



Fundação Educacional do Município de Assis
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis
Campus "José Santilli Sobrinho"

SIMONE MANZONI HOLZHAUSEN

**AVALIAÇÃO DO TEOR DE ISOFLAVONAS E PROTEÍNAS NO
FEIJÃO DA VARIEDADE IAC FORMOSO**

Assis
2013

SIMONE MANZONI HOLZHAUSEN

AVALIAÇÃO DO TEOR DE ISOFLAVONAS E PROTEÍNAS NO FEIJÃO
DA VARIEDADE IAC FORMOSO

Trabalho de conclusão de
Curso apresentado ao Instituto
Municipal de Ensino Superior
de Assis, como requisito do
Curso de Graduação.

Orientadora: Ms. Elaine Amorim Soares Menegon

Área de Concentração: Ciências Exatas

Assis
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

HOLZHAUSEN, Simone Manzoni

Avaliação do teor de isoflavonas e proteínas no feijão da variedade IAC Formoso / Simone Manzoni Holzhausen. Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA -- Assis, 2013.

54p.

Orientadora: Ms. Elaine Amorim Soares Menegon.

Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA.

1. Isoflavonas. 2. Proteínas. 3. Feijão IAC Formoso

CDD:660
Biblioteca da FEMA

AVALIAÇÃO DO TEOR DE ISOFLAVONAS E PROTEÍNAS NO FEIJÃO DA VARIEDADE IAC FORMOSO

SIMONE MANZONI HOLZHAUSEN

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto Municipal
de Ensino Superior de Assis, como
requisito do Curso de Graduação,
analisado pela seguinte comissão
examinadora:

Orientadora: Ms. Elaine Amorim Soares Menegon

Analisadora: Dr^a Rosângela Aguilár da Silva

Assis
2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu esposo Pedro Augusto e aos meus pais Odair e Maria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo sustento de minhas forças em momentos de desânimo e pela orientação e sabedoria em meio às dificuldades que surgiram;

Ao meu esposo Pedro Augusto, que sempre foi meu maior torcedor e sempre esteve presente me acompanhando em todas as etapas deste trabalho, suportando meus momentos de ausência, estresse, choro, insônias e por nunca me deixar desistir dos meus objetivos;

Aos meus pais, Odair e Maria, mas em especial, minha mãe, que sempre lutou para que eu e meus irmãos tivéssemos estudo e por sempre me oferecer seu colo protetor insubstituível;

Ao meu irmão Tiago, pelo incentivo e conselhos valiosos;

Ao meu irmão Renato, que sempre torceu por mim;

Aos meus amigos Sérgio Cortez, Natan Barros e Carlos Teixeira, que me auxiliaram em momentos de dúvida;

Ao pessoal do CEPECI: Patrícia, Aleicho, Liziane, Paula, Adriana e demais funcionários e estagiários, pelo apoio nas análises e pelos momentos de risadas proporcionados;

À professora Elaine, pela orientação e pelo constante estímulo transmitido durante o trabalho;

Aos amigos de curso Danieli, Eduardo, Alexandre, Rafael Luiz, por todos os momentos que passamos durante o tempo em que estudamos juntos, amizades das quais jamais serão esquecidas;

A todos que colaboraram direta ou indiretamente, na realização deste trabalho.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.

Martin Luther King
(1929-1968)

RESUMO

Alimentos funcionais possuem compostos bioativos, que são componentes extranutricionais. Dentre esses compostos, estão os flavonóides, uma ampla classe de substâncias de origem natural. As isoflavonas, uma subclasse desses compostos, vêm sendo estudada nos últimos anos. Estudos em cultura de células, modelos animais e alguns ensaios clínicos mostram que essas substâncias estão associadas a inúmeros benefícios na saúde. Esses fitoestrógenos são encontrados em maior quantidade na soja, entretanto, em 2011, o Instituto Agrônomo de Campinas lançou uma variedade de feijão, IAC Formoso, que apresenta 10% da quantidade de isoflavonas presente na soja. Em estudos, foi constatado a presença de 8,92 mg/grama de isoflavonas. A variedade ainda apresenta um teor de proteínas maior que outras variedades de feijão, possuindo de 23 a 24% de proteínas e 20% a mais que variedades que apresentam 20% de proteínas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o teor de isoflavonas e proteínas presente no feijão IAC Formoso, comparar com o feijão da variedade Carioca e com os dados apresentados na literatura. Para a determinação de isoflavonas foi utilizado o método por espectrofotometria na região do ultravioleta, e a análise de proteínas foi realizada pelo método de Kjeldahl. Os resultados obtidos revelaram que a variedade IAC Formoso apresentou 0,5540 mg/g de isoflavonas, sendo esta quantidade inferior aos dados da literatura e maior do que a contida na variedade Carioca, que não foi detectada a presença de isoflavonas. O baixo teor de isoflavonas obtido sugere que sejam utilizados outros métodos de determinação de isoflavonas para comparação, visando a obtenção de um método mais eficiente na quantificação desses fitoestrógenos. Os resultados apresentaram um teor de proteínas no feijão IAC Formoso de 23,71%, sendo maior do que a quantidade no feijão Carioca que apresentou 22,85% e também, dentro dos valores citados pela literatura. A partir dos resultados concluiu-se que o feijão IAC Formoso pode ser utilizado na alimentação em substituição ao feijão Carioca, variedade comumente consumida, pois além de apresentar isoflavonas, substâncias benéficas ao organismo, possui maior quantidade de proteínas, que são essenciais na dieta humana.

Palavras-chave: Isoflavonas, Proteínas, Feijão IAC Formoso.

ABSTRACT

Functional foods have bioactive compounds, which are components extra nutritional. Among these compounds are flavonoids, a broad class of substances of natural origin. Isoflavones, a subclass of these compounds have been studied in recent years. Studies in cell culture, animal models and some clinical trials have shown that these substances are associated with numerous health benefits. These phytoestrogens are found in greater amounts in soybeans, however, in 2011, the Instituto Agronômico de Campinas has launched a variety of beans, IAC Formoso, which has 10% of the amount of isoflavones present in soy. In studies, it was found the presence of 8.92 mg / g isoflavones. The array also has higher protein content than other varieties of beans having 23-24% protein and 20% more than varieties which have 20% of proteins. The aim of this study was to evaluate the content of isoflavones and proteins present in beans IAC Formoso, compare with the bean variety Carioca and the data presented in the literature. For the determination of isoflavones method was used by spectrophotometry in the ultraviolet region, and analysis of proteins was performed by the Kjeldahl method. The results showed that the IAC Formoso presented 0.5540 mg / g of isoflavones, and this amount was lower than the literature and greater than that contained in the range Carioca, which was not detected the presence of isoflavones. The low isoflavone content obtained suggests that other methods of determination of isoflavones are used for comparison, in order to obtain a more efficient method for the quantification of these phytoestrogens. The results showed a bean protein content of 23.71% in IAC Formoso beans, which is higher than the amount in Carioca which had 22.85% and also, within the range cited in the literature. From the results it was concluded that the IAC Formoso beans can be used to food to replace the Carioca, commonly consumed variety, as well as presenting isoflavones, substances beneficial to the body, a higher amount of proteins, which are essential in the human diet

Keywords: Isoflavones, Protein, Beans IAC Formoso.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Semelhança entre as estruturas químicas do estradiol e do equol	18
Figura 2	– Estruturas químicas das isoflavonas na forma aglicona.....	19
Figura 3	– Estruturas químicas das isoflavonas na forma glicosilada.....	20
Figura 4	– Feijão IAC Formoso.....	27
Figura 5	– Formação do complexo flavonóide–alumínio.....	28
Figura 6	– Escala de pH.....	33
Figura 7	– Extração de isoflavonas.....	39
Figura 8	– Gel obtido após processo de rotaevaporação.....	40
Figura 9	– Soluções – padrão (genisteína/daidzeína).....	40
Figura 10	– Curva de calibração de genisteína/daidzeína.....	42
Figura 11	– Amostras após processo de digestão.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Composição química média do feijão.....	25
Tabela 2	– Concentração e absorvância da curva de calibração.....	41
Tabela 3	– Valores de absorvância, diluição e concentração de isoflavonas nas soluções das amostras.....	42
Tabela 4	– Porcentagem de proteínas nas amostras de feijão.....	44

