,42
Feijão - preto cozido	1,17
Arroz integral	0,61
Arroz Branco cozido	0,49

Fonte: Adaptado de COZZOLINO, 2012.

3.3 Biodisponibilidade

Para que os minerais sejam utilizados pelo organismo é preciso que eles estejam disponíveis para absorção. Desse ponto de vista, o termo biodisponibilidade pode ser definido como a proporção do nutriente que é digerido e utilizado para funções normais do corpo, ou estocado para ser utilizado posteriormente (FAIRWEATHER – TAIT, 1992).

A biodisponibilidade do nutriente depende não somente da absorção do nutriente, mas também da conversão a sua forma biologicamente ativa, assim, os nutrientes devem ser transformados em moléculas mais simples por meio do processo de digestão e possam ser absorvidos pelo corpo (NASCIMENTO; NAOZUKA; OLIVEIRA, 2010).

A biodisponibilidade inclui também na sua definição a utilização de nutriente e incluem a digestão gastrointestinal, a absorção, o metabolismo, a distribuição através dos tecidos e a bioatividade (COZZOLINO, 2012).

A avaliação da biodisponibilidade podem ser realizada na formas *in vivo* e *in vitro*. Os métodos *in vivo*, em geral, utilizam seres humanos ou animais de pequeno porte, entretanto essas técnicas esbarram em algumas dificuldades como o alto custo relativo, requerem um maior tempo para a sua execução e por questões éticas são limitados (COZZOLINO, 2012; PEIXOTO; MAZON; CADORE, 2013).

Como as técnicas *in vivo* apresentam limitações, pode-se utilizar técnicas *in vitro* que oferecem uma alternativa atraente, pois são realizadas de forma simples, rápida e de baixo custo quando comparados com os testes *in vivo*. O maior desafio desta técnica é simular o mais próximo possível as condições reais em laboratório (MILLER et al., 1981; PEIXOTO; MAZON; CADORE, 2013).

As técnicas *in vitro* baseiam - se principalmente na digestão de alimentos homogeneizados num sistema fechado e a determinação do nutriente solúvel, na digestão *in vitro* e diálise de nutrientes através de uma membrana semipermeável ou na utilização de células Caco-2 e realizar a medida da incorporação celular do nutriente após a realização do procedimento de diálise (EKMEKCIOGLU, 2002).

3.4 Fatores que afetam a biodisponibilidade dos metais

Alguns fatores podem interferir aumentando ou diminuindo a biodisponibilidade de metais como a especiação, ligação molecular, a quantidade ingerida, a matriz alimentar, atenuadores da absorção e bioconversão, estado nutricional, fatores genéticos, fatores relacionados aos indivíduos, interações com outros minerais e vitaminas (COZZOLINO, 2005).

Estudos mostram que as leguminosas são excelentes fontes de fibras, carboidratos complexos, proteínas, vitaminas e minerais. Entretanto, as leguminosas contêm substâncias que podem interferir na absorção desses nutrientes como a presença de fibras, fitatos, oligossacarídeos e polifenóis (BARRUETO – GONZALEZ, 2008).

As fibras presentes leguminosas formam ligações com íons polivalentes diminuindo a biodisponibilidade de minerais (RAMIREZ – CARDENAS; LEONEL; COSTA, 2008).

Estudos *in vitro* mostraram que fibras solúveis em detergentes neutros e ácidos tem alta capacidade de se ligarem a minerais bivalentes, diminuindo a biodisponibilidade na sequência $Cu > Zn \gg Fe$ (BARRUETO – GONZALEZ, 2008).

Os fitatos são uma classe complexa de compostos que ocorrem de forma natural na fase de maturação das sementes e grãos de cereais na sua maioria na forma de fosfato, e encontra-se estruturalmente integrado a proteínas e minerais na forma de complexos destes (SILVA; SILVA, 1999).

Alguns fatores como pH, concentração e a presença de outros minerais influenciam na ligação do fitato com o mineral. Quando o pH está abaixo do pH normal do sistema gastrointestinal, o ácido fítico complexa o Fe^{3+} e em pH médios e altos, o ácido fítico forma complexos insolúveis com minerais, reduzindo a biodisponibilidade destes (SILVA; SILVA, 1999).

Em pH 7,4 os fitatos formam complexos com metais na seguinte ordem : $Cu^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+} > Fe^{2+} > Ca^{2+}$ (OBERLEA, 1973)

Geralmente os cátions divalentes como cálcio, zinco, ferro e cobre formam com o ácido fítico sais insolúveis penta e hexa substituídos e complexos insolúveis de cálcio – fitato podem contribuir para a redução da biodisponibilidade de outros minerais presentes na dieta, como o zinco que podem se ligar ao complexo cálcio – fitato e formar compostos menos solúveis. (SILVA; SILVA, 1999)

No feijão - fava os níveis de fitatos variam de 0,71 a 1,15% no cotilédone, enquanto que na casca variam de 0,06 a 0,2% do total de ácido fítico (BARRUETO –GONZALEZ, 2008).

Os fitatos reduzem a biodisponibilidade dos minerais, principalmente do ferro não – heme, zinco, cálcio e magnésio formando complexos insolúveis, diminuindo a concentração desses elementos para a absorção destes pelo organismo (BARRUETO –GONZALEZ, 2008).

MECHI; CANIATTI – BRAZACA; ARTHUR (2005) observaram que o teor de fitatos em feijão preto cru apresentou teor de $8,02 \pm 0,0 \text{ mg g}^{-1}$ e em feijão cozido o teor de fitatos foi de $9,64 \pm 0,2 \text{ mg g}^{-1}$.

Os polifenóis estão localizados nas leguminosas no tegumento e podem influenciar na coloração das sementes, bem como no aroma e no valor nutricional (SALUNKE et al., 1992)

Os polifenóis de leguminosas e cereais são predominantemente taninos de origem flavonoide. Os taninos fazem parte de um grupo de flavonoides capazes de precipitar e complexar proteínas e há evidências de que os taninos agem de forma negativa na absorção de ferro, diminuindo sua disponibilidade (SILVA; SILVA, 1999)

3.5 Técnicas empregadas para determinação de metais

Muitas técnicas têm sido utilizadas para a determinação de metais e para a determinação da biodisponibilidade de metais em alimentos. A escolha da técnica analítica empregada vai depender de alguns fatores como o preparo da amostra, os limites de detecção das técnicas disponíveis, da precisão e exatidão do método utilizado (CADOIRE; MATOSO; SANTOS, 2008).

As principais técnicas utilizadas para determinação de metais baseiam-se nos fenômenos de absorção e emissão atômica, dentre elas a espectrometria de absorção atômica com atomização em chama – FAAS (do inglês Flame Atomic Absorption Spectrometry), com atomização eletrotérmica, especialmente em forno de grafite – GF AAS (do inglês Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry) e a espectrometria de emissão óptica em plasma com acoplamento indutivo (ICP OES, do inglês Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry) são técnicas já consolidadas e rotineiramente utilizadas em laboratórios de pesquisa (CADOIRES; MATOSO; SANTOS, 2008).

