

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**FEIJÃO GUANDU PARA USO ALIMENTAR: COMPOSIÇÃO
QUÍMICA, FUNCIONALIDADE E ASPECTOS NUTRICIONAIS**

Marcelo Larsen de Lima Tozo*

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título MESTRE
EM QUÍMICA, área de concentração:
QUÍMICA ANALÍTICA

Orientadora: Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira

***Bolsista CAPES (Código de financiamento: 001)**

São Carlos – SP

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Marcelo Larsen de Lima Tozo, realizada em 31/03/2025.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira (EMBRAPA)

Profa. Dra. Juliana Naozuka (UNIFESP)

Profa. Dra. Elma Neide Vasconcelos Martins (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Eliane e Marcelo, minha base; aos meus irmãos, Felipe e Juliana; e a todos os meus familiares e amigos, por todo amor, suporte e incentivo ao longo da vida.

À minha namorada, Vanessa, pelo seu carinho, companheirismo e incentivo. E por estar presente ao meu lado nos altos e baixos da minha jornada.

À Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira, pela orientação e parceria formada ao longo desse projeto, trazendo discussões valiosas durante esse tempo.

Aos profissionais da Embrapa Pecuária Sudeste, principalmente à Dra. Simone Cristina Meo Niciura, pelas colaborações e suporte ao trabalho desenvolvido.

Aos parceiros da C.B.O Análises Laboratoriais Ltda, pela contribuição e suporte ao trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pelas discussões e excelentes contribuições

Aos amigos e colegas de trabalho Lorena, Jeyse, Amauri, Ivero, Pascoal, José, Thais, Mikael e Mykaelly por toda convivência e divertidas conversas dentro e fora do ambiente profissional.

À minha amiga Samara Banhos. Além das boas risadas, seus conselhos, suporte e incentivo me deram confiança em seguir carreira como químico.

Ao Grupo de Análise Instrumental Aplicada (GAIA), em especial aos professores Dr. Joaquim de Araujo Nogueira e Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho, pelos ensinamentos nas disciplinas.

Ao Laboratório de Análises Químicas CBO, Valinhos, em especial a sócia proprietária Oneida, pela realização das análises de aminoácidos.

Aos colegas e amigos da Embrapa Pecuária Sudeste, que tornaram meu dia-a-dia mais leve e descontraído.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), ao Departamento de Química (DQ) e ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da UFSCar por toda estrutura e suporte.

À Embrapa Pecuária Sudeste, pela estrutura disponibilizada para o desenvolvimento do trabalho. E a todos os seus funcionários.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida. Este trabalho foi realizado com apoio financeiro da CAPES – Código de financiamento (0001)

Muito obrigado.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BEC	Concentração equivalente ao sinal de fundo (do inglês <i>Background equivalent concentration</i>)
CRM	Material de referência certificado (do inglês <i>Certified reference material</i>)
DSC	Combinador espectral dicróico (do inglês <i>dichroic spectral combiner</i>)
EC	Calibração externa (do inglês <i>External calibration</i>)
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês <i>Flame atomic absorption spectrometry</i>)
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (do inglês <i>Graphite furnace atomic absorption spectrometry</i>)
HRCS-F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama e fonte contínua de alta resolução (do inglês <i>High-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry</i>)
HMI®	<i>High matrix introduction</i>
ICARDA	Centro Internacional de Pesquisa Agrícola em Áreas Secas
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (do inglês <i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>)
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (do inglês <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
ICRISAT	Instituto Internacional de Pesquisa de Cultivo para os Trópicos Semiáridos
IN	Instrução Normativa
IS	Padrão interno (do inglês <i>Internal standard</i>)
LMT	Limite máximo tolerado

LOD	Limite de detecção (do inglês <i>Limit of detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês <i>Limit of quantification</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
RDA	Dose diária recomendada (do inglês <i>Recommended daily allowance</i>)
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês <i>Relative standard deviation</i>)
SAM	Método de adição de padrão (do inglês <i>Standard addition method</i>)
SBR	Razão sinal analítico/sinal de fundo (do inglês <i>Signal-to-background ratio</i>)
SVDV	Visão dupla vertical síncrona (do inglês <i>Synchronous vertical dual view</i>)
TDS	Teor de sólidos dissolvidos (do inglês <i>Total dissolved solids</i>)
TGI	Trato gastrointestinal
TEER	Resistência elétrica transepitelial (do inglês <i>Transepithelial electrical resistance</i>)
UNU	Universidade das Nações Unidas (do inglês <i>United Nations University</i>)
WHO	Organização Mundial da Saúde (do inglês <i>World Health Organization</i>)
YF	Fator de rendimento (do inglês <i>Yield factor</i>)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Fluxograma das principais etapas realizadas neste trabalho.