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	ALIMENTOS FUNCIONAIS E COMPOSTOS BIOATIVOS.....	16
2.1	FLAVONÓIDES.....	17
3.	ISOFLAVONAS.....	18
3.1	PRINCIPAIS ISOFLAVONAS.....	19
3.2	ABSORÇÃO, METABOLISMO E BIODISPONIBILIDADE.....	20
3.3	BENEFÍCIOS NA SAÚDE HUMANA.....	21
3.3.1	Alterações vasomotoras.....	21
3.3.2	Doenças cardiovasculares.....	21
3.3.3	Osteoporose.....	22
3.3.4	Diabetes mellitus.....	22
3.3.5	Câncer.....	22
3.3.5.1	Câncer de mama.....	22
3.3.5.2	Câncer de próstata.....	23
4.	FEIJÃO.....	24
4.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	24
4.2	PROTEÍNAS DO FEIJÃO.....	25
4.3	FEIJÃO IAC FORMOSO.....	26
5.	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE ISOFLAVONAS.....	28
5.1	ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRA VIOLETA.....	28
5.2	EXTRAÇÃO DE ISOFLAVONAS.....	29
5.2.1	Cromatografia em camada delgada.....	29
5.2.2	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	30
6.	FLAVONÓIDES – APLICAÇÃO NO ENSINO MÉDIO.....	31
6.1	MATERIAIS E REAGENTES.....	31
6.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	32

6.2.1	Preparo do extrato de repolho roxo.....	32
6.2.2	Preparo das soluções.....	32
6.2.3	Escala de pH.....	33
7.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
7.1	MATERIAIS E REAGENTES.....	34
7.1.1	Feijão IAC Formoso.....	35
7.1.2	Feijão Carioca.....	35
7.1.3	Padrões de isoflavonas.....	35
7.2	DETERMINAÇÃO DE ISOFLAVONAS.....	36
7.2.1	Processo de extração.....	36
7.2.2	Método por espectrofotometria na região do ultravioleta.....	36
7.2.2.1	Preparo da curva de calibração do padrão de isoflavonas.....	36
7.2.2.2	Preparo da amostra.....	37
7.2.2.3	Análise de identificação de isoflavonas.....	37
7.3	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	37
8.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	39
9.	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

O conceito de nutrição tem evoluído (VIZZOTTO et al., 2010). Uma alimentação saudável previne o surgimento de doenças crônicas e melhora a qualidade de vida. Alimentos como frutas, verduras, legumes e cereais integrais possuem vitaminas, fibras e outros compostos que auxiliam as defesas naturais do corpo e devem ser consumidos com frequência (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Partindo do princípio de que os alimentos não possuem apenas função nutricional, mas também de fornecer outros benefícios ao organismo, tem-se o conceito de alimentos funcionais (VIZZOTTO et al., 2010). Estes alimentos são aqueles que possuem componentes que conferem benefícios para a saúde seja através da prevenção ou do combate às doenças (FERNANDES, 2012).

De acordo com Barreto (2011), compostos bioativos são constituintes extranutricionais e ocorrem tipicamente em pequenas quantidades nos alimentos. Dentre estes compostos, estão os flavonóides, que compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Porém, tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuarem sobre os sistemas biológicos (MORAES; COLLA, 2006).

Uma subclasse dos flavonóides são as isoflavonas, que são compostos químicos fenólicos, pertencentes à classe dos fitoestrógenos e estão amplamente distribuídos no reino vegetal. As concentrações destes compostos são relativamente maiores nas leguminosas e, especialmente, na soja (ESTEVES; MONTEIRO, 2001).

Estudos em cultura de células, modelos animais e alguns ensaios clínicos em humanos têm mostrado que estas substâncias naturais oferecem importantes benefícios para a saúde humana, como a diminuição do risco a doenças cardiovasculares, prevenção/tratamento da osteoporose e alívio dos sintomas da menopausa. Também tem sido visto que as mesmas exercem atividade antioxidante e anticancerígena (BLASI et al., 2012).

Em artigos internacionais, pesquisadores afirmam que a quantidade de isoflavonas no feijão é inexpressiva. Entretanto, estudos realizados pelo Instituto Agronômico de Campinas revelaram que a variedade de feijão IAC Formoso tem 10% da quantidade de isoflavona encontrada na soja, alimento considerado principal fonte de isoflavona. Esse teor é significativo considerando que o consumidor brasileiro come regularmente feijão e não soja. A variedade IAC Formoso também apresenta 20% a mais de proteína que outras variedades de feijão. (DOMICIANO, 2012; TOMAZELLA, 2012)

Considerando os benefícios das isoflavonas e a importância das proteínas aliado ao fato de que o feijão é um alimento regularmente presente na dieta da população brasileira, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o teor de isoflavonas e proteínas na variedade de feijão IAC Formoso e comparar com os dados apresentados pelos estudos realizados neste feijão.

2. ALIMENTOS FUNCIONAIS E COMPOSTOS BIOATIVOS

A dieta habitual fornece, além dos macro e micro-nutrientes essenciais, alguns compostos químicos que desempenham uma potente atividade biológica, já comprovada por vários pesquisadores. Esses compostos são chamados de compostos bioativos ou, algumas vezes, de fitoquímicos e podem exercer diversos papéis beneficiando a saúde humana (HORST, LAJOLO, 2013).

O estudo desses compostos bioativos de alimentos inspirou o conceito de alimentos funcionais (BARRETO, 2011).

Um alimento pode ser considerado funcional se for demonstrado que o mesmo pode afetar beneficemente uma ou mais funções alvo no corpo, além de possuir os adequados efeitos nutricionais, de modo que seja tanto relevante para o bem-estar e a saúde quanto para a redução do risco de uma doença (MORAES; COLLA, 2006).

Segundo Barreto (2011) alimentos funcionais são todos os alimentos ou bebidas que, consumidos na alimentação diária, podem trazer benefícios fisiológicos específicos, graças à presença de ingredientes fisiologicamente saudáveis.

Os compostos bioativos estão presentes nos alimentos, em quantidades pequenas e o interesse neles cresce a cada ano. Estudos epidemiológicos, que abordam principalmente uma dieta rica em alimentos de origem vegetal, apresentam resultados interessantes, sugerindo que esses alimentos são capazes de influenciar na redução do risco do desenvolvimento de doenças crônicas como cardiovasculares, cânceres, distúrbios metabólicos, doenças neurodegenerativas e enfermidades inflamatórias (HORST; LAJOLO, 2013).

2.1 FLAVONÓIDES

Os flavonóides são compostos naturais que compõem uma importante família de metabólitos secundários abundantes no Reino Vegetal (NASCIMENTO; FREITAS, 2011).

De acordo com a rota de síntese e característica química da molécula, mais de 6000 flavonóides foram descritos e subdivididos em seis grandes classes com características específicas: antocianinas, catequinas, flavonóis, flavonas, flavononas e isoflavonas (NASCIMENTO; FREITAS, 2011; KONZEN, 2011).

A síntese dessas substâncias não ocorre na espécie humana. Seu consumo dentro de uma dieta regular é encontrado em legumes, verduras, frutas, chá de ervas, mel, entre outros alimentos de consumo cotidiano (LOPES et al. 2000).

O interesse econômico dos flavonóides é decorrente de uma série de propriedades farmacológicas que atuam sobre sistemas biológicos. Conseqüentemente, muitas dessas propriedades trazem benefícios à saúde humana (LOPES et al., 2000; MACHADO et al., 2008).

Dentre as classes de flavonóides, podemos destacar as isoflavonas. Suas propriedades biológicas podem influenciar muitos processos bioquímicos e fisiológicos. Essas substâncias naturais têm mostrado potenciais benefícios para a saúde humana com evidências em estudos experimentais e epidemiológicos (ESTEVES; MONTEIRO, 2001).

3. ISOFLAVONAS

As isoflavonas, chamadas também de isoflavonóides, são compostos não esteróides. Pertencem à família dos polifenóis, que por sua vez, possuem atividade antioxidante. Estão presentes numa grande variedade de vegetais, como os cereais, os legumes e os frutos, mas apenas nas leguminosas se apresentam em concentrações relativamente altas, especialmente na soja (ARQUILINO, 2011; BLASI et al., 2012; QUEIROZ et al., 2006).

Normalmente referenciadas como fitoestrógenos, as isoflavonas possuem estrutura similar ao 17- β -estradiol, com capacidade de atuar sobre os receptores estrogênicos e simulando algumas das propriedades dos hormônios femininos (AGUIAR, 2002; DIAS, 2011; SILVA et al., 2009).

Segundo Varaschini et al. (2011) as estruturas químicas do 17- β -estradiol e do equol (um metabólito das isoflavonas) podem ser sobrepostas, sendo possível observar que a distância entre os grupos hidroxila nas extremidades das moléculas é virtualmente semelhante, conforme ilustrado na figura 1.