A espectrometria de absorção atômica é considerada uma técnica bem sucedida e uma das mais utilizadas para a determinação de elementos presentes em baixas concentrações de diferentes tipos de amostras. A técnica baseia-se na radiação eletromagnética que pode ser absorvida pelos átomos dos elementos que constituem a amostra. (AMORIM et al.,2008)

Um átomo possui vários níveis de energia e a maioria dos átomos encontram-se no estado fundamental. Ao absorver a energia radiante, o átomo que inicialmente estava no estado fundamental para um estado de maior energia e a intensidade de luz que sai dos elementos químicos na amostra são reduzidos e essa quantidade pela qual ela é diminuída é proporcional ao número de átomos que foram absorvidos (EBDON, 1998).

Essa relação é evidenciada através da lei de Lambert – Beer, que relaciona a absorção à concentração dos átomos livres presentes no caminho óptico (HARRIS, 2013).

Cada elemento químico apresenta seu conjunto de níveis de energia característico apresentando um único espectro de absorção e de emissão. A lei

de Lambert - Beer que relaciona a absorção e a concentração são expressas pela relação $A = abc$, onde A é a absorvância, a é uma constante de proporcionalidade chamada de absortividade, b é o caminho óptico e c é a concentração do analito presente na amostra (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Quanto à instrumentação, a técnica de absorção atômica possui componentes básicos como é mostrado no esquema 1.

Esquema 1 – Instrumentação básica da técnica de absorção atômica



FONTE: Autoria própria.

Durante o processo de absorção atômica a fonte de radiação emite energia no comprimento de onda característico que é absorvido pelos átomos da amostra no estado fundamental que são produzidas durante a atomização. Quando o elemento absorve a energia, os átomos passam do estado fundamental para um estado de maior energia (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Como os métodos de absorção atômica são muito seletivos devido as linhas estreitas e as energias de transição serem únicas para cada elemento as lâmpadas utilizadas como fonte de radiação utilizam-se geralmente lâmpadas monocromáticas, ou seja, para cada elemento é necessário a utilização de uma lâmpada do elemento que se deseja realizar a quantificação (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Dentre os tipos de lâmpadas monocromáticas a mais utilizada é a lâmpada de catodo oco e as lâmpadas de descargas sem eletrodos. As lâmpadas de catodo oco são lâmpadas de descargas gasosas que utilizam a emissão característica do elemento a ser analisado (HARRIS, 2013).

Enquanto, que as lâmpadas de descargas sem eletrodos fornecem intensidades radiantes geralmente uma ou duas ordens de magnitude maiores que as lâmpadas de catodo oco (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

No atomizador a amostra é atomizada, ou seja, os constituintes de uma amostra são convertidos em átomos gasosos. A precisão e a exatidão

dependem da etapa de atomização e do processo de introdução da amostra. Os atomizadores mais comuns são a chama, aquecimento eletrotérmico em forno de grafite, geração de hidretos e geração de vapor de mercúrio (HARRIS, 2013; (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Um problema encontrado é a forma de introdução da amostra, pois o sistema de introdução de amostras é geralmente realizado com soluções e quando as amostras são sólidas e de material refratários é necessário que a amostra seja convertida para a forma de solução através da etapa de preparo de amostras (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

A amostra é nebulizada por um fluxo de oxidante gasoso, misturada com um combustível e levada à chama, onde ocorre a atomização. Os processos que ocorrem durante a atomização por chama como o utilizado neste estudo são: a) dessolvatação – onde o solvente evapora produzindo um aerossol molecular de partículas sólidas finamente divididas; b) Volatilização – o aerossol é volatilizado formando moléculas gasosas; c) Dissociação – a maior parte das moléculas produz um gás atômico e alguns átomos desse gás se ioniza formando cátions e elétrons (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Outras moléculas e átomos são produzidos na chama formados devido à interação destes com a mistura oxidante. A mistura oxidante normalmente utilizada é a mistura de ar/acetileno. Quando é necessário chamas mais quentes, faz-se uso de óxido nitroso/acetileno (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Uma das desvantagens desta técnica é que somente 5% da amostra nebulizada chega à chama para ser atomizada, porque o aerossol formado pelo fluxo do oxidante é misturado com o combustível e passa por uma série de defletores que removem todas as gotículas da solução exceto as mais finas e esses defletores fazem com que a maior parte da amostra seja coletada no fundo da câmara de mistura, onde é drenada para um recipiente de descarte (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

No sistema óptico, o comprimento de onda de interesse é isolado pelo monocromador e é conduzido até o detector, uma célula fotomultiplicadora que tem sinal elétrico proporcional ao número de fótons e a corrente elétrica dependente da intensidade da luz e posteriormente, é amplificada e

processada e convertida para unidades de concentração da amostra em interesse (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentação

Para a realização do procedimento de preparo de amostras foi utilizado o liofilizador LIOTOP L101, moinho criogênico (Marconi, MA 075), forno micro-ondas com cavidade equipado com um rotor de 48 frascos de PFA (Politetrafluoretileno – Perfluoroalcóxido) e com sensor de temperatura e pressão interno e externo (Multiwave 3000, Anton Par) e uma balança analítica (Denver Instrument APX – 200). Para a realização do procedimento de biodisponibilidade foi utilizado o pHmetro (MS Tecnopon Instrumentação) e banho termostático (Quimis).

Para a realização das análises foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica de absorção atômica com atomização em chama (SHUIMADZU AA- 7000 series, Japão) equipado com lâmpada de deutério como corretor de fundo, autoamostrador ASC e lâmpadas de cátodo oco dos elementos Cu, Fe e Zn com seus respectivos comprimentos de 324,8 nm, 248,3 nm e 213,9 nm.

Os parâmetros utilizados na determinação dos teores totais de cobre, ferro e zinco foram as recomendadas pelo fabricante do espectrômetro de absorção atômica utilizado. A mistura oxidante utilizada durante o processo de atomização foi acetileno/ar. A vazão do acetileno respectivamente para os três elementos utilizados foram de 1,8; 2,2 e 2,0 (L h⁻¹), respectivamente e de ar foram de 15,0 L h⁻¹ nas análises de cobre, ferro e zinco.

3.2 Reagentes

Todos os materiais utilizados na realização do trabalho foram descontaminados em banho de HNO_3 10% (v/v) por no mínimo 24h. Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água ultrapura (resistividade de 18,2 $\text{M}\Omega$ cm) obtida em sistema de purificação de água ultrapura purificada em sistema Milli-Q (Millipore, EUA). Ácido nítrico 65% (v/v) e peróxido de hidrogênio 30% ambos da Merck foram utilizados como agentes oxidantes durante o processo de digestão ácida das amostras.