FIGURA 3.1 – Representação esquemática de um modelo de digestão *in vitro* estático baseado em três etapas. A fase oral é recomendada em aplicações em amostras contendo carboidratos, sendo opcional em alguns casos (Imagem gerada no BioRender, versão gratuita).

FIGURA 3.2 – Representação do modelo intestinal humano (Imagem gerada no BioRender, versão gratuita).

FIGURA 4.1 – Representação esquemática do protocolo *in vitro* usado para simulação da digestão. (1) fluido salivar simulado (FSS); (2) fluido gástrico simulado (FGS); (3) fluido intestinal simulado (FSS). Criado em BioRender, versão livre.

FIGURA 4.2 – Representação esquemática do ensaio de biodisponibilidade. Criado em BioRender, versão livre.

FIGURA 5.1 – Teor total de Ca, Mg e P em amostras de feijão cru (barra verde) e cozido (barra marrom) (n=5). Barras seguidas por letras sobrescritas iguais indicam diferença não significativa baseado em Teste t pareado ($p < 0,05$).

FIGURA 5.2 – Teor total de Cu, Fe e Zn em amostras de feijão cru (barra verde) e cozido (barra marrom) (n=5). Barras seguidas por letras sobrescritas iguais indicam diferença não significativa baseado em Teste t pareado ($p < 0,05$).

FIGURA 5.3 – Bioacessibilidade de Ca, Mg e P em amostras de feijão cozido. Barras seguidas por letras iguais indicam diferença não significativa baseado em teste Tukey ($p < 0,05$).

FIGURA 5.4 – Bioacessibilidade de Cu, Fe e Zn em amostras de feijão cozido. Barras seguidas por letras iguais indicam diferença não significativa baseado em teste Tukey ($p < 0,05$).

FIGURA 5.5 – Medidas de TEER antes e após incubação do quimo preparado.

FIGURA 5.6 – Bioacessibilidade de proteína em amostras de feijão cozido. Barras seguidas por letras iguais indicam diferença não significativa baseado em teste Tukey ($p < 0,05$).

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 – Composição química de diferentes linhagens de feijão guandu (média \pm desvio padrão) (MIANO *et al.* 2020).

TABELA 3.2 – Aplicações de modelo *in vitro*, em amostras vegetais, para avaliação da bioacessibilidade de elementos essenciais e contaminantes.

TABELA 3.3 – Aplicações do modelo celular Caco-2 em ensaios *in vitro* para estudos de biodisponibilidade em alimentos.

TABELA 4.1 – Parâmetros instrumentais aplicados ao ICP OES.

TABELA 4.2 – Parâmetros instrumentais aplicados ao ICP-MS.

TABELA 4.3 – Parâmetros instrumentais aplicados ao cromatógrafo HPLC

TABELA 4.4 – Gradiente de fase móvel aplicado ao cromatógrafo HPLC

TABELA 4.5 – Mix de padrão de aminoácidos

TABELA 5.1 – Parâmetros analíticos para determinação do teor total dos elementos.

TABELA 5.2 – Recuperações obtidas após análise dos materiais de referência RM – Agro CV-01/2021 (café verde) e NIST – SRM 1573^a (folha de tomate).

TABELA 5.3 – Experimentos de adição e recuperação (recuperação \pm desvio padrão, $n = 3$), via ICP OES, em dois níveis: 2 mg L⁻¹ e 30 mg L⁻¹.

TABELA 5.4 – Parâmetros analíticos dos experimentos de bioacessibilidade *in vitro*. Determinação por ICP OES usando calibração externa ($n=8$).

TABELA 5.5 – Teor total, fração bioacessível e fração residual em amostras de feijão cozido (média \pm desvio padrão, mg kg⁻¹, $n = 3$, base úmida).

TABELA 5.6 – Balanço de massas (% m m⁻¹ \pm desvio padrão) para as amostras de feijão cozido.