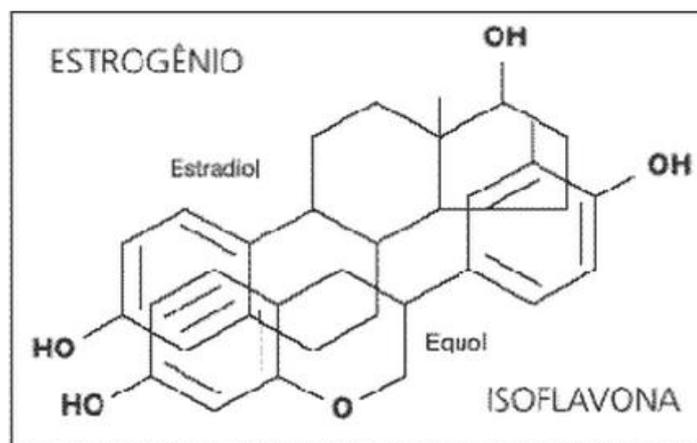


Figura 1 – Semelhança entre as estruturas químicas do estradiol e do equol (In: RODRIGUES et al., 2013)

Essa similaridade estrutural confere a habilidade desses compostos em se ligar aos receptores de estrogênio em várias células humanas, exercendo tanto ação estrogênica, quando em situações em que a produção do hormônio é drasticamente diminuída quanto ação antiestrogênica em circunstâncias em que as concentrações circulantes estão normais (SILVA et al., 2009; VARASCHINI et al., 2011).

3.1 PRINCIPAIS ISOFLAVONAS

As principais isoflavonas existentes na soja estão na forma aglicona. Elas apresentam-se em quatro formas químicas somando no total 12 isômeros: as agliconas daidzeína, genisteína, e gliciteína; os β -glicosídeos daidzina, genistina e glicitina; e os derivados glicosilados acetilados 6''-O-acetildaidzina, 6''-O-acetilgenistina, 6''-O-acetilglicitina; e glicosilados malonilados 6''-O-malonildaidzina, 6''-O-malonilgenistina e 6''-O-malonilglicitina (ALEZANDRO, 2009; BEDANI; ROSSI, 2005).

As figuras 2 e 3 apresentam as estruturas químicas das isoflavonas nas formas aglicona e glicosilada, respectivamente.

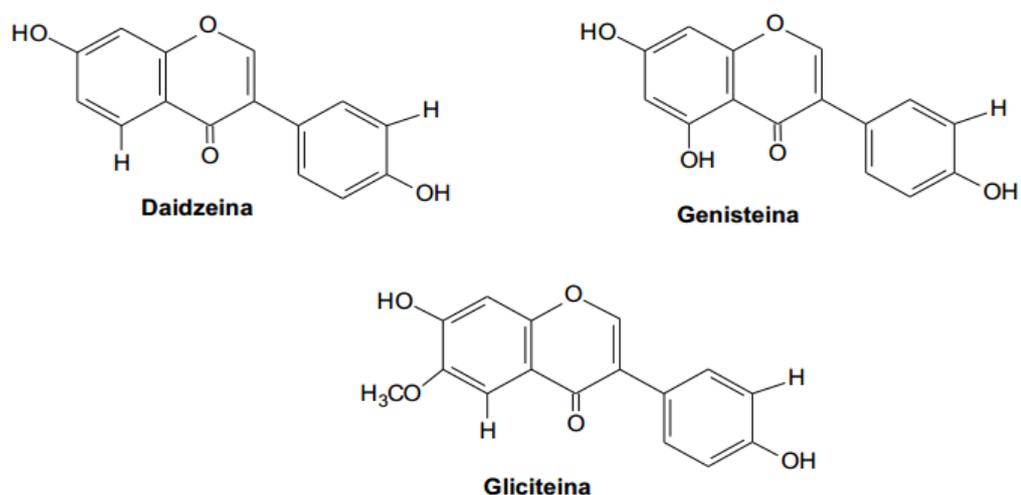


Figura 2 – Estruturas químicas das isoflavonas na forma aglicona (In: QUEIROZ et al., 2006)

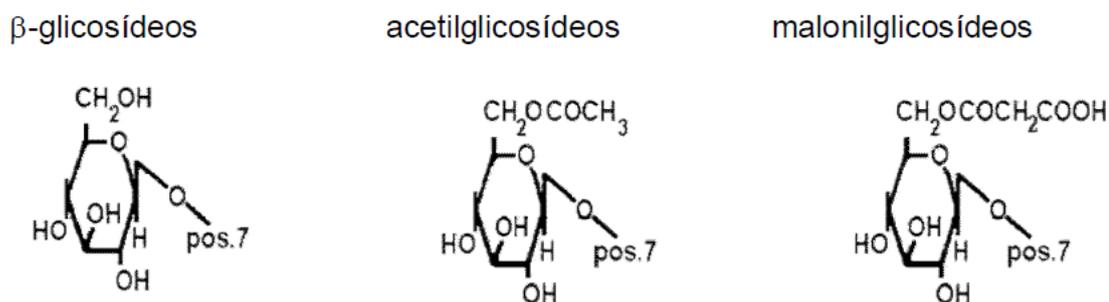


Figura 3 – Estruturas químicas das isoflavonas na forma glicosilada (In: CALLOU, 2009)

O teor das isoflavonas na soja varia em função de diferenças genéticas entre as cultivares, além de sofrer influência da temperatura ambiente durante o desenvolvimento dos grãos, assim como do período de estocagem, localização e época de plantio. O processamento também é outro fator que interfere na concentração e no perfil das isoflavonas nos produtos derivados de soja e nos alimentos que os contêm como ingredientes (ALEZANDRO, 2009).

3.2 ABSORÇÃO, METABOLISMO E BIODISPONIBILIDADE

Nos alimentos, as isoflavonas presentes estão ligadas a açúcares, como β-glicosídeos. Nestas formas, não são absorvidas pelo organismo humano, devido ao alto peso molecular e por serem bastante hidrofílicas. Somente as isoflavonas livres (agliconas) ou seus produtos metabólicos são capazes de atravessar a membrana plasmática do epitélio do intestino, ocorrendo passivamente via micelas, e após a absorção, estas moléculas são incorporadas nos quilomícrons (lipoproteínas plasmáticas), que as transportam ao sistema linfático antes de entrar no sistema circulatório (CALLOU, 2009; SILVA et al., 2009).

Segundo Silva et al. (2009) a retomada das isoflavonas circulantes do sangue ocorre de forma passiva e todas as células que contêm receptores para estrógenos podem ser influenciadas por essas moléculas, e quando estas moléculas são secretadas na

bile pelo fígado, parte é reabsorvida pela circulação entero-hepática e parte é excretada pelas fezes, e a maior parte, 10 a 30% da ingestão dietética, através da urina.

A capacidade potencial das isoflavonas em prevenir o câncer e outras doenças crônicas depende de sua biodisponibilidade. A presença de diferentes populações de microflora no intestino humano pode influenciar essa biodisponibilidade e causar variação na excreção de metabólitos (BEDANI; ROSSI, 2005).

3.3 BENEFÍCIOS NA SAÚDE HUMANA

3.3.1 Alterações vasomotoras

Após a menopausa, um dos sintomas mais comuns são os fogachos (ondas de calor), cuja causa se deve provavelmente às alterações hipotalâmicas $\alpha 2$, provocadas pela queda de estrogênio. Em um estudo, demonstrou-se que o uso de isoflavonas no período climatérico diminuiu em 40 a 50% as queixas de fogachos, cujo consumo foi de 50 a 80 mg/dia, no período de um ano (VARASCHINI et al., 2011).

3.3.2 Doenças cardiovasculares

Os meios pelos quais as isoflavonas de soja são capazes de promover ação protetora contra doenças cardiovasculares não estão bem estabelecidos, mas muitos mecanismos têm sido propostos, como: redução nos níveis de colesterol total, devido ao aumento na atividade de receptores da LDL; atividade antioxidante; atividade anti-proliferativa e anti-migratória sobre as células musculares lisas; prevenção da formação de trombos; manutenção da reatividade vascular normal; melhora na função endotelial (SIMÃO et al., 2008).

3.3.3 Osteoporose

A osteoporose é uma doença crônica que ocorre quando a taxa de degradação óssea dos osteoclastos excede à sua formação, e estudos epidemiológicos têm mostrado que a incidência de osteoporose pós-menopausa é menor na Ásia que no ocidente, e uma das possíveis causas seria o alto consumo de produtos de soja, ricos em isoflavonas, pelas mulheres asiáticas (SILVA et al., 2009).