Para a construção da curva de calibração foram utilizados soluções estoques individuais de 1000 mg L^{-1} de Cu, Fe e Zn em meio de HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$. A curva de calibração para análise dos elementos para o ensaio de bioacessibilidade foi realizado em meio de NaHCO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Para a simulação gastrointestinal foram utilizadas as enzimas pancreatina, pepsina e sais biliares (Sigma Aldrich, EUA), membranas de diálise (Cial, Brasil) de 10 a 12 kDa, bem como NaHCO_3 (Sigma, EUA), HCl (Merck) e NaOH (Vetec, Brasil).

As membranas de diálise foram condicionadas de acordo com as recomendações do fabricante: limpeza com água ultrapura por 3h para remoção do glicerol e para a remoção de compostos de enxofre foi utilizado solução de sulfeto de sódio 0,3% (m v^{-1}) a 80°C por 1 min, sendo enxaguadas por 2 min com água a 60°C e posteriormente acidificadas com solução de H_2SO_4 0,2% (m v^{-1}) e novamente enxaguadas com água a 80°C para remoção do ácido.

3.3 Amostragem

Seis amostras de feijão-fava foram adquiridas em municípios do estado do Piauí. A amostra denominada P01- variedade branca, foi cultivada no município de União, P02 – variedade rajada, comprada no mercado municipal de Teresina e produzida no município de São Pedro, as amostras denominadas P03 – de variedade preta, P04 – variedade branca, P05 – variedade rajada e P06 – variedade vermelha foram produzidas no município de Monsenhor Gil. As análises foram realizadas em triplicata garantindo assim maior confiabilidade nos resultados.

3.4 Preparo de amostras

Foram adquiridas aproximadamente 500 g de cada amostra, estas foram divididas em dois grupos: o primeiro grupo são os feijões - fava na forma *in natura* que após seleção manual foram lavadas e secas a temperatura ambiente.

Posteriormente foram maceradas com auxílio de nitrogênio líquido para diminuir o tamanho das sementes e facilitar a liofilização, com a finalidade de preservar as sementes de feijão-fava e evitar assim, a proliferação de fungos ou outros agentes que possam deteriorar as amostras.

O segundo grupo (cerca de 250 gramas) foi submetido ao processo de cocção onde se procedeu da seguinte maneira: as sementes de feijão – fava foram lavadas e cozidas por 10 minutos, realizando a substituição total da água utilizada por três vezes a cada 10 minutos de fervura para remoção da toxidade das sementes de fava e na quarta substituição de água realizou-se a cocção por 30 minutos em panela de pressão de alumínio com capacidade para 5,0L.

A quantidade de água utilizada nas substituições foi de 600 mL e para o quarto cozimento foi utilizado 1000 mL de água deionizada.

Decorridos 30 minutos do cozimento em panela de pressão, retirou-se amostras de feijão - fava cozido e acondicionou as mesmas em recipientes adequados, tanto o feijão como o caldo.

Após a etapa de cocção, as amostras *in natura* e cozida foram liofilizadas. Sendo inicialmente congeladas durante 24h e liofilizadas por 72h.

Como uma pequena quantidade de amostra é utilizada é fundamental que o material moído apresente distribuição homogênea de tamanho de partículas para isto foi realizado a moagem em moinho criogênico.

O programa utilizado no moinho criogênico é descrito a seguir: frequência de 16 Hz, tempo de duração total de 10 minutos, intercalados entre congelamento com duração de 2 minutos e moagem com duração de 1 minuto.

Para a determinação dos teores totais dos minerais presentes em amostras de tecido vegetal, como os grãos de feijão - fava deve-se promover a oxidação da matéria orgânica.

Para a realização da digestão ácida foram pesadas em triplicata massas de 200 mg de feijão - fava *in natura*, feijão- fava cozido e do material de referência certificado Apple Leaves (NIST 1515) utilizando como mistura oxidante 4 mL de ácido nítrico e 2 mL de peróxido de hidrogênio. Os brancos analíticos foram submetidos ao mesmo programa de aquecimento e a adição dos mesmos volumes da mistura oxidante que as amostras e o material de referência certificado.

A mistura oxidante foi submetida à digestão ácida em forno micro - ondas com cavidade em frascos fechados utilizando o programa de digestão que se encontra disposto na tabela 6:

Tabela 6 - Programa de aquecimento em forno de microondas com cavidade com taxa de pressão: $0,5 \text{ bar s}^{-1}$, infravermelho: $240 \text{ }^\circ\text{C}$, potência: 1400 W .

Etapas	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Rampa (min)	Tempo de permanência (min)	Ventilação
1	80	07:00	05:00	1
2	120	05:00	05:00	1
3	180	08:00	15:00	1
4	0	-	20:00	3

Fonte: Dados da Pesquisa.

Após a digestão das amostras, dos brancos analíticos e do material de referência certificado as soluções foram transferidas para tubos falcon de 15 mL e diluídas para um volume de 10 mL com água ultrapura e analisadas por FAAS.

3.6 Avaliação de biodisponibilidade dos metais

A biodisponibilidade dos minerais em feijão - fava cozido foi realizada de acordo com o procedimento *in vitro* proposto por MILLER et al (1981) foi realizada com pepsina -HCl durante a fase gástrica e sais biliares durante a fase intestinal.

A solução de pepsina - HCl foi preparada realizando a dissolução de 16g de pepsina em 100 mL de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A solução que simula a fase intestinal foi preparada pela dissolução de 0,5g de pancreatina e de 3,13g de extrato de bile em 125 mL de NaHCO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Para realização do procedimento de diálise, pesou-se 20 g de cada amostra de feijão-fava homogeneizadas em liquidificador e solubilizou-a com 100 mL de HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, em seguida o pH foi ajustado para 2 com solução de HCl 2 mol L^{-1} .

Adicionou-se 3,2 mL da solução de pepsina, agitou-se em banho termostático á 37°C por 2 horas com agitação, obtendo o digerido da pepsina (essa etapa ocorre à simulação da digestão estomacal).

Pesou-se 20 g em quadruplicata dos digeridos da pepsina, sendo um deles utilizados para a titulação com NaOH 0,5 mol L⁻¹ até obter pH 7,5 e os outros três para a etapa de diálise.

Para o procedimento de titulação, 5 mL de solução de pancreatina e sais biliares foram adicionadas ao digerido da pepsina de cada amostra e em seguida titulados com NaOH 0,5 mol L⁻¹.

Este procedimento de titulação foi realizado para encontrar o volume de NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹ a ser utilizado nos sacos de diálise.

Adicionou-se o volume de NaHCO₃ 0,1 mol L⁻¹ resultante da titulação no saco de diálise e foi acrescentada água até o volume de 25 mL.

Para cada amostra o volume de bicarbonato de sódio adicionado nos sacos de diálise é diferenciado, uma vez que ocorre variação de pH nas diferentes amostras.

Agitaram-se os sacos de diálise por 30 minutos em banho termostático. Após esse tempo foi adicionado 5 mL de solução de pancreatina e sais biliares e a diálise ocorreu em banho termostático a 37°C por 2h, sendo recolhido o material dialisado e acondicionado em refrigerador doméstico até o momento da análise. A biodisponibilidade para as amostras foi expressas em termos de porcentagem dos elementos dialisado e calculadas de acordo com a equação 1.