3.3.4 Diabetes mellitus

O diabetes mellitus é uma doença caracterizada por altos níveis de glicose. Essa hiperglicemia é o resultado de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambos. Nas células, os receptores para insulina são enzimas estimuladas por ela própria, com atividade de proteína tirosina quinase. Devido ao seu efeito inibidor da proteína tirosina quinase, a genisteína vem sendo estudada como um composto regulador da secreção de insulina (ESTEVES; MONTEIRO, 2001; SBD, 2006).

3.3.5 Câncer

3.3.5.1 Câncer de mama

Estudos epidemiológicos mostraram que populações que consomem alimentos ricos em isoflavonas têm menor incidência de câncer (ANJO, 2004). Há vários estudos mostrando que a genisteína inibe o crescimento tanto de células cancerosas hormônio-dependentes quanto as hormônio-independentes. Uma das pesquisas mais importantes no tratamento do câncer de mama envolve inibidores de angiogênese. Estudos mostraram que a genisteína é capaz de bloquear esse processo (ANJO, 2004; BEDANI; ROSSI, 2005).

3.3.5.2 Câncer de próstata

O câncer de próstata constitui o câncer hormônio-dependente mais comum no homem e a incidência vem aumentando rapidamente em muitos países. Acredita-se que a alta ingestão de isoflavonas por homens asiáticos favoreça a baixa incidência de câncer de próstata. O mecanismo provável pelo qual as isoflavonas podem reduzir o câncer de próstata envolve seus efeitos sobre os hormônios sexuais sanguíneos, uma vez que os mesmos desempenham importante papel nesse tipo de câncer (BEDANI; ROSSI, 2005).

4. FEIJÃO

Caracterizado através das artes como o alimento do povo, o feijão faz parte da alimentação humana há muitos e muitos séculos (SÁ, 2008). Era cultuado no Egito e na Grécia como símbolo da vida. Muitos historiadores atribuem a expansão mundial do feijão como consequência das guerras, já que fazia parte da dieta dos guerreiros (AFONSO, 2010).

O feijoeiro pertence à classe *Dicotyledoneae*, família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoidae* e gênero *Phaseolus*. Cerca de 55 espécies de *Phaseolus* são descritas, mas apenas cinco são cultivadas. A espécie *P. vulgaris*, popularmente conhecida como feijão comum, é a mais difundida e consumida em diversos países (AFONSO, 2010; KONZEN, 2011).

O feijão representa um dos grãos de maior importância para o consumo humano em escala global (KONZEN, 2011). No Brasil, o consumo de feijão *per capita* tem se mantido por volta de 16,5 kg nos últimos 10 anos (ROSOLEM, 2012).

É um dos alimentos mais tradicionais na mesa do brasileiro e, é uma das principais fontes de proteína para a população (WOEHL, 2012). A preferência do consumidor é regionalizada e diferenciada principalmente quanto à cor e ao tipo de grão (SÁ, 2008).

4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A composição química do feijão é um fator importante na qualidade do produto final. Nas sementes do feijão a composição química é bastante variável, podendo variar de acordo com a variedade, origem, localização, clima, condições ambientais, tipo de solo, armazenamento, processamento e modificações genéticas (SÁ, 2008).

A tabela 1 apresenta a composição química média do feijão.

Matéria	Teor (%)
Carboidratos	56 - 77
Proteínas	18 - 26
Gorduras	0,7 - 1,9
Umidade	7,7 - 22
Fibras	4,5 - 9,2
Cinzas	3,3 - 4,3

Tabela 1 – Composição química média do feijão (In: AFONSO, 2010)

De acordo com Afonso (2010) e Sá (2008) também são encontrados: vitaminas, como a vitamina K em quantidade mais expressiva; minerais como o ferro, fósforo, magnésio e manganês e compostos fenólicos representados por flavonóides, antocianinas, proantocianidinas e isoflavonas, como também alguns ácidos fenólicos.

4.2 PROTEÍNAS DO FEIJÃO

Um dos elementos que fazem parte da composição dos aminoácidos é o nitrogênio, que desempenha um efeito direto no teor de proteínas dos grãos. Em plantas que recebem maiores níveis de adubação nitrogenada, pode ser observado maior teor de proteínas (JUNIOR et al., 2005). Nas proteínas dos feijões o aminoácido encontrado em maior quantidade é a lisina e, em concentrações limitadas, os aminoácidos sulfurados metionina e cisteína (BONETT et al., 2007).

De acordo com Huber (2012) estudos envolvendo fracionamento das proteínas de *Phaseolus vulgaris*, foi demonstrado que há uma mistura de quatro frações de proteínas: globulinas, albuminas, glutelinas e prolaminas.

As proteínas mais encontradas em feijões são as globulinas e as albuminas. Das globulinas, destacam-se as faseolinas, que perfazem de 40 a 50% do total de proteínas. O teor de prolaminas e glutelinas é de 1,7% e 22,4%, respectivamente, do total de proteínas desses grãos (HUBER, 2012).

Embora a quantidade de proteínas em feijões seja alta, elas apresentam digestibilidade reduzida em condições *in natura*, devido à presença de fatores antinutricionais, tais como os inibidores de α -amilase e de tripsina. Para reduzir esse problema, é necessária a realização da cocção desses grãos; que promove aumento da digestibilidade proteica de 20,8% para 69,33 a 82,59% (BONETT et al., 2007; HUBER, 2012).

4.3 FEIJÃO IAC FORMOSO

Em artigos internacionais, pesquisadores alegam que o feijão é um alimento com teores inexpressivos de isoflavonas, em comparação com a soja (DOMICIANO, 2012). Entretanto, o feijão da variedade IAC Formoso prova o oposto (WOEHL, 2012).

A variedade IAC Formoso levou sete anos de pesquisa e foi lançada em 2011 (AUGUSTO, 2012). Estudos realizados pelo Instituto Agrônomo (IAC) de Campinas juntamente com a Universidade de São Paulo (USP) mostraram que esse feijão tem 10% da quantidade de isoflavonas encontrada na soja. Considerando que a população brasileira consome regularmente feijão e não soja, esse teor de isoflavona torna-se expressivo (TOMAZELA, 2012).

Nos estudos, constatou-se que a quantidade de isoflavona varia de acordo com a variedade do feijão. No feijão da variedade Pérola, que é padrão no mercado, foi de 0,8 mg/grama ao passo que no IAC Formoso foi de 8,92 mg/grama (TOMAZELA, 2012).

O feijão IAC Formoso possui de 23 a 24% de proteínas, enquanto outros materiais têm 20%. A descoberta é o primeiro passo para resultar em maior valor agregado ao

feijão, além de servir de base para outros estudos de enriquecimento de alimentos (DOMICIANO, 2012; SRB, 2013).

A figura 4 apresenta o feijão IAC Formoso.



Figura 4 – Feijão IAC Formoso (In: WOEHL, 2012)

5. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE ISOFLAVONAS

Os métodos analíticos para a determinação de isoflavonas na literatura referem-se, principalmente, à determinação dessas substâncias em matrizes biológicas, grãos de soja, produtos alimentícios e em produtos farmacêuticos (CÉSAR et al., 2007).

É possível determinar esses fitoestrógenos por espectrofotometria na região do ultravioleta; e também, após o processo de extração, por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

5.1 ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA

O método espectrofotométrico utiliza uma solução metanólica de cloreto de alumínio a 2%, onde o cátion alumínio forma complexos estáveis com as hidroxilas livres dos flavonóides, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas (MARQUES et al., 2012; MARCUCCI et al., 2013).

A figura 5 apresenta a formação do complexo flavonoide–alumínio.