Equação 1 - Equação para cálculo da porcentagem da biodisponibilidade do elemento (E) dialisado

$$E\% = \frac{mg\ E\ biodisponível\ x\ mL\ dialisado\ (25\ mL)}{mg\ E\ total\ x\ massa\ inicial\ da\ amostra}$$

Fonte: Adaptado de MILLER et al, (1981).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação do procedimento de preparo de amostra

É no preparo de amostras, ou simplesmente, durante a abertura da amostra que ela é convertida a uma forma mais viável para ser analisada. Como fora mencionado anteriormente, a maioria dos espectrômetros de absorção atômica utiliza amostras na forma de soluções, por isso é submetida a um tratamento adequado que vise à sua preparação para a determinação dos analitos de interesse (KRUG, 2008).

Idealmente, um procedimento de digestão deve apresentar simplicidade, rapidez, utilizar pequenas quantidades de ácido, permitir a dissolução de grande número de amostras e produzir resultados exatos e precisos (ARRUDA, SANTELLI, 1997).

Para avaliar a exatidão do procedimento de preparo de amostras, foi utilizado material de referência certificado Apple Leaves (NIST 1515). Pode-se observar que os valores encontrados estão em concordância com os valores certificados, considerando o teste t-Student, a um nível de confiança de 95%.

Tabela 7- Concentração de Cu, Fe e Zn em material certificado Apple Leaves (NIST 1515) após digestão total (n = 3)

Elemento	Certificado (mg Kg ⁻¹)	Encontrado (mg Kg ⁻¹)	Recuperação %
Cu	5,64±0,24	4,65±0,11	82,4
Fe	83±5,00	88,7±0,37	106,9
Zn	12,5±0,3	12,8±0,15	102,4

Fonte: Dados da pesquisa.

4.1 Teores totais de Cu, Fe e Zn em amostras de feijão - fava

Os parâmetros obtidos para as curvas de calibração dos elementos estudados por FAAS foram: faixa linear, coeficiente de correlação e limite de detecção e limite de quantificação.

Para determinar os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram realizadas 10 medidas do sinal analítico do branco da amostra e os limites foram calculados a partir das equações 2 e 3 respectivamente:

$$LD = 3. \frac{S_{br}}{a} \quad (\text{Equação 2})$$

$$LD = 10. \frac{S_{br}}{a} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

S_{br} = desvio padrão do sinal do branco

a = inclinação da curva analítica.

As faixas lineares para a determinação dos teores totais do feijão- fava *in natura* e cozido foram: Cu – 0 a 0,8 mg L⁻¹, Fe – 0 a 2 mg L⁻¹ e Zn – 0 à 1 mg L⁻¹.

Analisando a tabela 8, observou-se boas respostas nas faixas de trabalho escolhidas para os três elementos estudados e os coeficientes de correlação linear apresentaram valores satisfatórios baseados nos valores determinados pelo Inmetro de 0,9 e pela ANVISA de 0,99.

As figuras de mérito de calibração para as determinações dos teores totais nas amostras *in natura* são mostradas na tabela 8 e na tabela 9 as figuras de mérito para as amostras cozidas.

Tabela 8 - Figuras de mérito de calibração para determinação dos teores totais de Cu, Fe e Zn para as amostras de feijão – fava *in natura*

Mineral	Curva Analítica	r	LD	LQ
Cu	0,104x + 0,0003	0,9993	0,012 ^a	0,0404 ^a
Fe	0,0707x – 1x10 ⁻⁴	0,9993	0,0138 ^a	0,0464 ^a
Zn	0,5302x + 0,0027	0,9999	0,0094 ^a	0,0313 ^a

^a LOD, LOQ em mg L⁻¹ determinados por FAAS.

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 9 - Figuras de mérito de calibração para determinação dos teores totais de Cu, Fe e Zn para as amostras de feijão – fava cozido

Mineral	Curva Analítica	r	LD	LQ
Cu	0,1794x + 0,0001	0,9994	0,0055 ^a	0,01832 ^a
Fe	0,1102x – 0,0016	0,9994	0,1407 ^a	0,4692 ^a
Zn	0,7068x + 0,0033	0,9990	0,0056 ^a	0,0186 ^a

^a LD, LQ em mg L⁻¹ determinados por FAAS.

Fonte: Dados da pesquisa

O método é considerado preciso e exato quando apresenta uma resposta diretamente proporcional à concentração do mineral na amostra dentro do intervalo estabelecido (ANVISA, 2003).

Os teores totais de cobre, ferro e zinco em feijão - fava *in natura* e cozido expressos em mg Kg⁻¹ são mostradas na tabela 10.

Tabela 10 – Teores totais de cobre, ferro e zinco (em mg Kg⁻¹) em feijão – fava *in natura* e cozido (n = 3)

Amostra	Cu		Fe		Zn	
	<i>In natura</i>	Cozido	<i>In natura</i>	Cozido	<i>In natura</i>	Cozido
P1	4,30±0,34	3,20±0,16	42,13±1,88	30,21±1,01	26,01±0,97	20,70±0,61
P2	2,50±0,17	2,94±0,03	31,61±2,06	21,85±2,25	29,30±0,16	22,18±1,11
P3	4,11±0,22	3,07±0,02	40,47±1,46	38,40±2,11	22,77±0,78	21,70±0,78
P4	3,60±0,41	3,68±0,38	38,13±2,26	31,90±0,83	20,81±1,35	19,71±1,35
P5	3,54±0,51	3,35±0,13	37,03±1,25	32,50±1,25	17,60±0,70	16,50±0,70
P6	3,57±0,15	3,53±0,63	47,03±1,57	36,85±2,04	18,47±0,35	17,38±0,35

Fonte: Dados da pesquisa.

As concentrações de cobre no feijão – fava *in natura* variaram de 2,50 a 4,30 mg L⁻¹ enquanto que no feijão – fava cozido a variação foi 2,94 a 3,86 mg L⁻¹.

Quando submetidas ao processo de cocção as amostras apresentaram perdas de cobre, com exceção das amostras P2 que apresentou uma elevação na concentração de cobre, possivelmente ocasionado por alguma contaminação.

O feijão fradinho estudado por FERREIRA et al (2014) apresentou a concentração de 3,1±1,8 mg kg⁻¹ e 3,4±0,2 para o feijão cozido, enquanto que para o feijão comum cru 9,6±2,6 mg kg⁻¹ e de 9,8±1,2 mg kg⁻¹ para o feijão cozido. No feijão –fava em estudo, o teor de cobre foi condizente com o repostado por eles quando comparado com o feijão fradinho e inferior ao feijão comum estudado por eles.