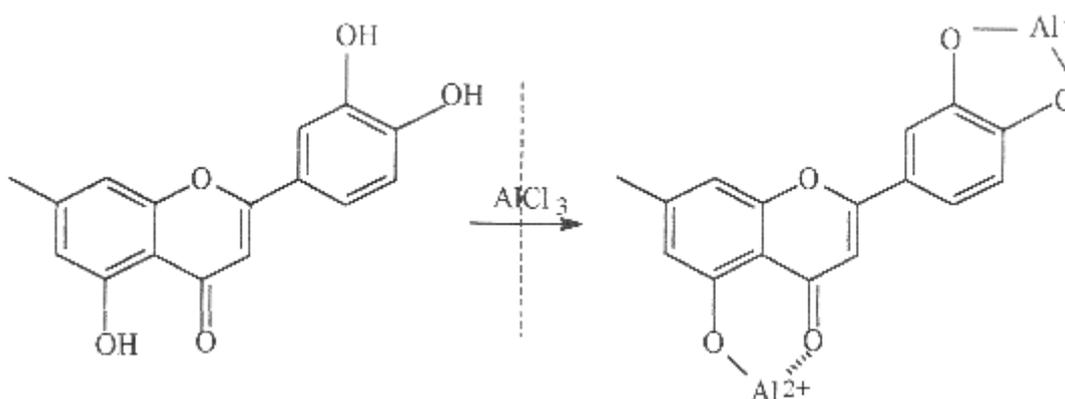


Figura 5 – Formação do complexo flavonoide–alumínio (In: MARCUCCI et al., 2013)

Nissola et al. (2010) avaliaram em seu trabalho a variabilidade dos teores de isoflavonas genisteína + genistina em extratos secos de soja utilizando como padrão de referência a genisteína. Foram registrados espectros na faixa de 200 a 500 nm, sendo a determinação de genisteína + genistina realizada após 20 minutos do preparo das soluções, no comprimento de onda de 382 nm, indicativo da formação do complexo das isoflavonas com o $AlCl_3$.

5.2 EXTRAÇÃO DE ISOFLAVONAS

Os métodos mais comuns utilizados para extração de isoflavonas em grãos de soja e produtos derivados de soja incluem extrações em meio aquoso com solventes orgânicos, incluindo metanol, etanol ou acetonitrila, ou ainda utilizando misturas simples de solventes diretamente no sólido (RIBANI, 2008). Geralmente para extração de isoflavonóides o solvente extrator é acidificado para hidrólise e obtenção da aglicona (YANO, 2006).

Também são utilizadas técnicas como soxhlet ou ainda extração com banho ultrassônico por algumas horas (RIBANI, 2008).

5.2.1 Cromatografia em camada delgada

Na cromatografia em camada delgada, o processo de separação ocorre em superfície plana. A amostra é aplicada na placa a cerca de 1 cm da base da placa e é colocada em contato com a fase móvel que está contida em uma cuba cromatográfica. A cromatografia se desenvolve com a fase móvel migrando através da fase estacionária por ação da capilaridade; a este processo chama-se desenvolvimento. Como a amostra interage com a fase móvel e a fase estacionária, à medida que o solvente vai ascendendo na placa a amostra vai sendo arrastada pelo solvente numa velocidade que depende da atração do soluto pela fase estacionária. Assim diferentes substâncias com diferentes interações com a fase

estacionária são arrastadas a velocidades diferentes a partir de uma única aplicação. A separação dos analitos caracteriza-se através do fator de retardamento R_f . O R_f é a relação entre a distância de migração da substância e da distância percorrida pela fase móvel, a partir do ponto de saída (YANO, 2006).

5.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A maioria dos métodos descritos na literatura utiliza cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de isoflavonas em matrizes diversas (CÉSAR et al., 2007).

Um sistema de CLAE consiste de bomba de alta pressão, injetor, coluna, detector e um sistema de aquisição de dados. Os detectores mais utilizados são o de índice de refração, espectrofotométrico, fluorescência e eletroquímico (YANO, 2006).

A maioria dos métodos por CLAE emprega o modo de eluição por gradiente para separação e utilizam, como fase móvel, misturas de metanol-água ou acetonitrila-água e ácido trifluoroacético ou ácido acético glacial como modificador. Porém, estes métodos não têm sido bem sucedidos na resolução das 12 isoflavonas simultaneamente, mesmo utilizando programação por gradiente (RIBANI, 2008).

Para se determinar quantitativamente glicosídeos e agliconas individualmente é necessário dispor de substâncias de referência para cada uma delas, implicando em alto custo e longos tempos de análise. Para solucionar esses problemas é realizado um procedimento comum em análise de isoflavonas por CLAE, a hidrólise ácida, que consiste no aquecimento em meio ácido para conversão em agliconas. (RIBANI, 2008; YANO, 2006).

César et al. (2007) estabeleceram um método usando eluição isocrática para separação e quantificação das isoflavonas na forma para o extrato seco de soja. Esta metodologia utilizou hidrólise ácida para transformar todas as formas glicosídicas na forma aglicona, permitindo separar três isoflavonas na forma aglicona das impurezas provenientes do extrato seco.

6. FLAVONÓIDES – APLICAÇÃO NO ENSINO MÉDIO

As antocianinas pertencem ao grupo dos flavonóides, grupo de pigmentos naturais com estruturas fenólicas variadas (VOLP et al., 2008). Estes pigmentos possuem um espectro de cor que varia do vermelho ao azul, apresentando-se também como uma mistura de ambas as cores, resultando em tons de púrpura. Muitas frutas, hortaliças, folhas e flores devem sua chamativa coloração a esses pigmentos, que se encontram dispersos nos vacúolos celulares (VICTOR, 2011).

Dentre os alimentos que contêm antocianinas, podemos destacar o repolho roxo, que é considerado um ótimo indicador natural de ácido-base, que muda de cor em função do pH (CBQ, 2013).

Tendo em vista esta propriedade de acidez-basicidade do repolho roxo pela ação do flavonóide antocianina, será proposto aos alunos a construção de uma escala crescente de pH variando de 0,1 a 14, onde os alunos avaliarão a coloração do extrato de repolho roxo com a possibilidade de substituir indicadores sintéticos de ácido-base, como o violeta de metila, alaranjado de metila, fenolftaleína e entre outros, contribuindo para o incentivo do uso de produtos naturais.

Será proposta a seguinte prática para exemplificar o uso de substâncias naturais no ensino da química. O conceito de flavonóides será explicado previamente ressaltando a importância do composto.

6.1 MATERIAIS E REAGENTES

- Repolho roxo
- Becker 500 mL
- Água destilada
- Papel filtro

- Pipetas
- Tubos de ensaio
- HCl PA
- NaOH PA
- NH₄OH PA
- pH-metro
- Micro-ondas

6.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

6.2.1 Preparo do extrato de repolho roxo

Para a extração da substância indicadora de pH será necessário 300 g de repolho roxo fresco e ralado, colocando-o em um becker de 500 mL com adição de 300 mL de água destilada, obedecendo à razão de 1:1 m/v e mantendo-o em micro-ondas por 5 minutos. Após essa etapa, a solução deve ser filtrada em papel filtro e mantida sob refrigeração até o momento em que será usada.

6.2.2 Preparo das soluções

As soluções com os diferentes valores de pH serão preparadas utilizando HCl, NaOH e NH₄OH diluídos em água destilada em diferentes concentrações. Para a aferição do pH das soluções que serão preparadas, será utilizado um pH-metro. O experimento deve ser conduzido em tubos de ensaio, onde cada tubo deverá receber 1 mL da solução com o seu determinado valor de pH e 1 mL do extrato de repolho roxo.

6.2.3 Escala de pH

A figura 6 apresenta a escala de pH que os alunos deverão construir.



Figura 6 – Escala de pH (In: CARDOSO et al., 2012)

A solução indicadora de extrato de repolho roxo deverá apresentar colorações extremas variando desde o vermelho, passando pelo violeta, azul, verde até o amarelo alaranjado. Em algumas faixas de pH não haverá diferenças visuais significativas como do pH 3,0 ao 6,0. Entretanto, os pH 2,0, 9,0 e 12,0 deverão apresentar colorações únicas e bastante distintas, que poderão indicar o pH exato da solução avaliada, assim como os valores de pH das faixas de 0,1 a 1,0 e de 13,0 a 14,0, que também podem ser identificadas com bastante exatidão.

Considerando que o repolho roxo apresentará colorações específicas para diferentes níveis de pH, os alunos podem concluir que o mesmo permite substituir indicadores sintéticos.

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 MATERIAIS E REAGENTES

- Ácido acético glacial
- Ácido bórico
- Ácido clorídrico
- Balão de fundo redondo de 250 mL
- Balão volumétrico de 25, 50 e 100 mL
- Becker de 250 mL
- Bloco digestor
- Centrífuga (CELM – Combate)
- Cloreto de alumínio anidro
- Cubeta de quartzo (1 cm)
- Destilador de nitrogênio (TECNAL – TE 0363)
- Espectrofotômetro (FEMTO – 600S)
- Estufa com circulação de ar (MARCONI – MA 033)
- Etanol
- Evaporador rotativo (TECNAL – TE 210)
- Funil de separação de 500 mL
- Hexano
- Metanol (grau HPLC)
- Micro-moinho (MARCONI – Tipo Willye MA 048)
- Mistura catalítica

- Papel filtro
- pH-metro
- Pipeta de 1, 5, 10 e 25mL
- Proveta de 100 mL
- Tubo de digestão
- Ultra-som (KONDORTECH – CD 4860)

7.1.1 Feijão IAC Formoso

O feijão da variedade IAC Formoso utilizado foi cedido pelo Instituto Agronômico de Campinas – IAC.