Durante o processo de cocção, as formas de transferência de calor, a temperatura que a cocção é realizada, a duração do processo e o meio de cocção são fatores responsáveis pelas alterações químicas e físicas que podem modificar o valor nutricional do alimento (ROSA et al., 2006)

Foi observada a diminuição da concentração de ferro quando comparada as amostras *in natura* as amostras cozidas, com exceção da amostra P3, que se encontra dentro da faixa significativa dos teores das amostras *in natura* e cozida .

As concentrações de ferro nas amostras *in natura* variaram de 31,61 a 47,03 mg L⁻¹ e nas amostras cozida variaram de 21,85 a 38,50 mg L⁻¹ e as maiores perdas foram observadas nas amostras P01(28,29%) e P02(30,88%).

Essa perda de ferro em alimentos é reportado como os realizados por FERREIRA et al.(2014) que verificaram perda nos feijões rajado, bolinha e comum. Já para os feijões jalo, fradinho, rosinha e preto o processo de cocção ocasionou uma elevação da concentração de ferro nesses tipos de feijões.

Em geral, o cozimento reduz os fatores antinutricionais e reduzem os teores de minerais, vitaminas e proteínas (RAMIRÉZ – CARDENAS; LEONEL; COSTA, 2008).

Assim como ocorreram perdas nas concentrações de ferro quando as amostras foram cozidas também houve perdas nas concentrações de zinco nas amostras P1, P2 e P6, nas demais amostras os valores são significativamente semelhantes.

A variação da concentração de zinco nas amostras *in natura* foram de 17,60 a 29,30 mg L⁻¹ e de 17,38 a 20,70 mg L⁻¹ para as amostras cozidas .

BRIGITE; CANNIATTI – BRAZACA (2011) afirmam que os teores de cálcio, ferro, magnésio e zinco apresentaram diminuição após o processo de cocção devido à dissolução dos minerais na água de maceração/ cocção, entretanto um aumento do teor de cobre para o feijão cozido foi observado por eles.

RAMIREZ – CARDENAS; LEONEL; COSTA (2008) observaram que os teores de ferro e cobre quando submetidos ao cozimento com e sem maceração tiveram uma diminuição da concentração desses nutrientes, com exceção para o feijão talismã que elevaram seu teor de cobre quando foram cozidos.

AKINYELE; SHOKUNBI (2015) ao investigarem as concentrações das concentrações de elementos metálicos em alimentos produzidos na Nigéria com a finalidade de estimar as doses diárias desses elementos em adultos,

relata que as concentrações de Cu, Fe e Zn são de respectivamente, $7,24 \pm 0,04 \text{ mg kg}^{-1}$, $48,75 \pm 0,43$ e $36,15 \pm 0,24$ e em feijão comum.

Quando comparado o feijão comum cru estudado por AKINYELE; SHOKUNBI (2015) ao feijão – fava, as concentrações de cobre e zinco no feijão comum foram superiores ao do feijão – fava, enquanto que há semelhanças nas concentrações de ferro entre as duas espécies pertencentes ao mesmo gênero, *Phaseolus*.

SANTOS et al. (2008) ao otimizarem um procedimento rápido e de baixo custo para digestão ácida e determinação de elementos metálicos por ICP OES em feijão comum dos tipo branco, preto, carioca, caupi e guandu encontraram valores de concentrações de Cu, Fe e Zn em $\mu\text{g g}^{-1}$ na faixa de e $4,37 - 17,9$; $40,6 - 50,6$ e de $28,9 - 37,1$, respectivamente.

Foi observado neste estudo que o feijão - fava possui concentrações de ferro e zinco próximas do feijão comum e que o feijão comum é uma fonte mais rica em cobre do que o feijão- fava.

Como os elementos químicos advindos de alimentos de origem animal e vegetal são provenientes de produtos do campo, que por sua vez, dependem de praticas agrícolas, da genética, do solo, do uso de fertilizantes, pesticidas e da água utilizada durante o processo de produção do alimento ocorrem variações de nutrientes para uma mesma espécie (BAUDI DERGAL, 2006).

Na tabela 11 mostra o teor total de Cu, Fe e Zn reportados para outras fontes vegetais como leguminosas e cereais.

Tabela 11 – Teores totais de Cu, Fe e Zn para fontes alimentares de origem vegetal *in natura*

Alimento	Cu (mg Kg⁻¹)	Fe (mg Kg⁻¹)	Zn (mg Kg⁻¹)	Autor
Feijão- fava	2,50 – 4,30	31,61 – 47,03	17,60 -29,30	DOS SANTOS, M.M.A
Feijão – fava	-	119,80	41,80	GRANITO; BRITO; TORRES, 2007
Feijão comum	3,10 – 14,00	56,00 - 87,00	33,00 – 58,00	FERREIRA et al., 2014
Feijão comum	7,24	48,75	36,15	
Soja	9,83	61,58	33,44	AKINYELE; SHOKUNBI (2015)
Trigo	3,64	30,75	22,74	
Castanha de caju	19,10	53,50	-	NASCIMENTO et al., 2010
Arroz	2,34-3,41	3,30-14,27	9,26-16,40	PINHEIRO et al., 2014
Milho	2,70	100,08	35,06	DEMIRKIRAN et al., 2009

Os teores totais de ferro e zinco determinados em feijão – fava realizados neste trabalho são inferiores aos reportados por GRANITO; BRITO; TORRES (2007). E quando comparados aos teores totais do feijão comum descritos na tabela 11 com o feijão – fava, observam-se teores superiores para o feijão comum, entretanto, o feijão – fava possui um fonte potencial de Cu, Fe e Zn.

4.3 Avaliação da biodisponibilidade

Embora alguns estudos, realizam a simulação do processo de digestão envolvendo três etapas: simulando o processo digestivo que ocorre na boca, estômago e intestino com a presença de substâncias químicas e enzimáticas presentes nos sucos digestivos incluindo substâncias inorgânicas e orgânicas.

O procedimento realizado para avaliar a biodisponibilidade dos minerais nesse estudo simulam o processo de digestão gastrointestinal, utilizando enzimas utilizadas na digestão estomacal e intestinal.

As figuras de mérito de calibração para determinação dos nutrientes dialisáveis para o ensaio de bioacessibilidade de feijão – fava cozido resultante do processo de diálise simulada são mostradas na tabela 12:

Tabela 12 – Parâmetros utilizados na análise dos minerais em solução resultante da simulação do processo de digestão gastrointestinal

Mineral	Curva Analítica	r	LD	LQ
Cu	$0,1327x + 0,0152$	0,9923	0,0034 ^a	0,01134 ^a
Fe	$0,1234x - 0,0050$	0,9993	0,0250 ^a	0,0830 ^a
Zn	$0,5874x + 0,0865$	0,9951	0,0117 ^a	0,2646 ^a

^a LD, LQ em mg L⁻¹ determinados por FAAS.

Fonte: Dados da pesquisa

Os teores de cobre na solução resultante da simulação do processo de diálise encontraram - se abaixo dos limites de detecção e de quantificação para a técnica utilizada.

A alternativa encontrada para solucionar essa problemática seria a realização das medidas através da técnica analítica de espectrometria de

absorção com atomização em forno de grafite, entretanto, a quantificação foi impossibilitada devido a problemas no equipamento.