7.1.2 Feijão Carioca

O feijão da variedade Carioca utilizado foi comprado no comércio da cidade de Assis.

7.1.3 Padrões de isoflavonas

Os padrões de isoflavonas utilizados foram a genisteína e a daidzeína com grau de pureza > 98%, obtidos da Zelang Group (Nanjing, Jiangsu, China).

7.2 DETERMINAÇÃO DE ISOFLAVONAS

7.2.1 Processo de extração

O processo de extração de isoflavonas está de acordo com a metodologia de Lima et al. (2011), com adaptações.

Pesou-se cerca de dois gramas de feijão, previamente secos e moídos. Foram feitas três extrações com 60 mL de etanol 70% pH 2,0 ajustado com ácido acético. Cada extração ocorreu em temperatura ambiente, durante 24 horas. Os extratos foram particionados três vezes com 60 mL de hexano e centrifugados a 2800 rpm. Os sobrenadantes foram combinados e o solvente rotaevaporado até quase *secura*.

7.2.2 Método por espectrofotometria na região do ultravioleta

O método por espectrofotometria utilizado está de acordo Nissola et al. (2010), com modificações.

7.2.2.1 Preparo da curva de calibração do padrão de isoflavonas

Preparou-se uma solução estoque de padrão misto de isoflavonas (genisteína/daidzeína) pela dissolução em metanol. Pesou-se cerca de 0,0080 g de cada substância e solubilizou-se em 100 mL de metanol obtendo-se uma solução de concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$. A partir da solução estoque foram feitas diluições obtendo soluções nas concentrações de: 0,0; 3,2; 9,6; 16,0; 22,4; 28,8; 32,0 e $40 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução metanólica a 2% (m/v) de AlCl_3 em cada solução.

7.2.2.2 Preparo da amostra

Após o processo de extração das isoflavonas, pesou-se todo o extrato obtido e transferiu-se para um balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, foram adicionados 20 mL de metanol e a mistura submetida a banho de ultra-som por 10 minutos. Completou-se o volume com o mesmo solvente e filtrado. Uma alíquota de 5 mL do filtrado foi colocada em um balão de 25 mL contendo 1 mL de solução metanólica a 2% (m/v) de AlCl_3 , sendo o volume completado com metanol.

7.2.2.3 Análise de identificação de isoflavonas

As análises foram conduzidas em espectrofotômetro UV-VIS FEMTO 600S. Os espectros foram registrados no comprimento de onda 382 nm, após 20 minutos do preparo das soluções. Os teores de genisteína + daidzeína foram determinação em relação à curva de calibração.

7.3 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

O teor de proteínas foi determinado pelo método de Kjeldahl nas variedades IAC Formoso e Carioca.

Pesou-se cerca de 0,30 g de feijão, previamente seco, moído e homogeneizado, no tubo de digestão. Acrescentou-se 1,00 g de mistura catalítica (sulfato de cobre e sulfato de potássio) e 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. Colocou-se o tubo de digestão no bloco digestor, a uma temperatura de 350°C. A digestão terminou-se quando a amostra no tubo se apresentou límpida com coloração esverdeada.

A amostra digerida, após resfriada, foi diluída com cerca de 10 mL de água destilada. Realizou-se a destilação em destilador macro-Kjeldahl com hidróxido de sódio 50%. Após a destilação, titulou-se ácido clorídrico 0,1 mol/L diretamente na amônia coletada, até o aparecimento de uma coloração rósea.

Cálculo:

$$\% \text{ P.B.} = \frac{V \times fc \times 0,875}{p.a.}$$

Onde:

% P.B. = porcentagem de proteína bruta

V = volume de HCl 0,1 mol/L gasto na titulação

fc = fator de correção do HCl 0,1 mol/L

p.a. = peso da amostra

8. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As análises para a determinação de isoflavonas foram feitas em duplicata e os resultados obtidos foram comparados com dados da literatura a respeito do teor de isoflavonas no feijão IAC Formoso e com a variedade de feijão Carioca.

A figura 7 ilustra o início do processo de extração de isoflavonas.



Figura 7 – Extração de isoflavonas

Finalizado o processo de rotaevaporação, foi obtido um gel, mostrado na figura 8.



Figura 8 – Gel obtido após processo de rotaevaporação

Para determinar a concentração de isoflavonas foi feita a curva de calibração dos padrões com concentrações conhecidas. Esta curva foi construída baseada na análise de regressão linear de absorvância versus concentração. As soluções-padrão (genisteína/daidzeína) podem ser visualizadas na figura 9.



Figura 9 – Soluções – padrão (genisteína/daidzeína)

Os valores das concentrações e as absorvâncias da curva de calibração estão apresentados na tabela 2.

Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Absorvâncias (382nm)
0,00	0,000
3,20	0,057
9,60	0,152
16,00	0,246
22,40	0,339
28,80	0,426
32,00	0,476
40,00	0,593

Tabela 2 – Concentrações e absorvâncias da curva de calibração

As concentrações escolhidas para a construção da curva padrão proporcionaram a obtenção de uma curva padrão com $R^2 = 0,9997$, indicando que a curva pode ser utilizada com segurança para a determinação de isoflavonas na amostra. A figura 10 apresenta a curva padrão obtida.

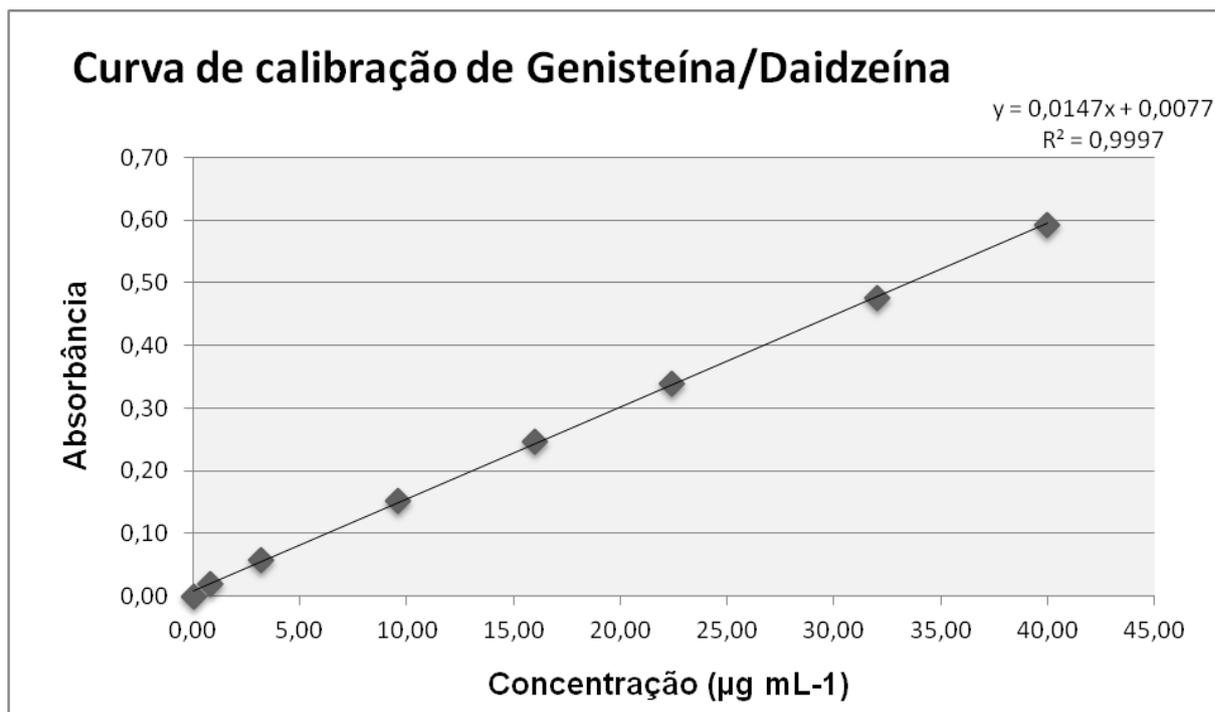


Figura 10 – Curva de calibração de genisteína/daidzeína

Os valores de absorbância, diluição e concentrações de isoflavonas nas soluções das amostras estão apresentados na tabela 3.