Há um decréscimo na biodisponibilidade de cobre devido à formação de compostos de produtos da reação de Maillard e no excesso de zinco que competem pela mesma proteína na mucosa intestinal, ocasionando um aumento na retenção de cobre, impedindo que o cobre seja transportado pelo plasma (COZZOLINO, 2012).

As frações biodisponíveis para os elementos ferro e zinco foram quantificadas por FAAS são mostradas na tabela 13.

Tabela 13 - Frações biodisponíveis (%) de ferro e zinco em feijão – fava (*Phaseolus lunatus* L.) (n=3).

Amostra	Fe(%)	Zn (%)
P01	0,80±0,16	8,23±0,16
P02	1,17±0,03	7,48±0,83
P03	1,11±0,02	6,88±0,35
P04	0,57±0,08	7,84±0,38
P05	0,94±0,09	8,89±0,63
P06	1,08±0,06	8,92±0,43

Fonte: Dados da Pesquisa.

A baixa absorção do ferro pelo organismo ocorrem devido a alguns fatores como a variações no estado de oxidação do mineral, da ligação do mineral com outro componente do alimento, bem como as mudanças de pH do conteúdo gastrointestinal, fatores antinutricionais como as fibras, o ácido oxálico, o ácido fítico, polifenóis e oligossacarídeos (BARRUETO – GONZALES, 2008)

Os alimentos de origem vegetal geralmente apresentam baixa biodisponibilidade de ferro, uma vez que, em alimentos de origem vegetal, como as leguminosas, o ferro encontra-se na forma não-heme que sofre maiores interações com os demais nutrientes presentes nos alimentos e diminuem a absorção desse nutriente pelo organismo (BURIOLA et al., 2010).

As frações bioacessíveis de ferro presentes nas amostras cozidas variam de 0,80 a 1,17% e de zinco de 6,88% e de 8,92%.

HEMALATHA, PLATEL E SRINIVASAN (2007) ao investigarem a influência do processamento térmico sobre a biodisponibilidade do zinco e ferro a partir de cereais e leguminosas consumidas na Índia relataram que a bioacessibilidade de ferro em feijão caupi cru e cozidos sob pressão foram de 1,77 e 3,98% e de zinco 33,4 e 41,5%.

Pode-se observar que o ferro biodisponível no feijão caupi estudado por HEMALATHA, PLATEL E SRINIVASAN (2007) apresentam semelhança entre a biodisponibilidade do ferro do feijão – fava e encontra-se condizente com este estudo, porém a diferem com a biodisponibilidade de zinco. O feijão caupi apresentou uma maior biodisponibilidade de zinco do que o feijão – fava.

Essa divergência dar-se-á pela diferença na composição dessas duas espécies de leguminosas. Vale ressaltar, que mesmo dentro de uma mesma espécie, podem ocorrer variações da composição.

HEMALATHA, PLATEL E SRINIVASAN (2007) também estudaram a biodisponibilidade de ferro e zinco no arroz na forma *in natura* e a porcentagem de ferro e zinco biodisponível encontrada por eles foram de 8,05 e 21,4%.

Eles ainda estudaram a biodisponibilidade em arroz cozido em panela de pressão as frações biodisponíveis de ferro e zinco encontradas por eles foram de 12 e 9,31%, respectivamente.

Observa-se que quando cozido, o arroz apresentou biodisponibilidade próxima à biodisponibilidade de zinco avaliada nesse estudo.

O ferro pode interagir com o zinco interferindo na sua biodisponibilidade, assim como o zinco interfere na absorção do ferro no organismo. A influência

que o ferro possa exercer na absorção de zinco é muito menor na presença de ligantes de alimentos, que modificam a biodisponibilidade dos dois elementos (COZZOLINO, 1997).

O cálcio diminui a absorção de ferro e quando o cálcio está presente numa dieta rica em fitatos, a formação do complexo cálcio – fitato – zinco leva a queda da absorção do zinco que será utilizado no metabolismo humano (COZZOLINO, 1997).

Dentre essas interações pode – se destacar a competição do ferro com outros metais, a absorção de metais próximos ao ferro como o cobalto, níquel, manganês, zinco e cádmio aumentam a deficiência de ferro, porque estes elementos podem compartilhar dos mesmos mecanismos de absorção do ferro (COZZOLINO, 1997).

A presença de alguns fatores antinutricionais já reportados na literatura presentes em leguminosas podem provocar efeitos adversos na biodisponibilidade de minerais, dentre eles os fitatos. BARRUETO – GONZALEZ (2008) afirma que os fitatos reduzem a biodisponibilidade do ferro não – heme formando complexos insolúveis no pH intestinal reduzindo sua absorção.

Foi observado neste estudo, que os teores totais de ferro nas amostras *in natura* e cozidas são elevados, podendo suprir as demandas desse elemento para as recomendações de ingestão diária recomendadas pela ANVISA, mas a absorção deste elemento traço é reduzida como foi observado neste estudo, menos de 2% do ferro encontra-se disponível para utilização pelo organismo ou para ser estocado e utilizado quando o corpo demandar as reservas deste.

Como fora mencionado anteriormente, a presença de fatores antinutricionais presentes em alimentos podem reduzir a biodisponibilidade de alguns minerais.

EGBE E AKINYELE (1990) investigaram os efeitos que os compostos antinutricionais possuem em feijão-fava e verificaram que os elevados níveis de ácido fítico ($234 \pm 3,6 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ em fava *in natura* e $25,7 \pm 7,3 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ quando cozida em água por 60 min) e de polifenóis ($122 \pm 1,6 \text{ mg g}^{-1}$ em feijão cru e de

30,7±0,8 mg g⁻¹ quando os feijões-fava são submetidos a cozimento em água por 60 min).

A partir do estudo realizado de EGBE E AKINYELE (1990) verifica-se que o processo de cocção diminui a concentração desses compostos antinutricionais em feijão –fava.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Seis amostras de feijão – fava foram submetidas à análise nas formas *in natura* e apresentaram teores totais significativos de cobre, ferro e zinco e esses teores estão próximos aos teores de feijões comum já reportados na literatura.

A avaliação da biodisponibilidade de ferro e de zinco nas amostras foram condizentes com alguns estudos realizados com alimentos de origem vegetal.

Foi observado que o processo de cocção interferiu no teor mineral do feijão – fava diminuindo a concentração desses elementos para algumas amostras, com exceção para a amostra P2 que apresentou teor de cobre superior à amostra *in natura*.

Mesmo apresentando baixos valores de frações biodisponíveis, o feijão-fava é uma excelente opção para os consumidores, pois apresenta teores totais significativos dos minerais em estudo e em concentrações próximas a de outras leguminosas e cereais.