Amostra	Abs. 382 nm	Concentração de isoflavonas (µg mL ⁻¹)	Diluição	Concentração de isoflavonas final (µg mL ⁻¹)
Feijão Carioca	0,006	–	1:5	–
Feijão IAC Formoso	0,138	8,8639	1:5	44,3195

Tabela 3 – Valores de absorbância, diluição e concentração de isoflavonas nas soluções das amostras

A partir da concentração final de isoflavonas fizeram-se os seguintes cálculos para encontrar a concentração por grama de feijão:

$$44,3195 \mu\text{g de isoflavonas} \frac{\text{_____}}{1 \text{ mL de solução}}$$

$$X \frac{\text{_____}}{25 \text{ mL (volume do balão)}}$$

$$X = 1\,107,9875 \mu\text{g de isoflavonas}$$

$$1,1080 \text{ mg de isoflavonas} \frac{\text{_____}}{2 \text{ g de feijão}}$$

$$X \frac{\text{_____}}{1 \text{ g de feijão}}$$

$$X = 0,5540 \text{ mg de isoflavonas/g de feijão}$$

A partir dos resultados observou-se que a variedade Carioca não apresentou teor de isoflavonas considerável e a variedade IAC Formoso, em comparação com a literatura utilizada neste trabalho, apresentou teor de isoflavonas 6,21% da quantidade esperada, que seria de 8,92 mg/g. Essa diferença nos valores obtidos poderia ser atribuída pelo fato de que a metodologia utilizada neste trabalho foi adaptada, sendo necessária a utilização de outros métodos de análise para comparação, objetivando a obtenção de um método mais eficiente na quantificação de isoflavonóides em feijão. Entretanto, através deste trabalho foi possível comprovar a presença de isoflavonas em feijão, visto que os estudos no feijoeiro sobre a presença desses fitoestrógenos são bastante limitados (LIMA et al., 2011).

As análises para a determinação de proteínas foram feitas em triplicata e os resultados obtidos foram comparados com os dados apresentados a respeito do teor de proteínas no feijão da variedade IAC Formoso e com a variedade de feijão Carioca.

A figura 11 ilustra as amostras após o processo de digestão.



Figura 11 – Amostras após processo de digestão

A tabela 4 apresenta os resultados obtidos nas variedades de feijão estudadas e também os dados da literatura a respeito o feijão IAC Formoso.

Variedades	% Proteínas
Feijão Carioca	22,85±0,48
Feijão IAC Formoso	23,71±0,69
Feijão IAC Formoso (literatura)	23 - 24

Tabela 4 – Porcentagem de proteínas nas amostras de feijão

Os resultados obtidos revelaram que o feijão IAC Formoso possui 3,76% a mais de proteínas em relação ao feijão da variedade Carioca e em relação aos dados da literatura, o feijão IAC Formoso está em conformidade com os dados citados pela literatura tanto para os dados que dizem que ele deve apresentar de 23 a 24% de

proteínas quanto para dados que afirmam que o mesmo deve apresentar 20% a mais de proteínas em relação a variedades que apresentam 20% de proteínas.

9. CONCLUSÃO

O feijão IAC Formoso apresentou teor de isoflavonas de 0,5540 mg/g. No feijão Carioca, não foi identificada a presença desses fitoestrógenos. Verificou-se que o teor encontrado na variedade IAC Formoso foi menor do que o teor descrito na literatura, essa diferença nos valores obtidos poderia ser atribuída ao fato de que foram necessárias algumas adaptações para a realização das análises.

O método por espectrofotometria na região do ultravioleta se mostrou simples e rápido no doseamento de isoflavonas, entretanto é necessária a utilização de outros métodos alternativos de análise para comparação, a fim de que seja avaliado qual método obtém máxima eficiência na quantificação de isoflavonas em feijão.

Em relação ao teor de proteínas, o feijão IAC Formoso apresentou maior quantidade em relação ao feijão Carioca e estava em conformidade com os dados da literatura.

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que o feijão IAC Formoso pode ser utilizado para o consumo em substituição ao feijão Carioca, que é a variedade mais consumida, pois apresenta isoflavonas, que como visto no decorrer do trabalho, confere inúmeros benefícios à saúde e ainda possui maior quantidade de proteínas, que são substâncias essenciais na dieta da população.

REFERÊNCIAS

AFONSO, Sílvia Marlene Esteves. **Caracterização Físico-Química e Actividade Antioxidante de Novas Variedades de Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2010. 44p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar, Bragança, 2010.

AGUIAR, Cláudio Lima. Isoflavonas de soja e propriedades biológicas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. Universidade Federal do Paraná, Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Curitiba, 2002, p. 323-334.

ALEZANDRO, Marcela Roquim. **Determinação de isoflavonas e capacidade antioxidante de alimentos industrializados à base de soja e/ou produtos derivados consumidos no Brasil**. 2009. 98p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos Área de Bromatologia. Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2009.

ANJO, Douglas Faria Corrêa. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**. 2004. Artigo de revisão. p. 145-154.

ARQUILINO, Ana Luísa Baptista. **Estudo comparativo dos efeitos do 17- β -estradiol, do extracto de soja e dos fitoestrogénios que o integram em culturas de células humanas**. 2011. 88p. Dissertação (Mestrado) – Ciências Farmacêuticas. Universidade da Beira Interior, Corvilhã, Portugal, 2011.

AUGUSTO, Renato. **Feijão pode ajudar na prevenção de doenças crônicas**. Idmed. Disponível em : < <http://idmed.terra.com.br/dieta-e-boa-forma/alimentacao-saudavel/feijao-pode-ajudar-na-prevencao-de-doencas-cronicas.html> >. Acesso em: 13 fev. 2013.

BARRETO, Norma Danielle Silva. **Qualidade, compostos bioativos e capacidade antioxidante de frutos de híbridos comerciais de meloeiro cultivados no Ce e Rn**. 2011. 185p. Tese (Doutorado). – Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), Rio Grande do Norte, Mossoró, 2011.

BEDANI, Raquel; ROSSI, Elizeu Antônio. Isoflavonas: Bioquímica, fisiologia e implicações para a saúde. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. Universidade Federal do Paraná, Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Curitiba, 2005, p. 231-264.

BLASI, Tereza Cristina; OLIVEIRA, Andréia Silva de; OLIVEIRA, Teonas Henrique Freitas de. **Benefícios das isoflavonas na saúde humana**. UNIFRA – Centro Universitário Franciscano. Disponível em: < <http://www.unifra.br/eventos/sepe2012/Trabalhos/6949.pdf> >. Acesso em: 22 mar. de 2013.

BONETT, Lucimar Pereira; BAMGARTNER, Maria do Socorro Tenório; KLEIN, Ângela Cristina; SILVA, Luciano Ivano. Compostos nutricionais e fatores antinutricionais do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revistas Unipar – Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v.11, n.3, set./dez., 2007, p. 235-246.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Alimentação Saudável**. Disponível em: < <http://www.brasil.gov.br/sobre/saude/cuidados-e-prevencao> >. Acesso em: 02 abr. 2013.

CALLOU, Kátia Rau de Almeida. **Teor de isoflavonas e a capacidade antioxidante das bebidas à base de soja**. 2009. 129p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos. Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2009.

CARDOSO, P. H. F.; SILVA, A. S.; COSTA, A. N. S.; SANTOS, J. M. A.; SILVA, P. C. L.; SILVA, R. A. O extrato de brassica oleracea var. Capitata (repolho roxo) para substituição dos indicadores convencionais de ph. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 2012, Recife. **Anais do 52º Congresso Brasileiro de Química**, outubro, 2012.

CÉSAR, Isabela da Costa; BRAGA, Fernão Castro; SOARES, Cristina Duarte Vianna; NUNAN, Elzília de Aguiar; BARBOSA, Thiago Assis Franco; CAMPOS, Ligia Maria Moreira. Determinação de daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.4, outubro/novembro, 2007, p. 616-625.

Congresso Brasileiro de Química – CBQ. **Abordagem fitoquímica do extrato aquoso de brassica oleracea var. Capitata (repolho roxo)**. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2012/trabalhos/7/1580-14534.html>>. Acesso em: 28 mar. 2013.

DIAS, B. S.; SANTOS, F. P. Benefícios da isoflavona para mulheres no período da Menopausa. In: CONGRESSO MULTIPROFISSIONAL EM SAÚDE, V, 2011, Londrina, Brasil. **Anais do V Congresso Multiprofissional em Saúde**, junho, 2011.

DOMICIANO, Fernanda. Descoberta inédita no mundo: Variedade de feijão tem 10% da isoflavona encontrada na soja. **A Lavoura**, n. 691, 2012. p. 48-50.