A biodisponibilidade para o elemento cobre não pode ser avaliada, uma vez que as concentrações de cobre nas soluções resultantes do procedimento de diálise apresentaram valores abaixo do limite de detecção do método proposto, não sendo possível realizar a determinação por outras técnicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI-COSTA, T.S et al. Total phenolics, flavonoids, tannins and antioxidant activity of lima beans conserved in a Brazilian Genebank. **Ciência Rural**, v. 45, n. 2, p. 335-341, 2015.

AKINYELE, I. O.; SHOKUNBI, O. S. Concentrations of Mn, Fe, Cu, Zn, Cr, Cd, Pb, Ni in selected Nigerian tubers, legumes and cereals and estimates of the adult daily intakes. **Food chemistry**, v. 173, p. 702-708, 2015.

ALVES, A. U. et al. Lima beans production and economic revenue as function of organic and mineral fertilization. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 251-254, 2008.

AMORIM, F.A. C. et al. Atomic absorption spectrometry: The way for multielement determinations. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1784-1790, 2008.

AMORIM, S.L de; MEDEIROS, R.M.T.; RIET-CORREA, F. Intoxicações por plantas cianogênicas no Brasil. **Ciência Animal**, v. 16, n. 1, p. 17-26, 2006.

ANTUNES, P. L. & SGARBIERI, V. C. “Fatores antinutricionais, toxicidade e valor nutricional do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.)”. **Agros**, 15: 39, 1980.

ANTUNES II, N. D. R. et al. Potencial de uso agrícola e nutricional de cultivares crioulas de feijão. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, 2008.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

APATA, D. F.; OLOGHOB, A. D. Biochemical evaluation of some Nigerian legume seeds. **Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 333-338, 1994.

ARRUDA, M.A.Z; SANTELLI, R. E. Mecanização no preparo de amostras por microondas: o estado da arte. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 643, 1997.

BADUI DERGAL, S.; VALDÉS MARTÍNEZ, S.E CEJUDO GÓMEZ, H. **Química de los alimentos**. 2006.

BARRUETO-GONZALEZ, N.B. Biodisponibilidade de minerais das fontes leguminosas. **Revista Simbio-Logias**, v. 1, n. 1, p. 174-183, 2008.

BIANCHI, M. L. P.; SILVA, H.C ; DE OLIVEIRA, J.E. D. Considerações sobre a biodisponibilidade do ferro dos alimentos. **Arch. latinoam. nutr**, v. 42, n. 2, p. 94-100, 1992.

BRAGANTINI, C. Alguns aspectos do armazenamento de sementes e grãos de feijão. **Embrapa Arroz e Feijão. Documentos**, 2005.

BRIGIDE, P.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Evaluation of cooking and irradiation effects on the composition of carioca bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Alim. Nutr., Araraquara**, v. 22, n. 1, p. 97-102. 2011

BRITO, N.M. et al. Validação de métodos analíticos: Estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**. V.13.p. 129 – 146. Curitiba, 2003.

BROUGHTON, W. J. et al. Beans (*Phaseolus* spp.)—model food legumes. **Plant and soil**, v. 252, n. 1, p. 55-128, 2003.

BURIOLA, E. F et al. Disponibilidade de ferro in vitro em misturas de alimentos vegetais In vitro iron availability of mixtures based in plant foods. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 21, n. 1, p. 71-78, 2010.

CADORE, S.; MATOSO, E.; SANTOS, M.C. A espectrometria atômica e a determinação de elementos metálicos em material polimérico. **Quim. Nova**, v. 31, n. 6, p. 1533-1542, 2008.

CÂMARA, F.; AMARO, M. A.; BARBERÁ, R. & CLEMENT, G. "Bioaccessibility of minerals in school meals: Comparison between dialysis and solubility methods". **Food Chemistry**. 92: 481, 2005.

CARBONELL-CAPELLA, J. M. et al. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 2, p. 155-171, 2014.

CEPRO. Conjuntura Econômica. Boletim Anual. Piauí, 2013. Disponível em <http://www.cepro.pi.gov.br/download/201512/CEPRO22_91078b5926.pdf>. Acessado em 17/05/2015.

CORDANO, A. "Clinical manifestations of nutritional copper deficiency in infants and children". **Am. J. Clin. Nutr.**, 67: 1012, 1998.

COZZOLINO, S. M. **Biodisponibilidade de Minerais**. Rev. Nutr. Campinas.v.10,n.2, p. 87-98, 1997.

COZZOLINO, S. M. **Biodisponibilidade de Nutrientes**, 4 ed. São Paulo: Manole, 2012.

DE AZEVEDO, J. N. **Composição química de sete variedades de feijão-fava**. Embrapa Meio-Norte, 2003.

EDGE, I.A & AKINYELE, I.O. Effect of Cooking on the Antinutritional Factors of Lima Beans (*Phaseolus lunatus*). **Food Chemistry**. V.25, p. 81-87.1990.

EBDON, Les. et al. **An introduction to analytical atomic spectrometry**. John Wiley & Sons, 1998.

ELHARDALLOU, S. B.; WALKER, A. F. The effect of multi-mineral mix (Fe, Zn, Ca and Cu) on magnesium binding to starchy legumes under simulated gastrointestinal conditions. **Food chemistry**, v. 67, n. 2, p. 113-121, 1999.

EKMEKCIOGLU, C.. A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. **Food Chemistry**, v. 76, n. 2, p. 225-230, 2002.

ERDOGAN, S. et al. Simultaneous Multielement Determination of Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Sn, and Zn in Bulgur Wheat by ICP-OES. **Atomic Spectroscopy**, v. 36, n. 5, p. 210-215, 2015.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Bioavailability of trace elements. **Food Chemistry**, v. 43, n. 3, p. 213-217, 1992.

FENNEMA, O. R. **Química de los Alimentos**, 2ª Ed. Zaragoza: Acríbia, 2000. 1200 p.

FERREIRA, A.S.T et al. Effects of the Domestic Cooking on Elemental Chemical Composition of Beans Species (*Phaseolus lunatus L.*). **Journal of Food Processing**. V. 2014, P.1-6.2014.

GRANITO, M.; BRITO, Y; TORRES, A. Chemical composition, antioxidant capacity and functionality of raw and processed *Phaseolus lunatus*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 15, p. 2801-2809, 2007.

GUIMARÃES, W. NR et al. Caracterização morfológica e molecular de acessos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus L.*). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 37-45, 2007.

GROTTO, H. Z.W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase:[revisão]. **Rev. bras. hematol. hemoter**, v. 30, n. 5, p. 390-397, 2008.

HARRIS, DI C. **Química analítica quantitativa**. Rio de Janeiro: LTC Editora, p. 900, 2013.

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

HOLLER; F.J; SKKOG.D.A; CROUCH, S.R. **Princípio de Análise Instrumental**.6 ed. Bookman, 2009.

HOUSE, W. A. Trace element bioavailability as exemplified by iron and zinc. **Field Crops Research**, v. 60, n. 1, p. 115-141, 1999.

HUR, S. J. et al. In vitro human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 1-12, 2011.

IBGE– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**.2014.v.41, p.1 – 102. 2014.