ESTEVES, Elizabeth Adriana; MONTEIRO, Josefina Bressan Resende. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, v.14, n.1, janeiro/abril, 2001. P. 43-52.

FERNANDES, Kamila Victor. **Principais compostos bioativos dos alimentos funcionais**. Portal Educação. Disponível em: <<http://www.portaleducacao.com.br/nutricao/artigos/19145/principais-compostos-bioativos-dos-alimentos-funcionais>>. Acesso em: 01 abr. 2013.

HORST, Maria Aderuza; LAJOLO, Franco Maria. **Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos**. Disponível em: <<http://nutricaoclinicaeesteticaabh.files.wordpress.com/2011/07/biodisponibilidade-de-compostos-bioativos.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2013.

HUBER, Karina. **Evidências da interação entre proteínas e taninos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) e seus efeitos na digestibilidade proteica.** 2012. 107p. Dissertação (Mestrado) – Ciência e Tecnologia de Alimentos – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz” (ESALQ) – Piracicaba, 2012.

JUNIOR, Francisco Guilhien Gomes; LIMA, Edir Rodrigues; LEAL, Aguinaldo José Freitas; MATOS, Flávia Araujo; SÁ, Marco Eustáquio de; HAGA, Kuniko Iwamoto. Teor de proteína em grãos de feijão em diferentes épocas e doses de cobertura nitrogenada. **Revista Acta Scientiarum Agronomy**, v.27, n.3, julho-setembro, 2005, p. 455-459.

KONZEN, Enéas Ricardo. **Análise morfológica, bioquímica e genética do brilho do tegumento em variedades de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).**2011. 136p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Piracicaba 2011.

LIMA, Paula F. de; YAMAGUCHI, Lydia; KATO, Massuo J.; CHIORATO, Alisson F.; COLOMBO, Carlos A.; CARBONELL, Sérgio A. M. Determinação de isoflavonovóides em feijão comum para seleção de linhagens com valor nutracêutico agregado. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 11155, 2011, Campinas. **Anais do 5º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica**, agosto, 2011, 8p.

LOPES, Renato Matos; OLIVEIRA, Tânia Toledo de; NAGEM, Tanus Jorge; PINTO, Aloísio da Silva. Flavonóides. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 17, novembro/dezembro, 2000, p. 18-22.

MACHADO, Hussen.; NAGEM, Tanus. Jorge; PETERS, Vera Maria; FONSECA, Cristiane Sampaio; OLIVEIRA, Tânia Toledo de. Flavonóides e seu potencial terapêutico. In: **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**. Universidade Federal de Juiz de Fora, Centro de Biologia da Reprodução, Juiz de Fora, 2008, p. 33-39.

MARCUCCI, Maria Cristina; WOISKY, Ricardo Gomide; SALATINO, Antonio. **Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostra de própolis.** Disponível em: <<http://www.bichoonline.com.br/artigos/apa0014.htm>>. Acesso em: 23 jul. 2013.

MARQUES, Graziella Silvestre; MONTEIRO, Rebeqa Priscila Maranhão; LEÃO, Waleska de Figueirêdo; LYRA, Magali Andreza Marques; PEIXOTO, Monize Santos; NETO, Pedro José Rolim; XAVIER, Haroudo Sátiro; SOARES, Luiz Alberto de Lira. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata*. **Revista Química Nova**, v.35, n.3, 2012, p. 517-522.

MORAES, Fernanda P.; COLLA, Luciane M.. Alimentos funcionais e nutracêuticos: Definições, Legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, novembro, 2006. p. 109-122.

NASCIMENTO, Pedro Henrique Alcalde do; FREITAS, Rafael Carvalho de. Análise qualitativa de flavonóides em cultivares de feijão (*phaseolus vulgaris*) e avaliação da ação antimicrobiana in vitro. In: PRÊMIO DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA REYNALDO CAMARGO NEVES, 2011, Londrina, Brasil. **Anais Prêmio de Produção Científica Reynaldo Camargo Neves**, outubro, 2011, p. 1-11.

NISSOLA, Candida; HESS, Bianca; FRANCISCO, Thais Guimarães de; GASPARETTO, João Cleverson; CAMPOS, Francinete Ramos; PONTAROLO, Roberto. Determinação de genisteína e genistina por espectrofotometria de UV-visível em extratos secos de soja utilizados como matéria--prima em farmácias de manipulação. **Revista Visão Acadêmica**, v.11, n.2, julho-dezembro, 2010, p. 35-41.

QUEIROZ, Sonia C. N.; NOGUEIRA, Raquel Tassara; SCRAMIN, Shirlei. **Importância dos fitoestrógenos, presentes na soja, para a saúde humana.** Embrapa. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Queiroz_Nogueira_Scramin_importanciaID-5nX98pWTxk.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2013.

RIBANI, Marcelo. **Obtenção e aplicação de padrões de isoflavonas**. 2008. 114p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2008.

RODRIGUES, Tânia; PADILHA, Heloísa Guarita; ANDRADE, Andrea; BARRELA, Ana Beatriz; PASQUALIN, Mirella. **Conheça melhor as isoflavonas**. RG Nutri – Identidade em nutrição. Disponível em: < <http://www.rgnutri.com.br/sqv/saude/cmi.php> >. Acesso em: 03 mar. de 2013.

ROSOLEM, Ciro Antônio. **O velho arroz com feijão**. Portal do Agronegócio. Disponível em: < <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=84002>>. Acesso em: 13 jul. 2013.

SÁ, Raquel da Silva. **Avaliação dos fatores de qualidade de feijão comum**. 2008. 93p. Relatório de Estágio Profissionalizante – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2008.

SBD – Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. **Epidemiologia do DIABETES Mellitus**. Sociedade Brasileira de Diabetes. Disponível em: < <http://www.diabetes.org.br/educacao/docs/diretrizes.pdf> >. Acesso em: 23 mar. 2013.

SILVA, Maria Cristina Pereira da; LADEIRA, Angela Maria; GARCIA, Daniel; FURLAN, Marcos Roberto. Isoflavona. **Revista Eletrônica Thesis**, n. 12, 2º semestre, 2009, p. 31-59.

SIMÃO, A. N. C., BARBOSA, D. S., NUNES, L. B., GODENY, P., LOZOVYOY, M. A. B., DICI, I. Importância da ingestão de soja nos sintomas do climatério, osteoporose e doenças cardiovasculares. **Revista Científica: Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, v.12, n.1, janeiro/abril, 2008, p. 67-75.

SRB – Sociedade Rural Brasileira. **IAC apresenta nova variedade de feijão precoce.** Sociedade Rural Brasileira. Disponível em: <http://www.srb.org.br/noticias/article.php?article_id=5472>. Acesso em: 28 out. 2013.

TOMAZELLA, José Maria. **Substância do feijão faz bem ao coração.** O Estadão de São Paulo. Disponível em: <<http://www.estadao.com.br/noticias/impreso,substancia-do-feijao-faz-bem-ao-coracao-,894468,0.htm>>. Acesso em: 20 fev. 2013.

VARASCHINI, Adriana; MENDEL, Monique Theissen; SUYENAGA, Edna Sayuri. Isoflavonas de soja no tratamento dos sintomas do climatério: O que é cientificamente validado?. **Revista Conhecimento Online**, v.2, setembro, 2011, p. 1-19.

VICTOR, Kamila. **Antocianinas.** Nutrição em Foco. Disponível em:<<http://www.nutricaoemfoco.com.br/pt-br/site.php?secao=funcional-nefdebate&pub=8766>>. Acesso em: 01 abr. 2013.

VIZZOTTO, Márcia; KROLOW, Ana Cristina; TEIXEIRA, Fernanda Cardoso. **Alimentos funcionais: Conceitos básicos.** 1. ed. Pelotas: Embrapa 2010.

VOLP, Ana Carolina Pinheiro; RENHE, Isis Rodrigues Toledo; BARRA, Kiriaque; STRINGUETA, Paulo César. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.2, 2008, p. 141-149.

WOEHL, Oraide. Ao completar 125 anos, Instituto Agrônomo descobre quantidade expressiva de isoflavona no feijão. **Rotas Estratégicas: BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA E FLORESTAL.** Disponível em: <<http://rotabiotecagricolaflorestal.wordpress.com/>>. Acesso em: 13 fev. 2013.

YANO, Helena Miyoco. **Determinação de isoflavonas em formulações farmacêuticas**. 2006. 154p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Fármaco e Medicamentos – Área de Produção e Controle Farmacêutico – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2006.