JÚNIOR, D.S et al. Moagem criogênica para o preparo de amostras em técnicas analíticas. **Revista Analytica**. n.03. fevereiro de 2003.

KANNAMKUMARATHE,S.S; WUILLOUD, R.G; CARUSO, J.A. Studies of Various Elements of Nutritional and Toxicological Interest Associated with Different Molecular weight Fraction in Brazil Nuts. **Jornal of Agricultural and Food Chemistry**.v.52,n.19,p.5773-5780.2004.

KULKARNI, S.D.et AL. Evaluation of bioaccessibility of some essential elements from wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) by in vitro digestion method. **Food Chemistry**. v.103, p. 681-688, 2007.

LIMA, A.C.S. et al. In vitro bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew apple juice and cashew apple fibre (*Anacardium occidentale* L.) following simulated gastro-intestinal digestion. **Food Chemistry**.v.161,p.142-147.2014.

LIOI, L.; LOTTI, C.; GALASSO, I. Isozyme diversity, RFLP of the rDNA and phylogenetic affinities among cultivated Lima beans, *Phaseolus lunatus* (Fabaceae). **Plant Systematics and Evolution**. v.213, p.153-164, 1998

LOPES, A. C. A. et al. **Diversidade Genética**. In: ARAÚJO, A. S. F. de.;LOPES, A. C. de. A.; GOMES, R. L. F. (Org.). A cultura do feijão-fava na Região Meio-Norte do Brasil. 1ª ed. Teresina: EDUFPI, 2010, v. 1, p. 45-72.

LYMMAN, J. M.; BAUDOIN, J. P.; HIDALGO, R. **Lima bean** (*Phaseolus lunatus* L.) In Summerfield, R. J.; ROBERTS, H. Grain legume crops. London, Collins, 1988 p. 477-519.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. Importância do zinco na nutrição humana. **Rev. nutr**, v. 17, n. 1, p. 79-87, 2004.

MAQUET, A.; VEKEMANS, X. Z.; BALDOIN, J. P. Phylogenetic study on wild allies of lima bean, *Phaseolus lunatus* (FABACEAE), and implications on its origin. **Plant Systematics and Evolution**, v. 218, n. 1-2, p. 43-54, 1999.

MECHI, R.; CANIATTI-BRAZACA, S. G.; ARTHUR, V. AVALIAÇÃO QUÍMICA, NUTRICIONAL E FATORES ANTINUTRICIONAIS. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 25, n. 1, p. 109-114, 2005.

MEINERS, C.R. , et al. The content of nine minerals elements in raw and cooked mature dry legumes. *J. Agric. Food Chem.* V.24, n.6, p. 1126 – 1130, 1976b

MENEZES, E. de A. **Determinação da disponibilidade de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn em amostras de carnes bovinas, suínas e de frango in natura e processadas termicamente.** 2010. 127 p. Tese (Doutorado em Ciências em Química) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

MESÍAS, M.; SEIQUER, I.; NAVARRO, M. P. Consumption of highly processed foods: Effects on bioavailability and status of zinc and copper in adolescents. **Food Research International.** v.45, p.184–190, 2012.

MILLER, D. D. et al. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 34, n. 10, p. 2248-2256, 1981.

NASCIMENTO, Angerson N.; NAOZUKA, Juliana; OLIVEIRA, Pedro V. In vitro evaluation of Cu and Fe bioavailability in cashew nuts by off-line coupled SEC–UV and SIMAAS. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 1, p. 58-63, 2010.

OBERLEAS, D. **Toxicants occurring naturally in food.** **Committee on Food Protection (Ed.) National Academy of Sciences**, p. 363-371, 1973.

OLIVEIRA, A. P. de et al. Produção de feijão-fava em função do uso de doses de fósforo. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 543-546, 2004.

PINHEIRO, A. C. A. et al. Avaliação da mineralização de arroz em sistema de refluxo para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por F AAS. **Quim Nov**, v. 37, p. 6-9, 2014.

PEIXOTO, R. R.A; MAZON, E. A.M; CADORE, S. Estimation of the bioaccessibility of metallic elements in chocolate drink powder using an in vitro digestion method and spectrometric techniques. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 5, p. 884-890, 2013.

PRASAD, A. S. In Press. Zinc: An antioxidant and anti-inflammatory agent: Role of zinc indegenerative disorders of aging. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. 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, Campinas**, v. 28, n. 1, p. 200-213, 2008.

ROSA, F.C et al. Efeito de métodos de cocção sobre a composição química e colesterol em peito e coxa de frangos de corte. **Ciênc Agrotec**, v. 30, n. 4, p. 707-14, 2006.

SANDBERG,A.S. Bioavailability of mineral in legumes. **British J. Nutr.** V.88 (suppl 3), p. 281 – 285, 2002

SANTOS, D. et al. Produtividade e morfologia de vagens e sementes de variedades de fava no Estado da Paraíba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1407-1412, 2002.

SANTOS, Wagna Piler C. Dos et al. Use of Doehlert design for optimizing the digestion of beans for multi-element determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2008.

SEIDU, K.t T. et al. Amino acid composition, mineral contents and protein solubility of some lima bean (*Phaseolus lunatus* L. Walp) seeds coat. **Food Research International**, v. 73, p. 130-134, 2015.

SILVA, M.R; SILVA, M.A.A.M.P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Rev. Nutr.** V.12, n.1, p. 21 -32. jan./abr. , 1999.

SINGH, P.; PRASAD, S.; AALBERSBERG, W. Bioavailability of Fe and Zn in selected legumes, cereals, meat and milk products consumed in Fiji. **Food chemistry**, v. 207, p. 125-131, 2016.

SOUTHGATE, D.A.T; JOHSON,L.; FENWICK,G.R. Nutrient availability: chemical and biological aspects. **AFRC Institute of Food Research**, Norwich ed,n. 72 1989. 404p.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 57, n. 9, p. 386-398, 2003.

TORRE, M.. RODRIGUES, A.R.; SAURA-CALIXTO, F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. **CRC Critical Rev. Food Sci. Nutr.** V.1, n.1, p. 1-22, 1991.

VAN CAMPEN, D. R.; GLAHN, R. P. Micronutrient bioavailability techniques: accuracy, problems and limitations. **Field Crops Research**, v. 60, n. 1, p. 93-113, 1999.

VAN DOKKUM, W. The conception of mineral bioavailability. In: Bioavailability of micronutrients and minor dietary compounds. **Metabolic and technological aspects. Research**, India, p 1-18, 2003.

VIEIRA, R. F. A cultura da fava. In: VIEIRA, C. *Leguminosas de grãos: importância econômica na agricultura e na alimentação humana*. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, **EPAMIG**, v. 16, n. 174, p. 5-11, 1992.

WELCH, Ross M.; GRAHAM, Robin D. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 396, p. 353-364, 2004.

WHO. **The global prevalence of anaemia in 2011**. p.43.2015. Acessado em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/177094/1/9789241564960_eng.pdf?ua=1&ua=1>. Acessado em 25/04/2016.