TABELA 5.7 – Parâmetros analíticos dos experimentos de biodisponibilidade. Determinação de Ca, Mg e P por ICP OES (mg L⁻¹) e determinação de Cu, Fe e Zn por ICP-MS (μ g L⁻¹) usando calibração externa ($n = 8$).

TABELA 5.8 – Experimentos de adição e recuperação (recuperação \pm desvio padrão, $n = 3$), em dois níveis.

TABELA 5.9 – Balanço de massa (% m m⁻¹ \pm desvio padrão, $n = 3$) do experimento de biodisponibilidade.

TABELA 5.10 – Teor total, fração biodisponível e fração residual de Ca, Cu, Fe, Mg, P e Zn em amostras de feijão cozido (média \pm desvio padrão, $n = 3$).

TABELA 5.11 – Composição bromatológica das amostras de feijão. Matéria seca

(MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), teor de carbono (C), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e extrato etéreo (EE). Os resultados são apresentados em % ($m\ m^{-1}$). Os resultados são apresentados em % ($m\ m^{-1}$), corrigidos em base seca.

TABELA 5.12 – Teor total, fração bioacessível, fração residual (média \pm desvio padrão, % $m\ m^{-1}$, $n = 3$, base úmida) e balanço de massa (% $m\ m^{-1}$) de proteína* em amostras de feijão cozido. Valores seguidos por letras iguais indicam diferença não significativa baseado em teste T pareado ($p < 0,05$).

TABELA 5.13 – Composição de aminoácidos na fração bioacessível de feijão guandu.

TABELA 5.14 – Contribuição de feijão (porção de 100 g) para a ingestão diária recomendada de elementos essenciais e proteína.

RESUMO

FEIJÃO GUANDU PARA USO ALIMENTAR: COMPOSIÇÃO QUÍMICA, FUNCIONALIDADE E ASPECTOS NUTRICIONAIS. Esta dissertação tem como objetivo o desenvolvimento e a aplicação de procedimentos analíticos para avaliar os teores totais e a bioacessibilidade e biodisponibilidade de elementos essenciais e proteínas totais em duas variedades de feijão guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) previamente selecionadas para consumo humano. Foram avaliadas amostras cruas e cozidas e em diferentes estágios de maturação, assim como variedades comerciais de feijão carioca e preto. A bioacessibilidade e a biodisponibilidade foram obtidas após simulações de digestão gastrointestinal *in vitro* e bioensaios com células Caco-2, respectivamente. Para as proteínas, a fração total e a fração bioacessível foram quantificadas por combustão (Dumas) e os aminoácidos livres por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os elementos avaliados (Ca, Mg, P, Cu, Fe e Zn) foram determinados por espectrometria de emissão óptica e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP OES e ICP-MS), após decomposição assistida por radiação micro-ondas empregando ácido diluído ($7,0 \text{ mol L}^{-1}$). A bioacessibilidade dos elementos variou de 0,8 a 19% para Ca e de 48 a 67% para Cu. A bioacessibilidade de Ca, Fe, Mg e Zn diminui com a maturação dos grãos. Por fim, simulação intestinal *in vitro* com células Caco-2, visando estimar a biodisponibilidade dos nutrientes apresentou problemas com a integridade da monocamada celular, sendo que não foi possível estimar os valores de biodisponibilidade. No entanto, resultados obtidos indicam o caminho a ser seguido para o aprimoramento deste experimento e obtenção de resultados confiáveis. Com relação a proteína bruta, as amostras de feijão guandu apresentam teores próximos a 20%. Para os aminoácidos foram encontradas quantidades $\geq 1\%$ de ácido glutâmico, ácido aspártico e leucina. Para o grão maduro, a lisina e a fenilalanina estão presentes em quantidades $\geq 1\%$, em comparação ao grão verde. Por outro lado, no grão maduro, as quantidades de glicina, histidina, treonina, alanina e tirosina foram baixas ($\leq 0,4\%$), e não foram detectadas metionina, cistina e taurina em nenhum dos dois grãos. A bioacessibilidade das proteínas variou entre 16,4 e 19,4%. Houve elevação no teor das proteínas totais com a maturação do grão, sendo que a porcentagem bioacessível permaneceu sem alteração significativa. Sobre a ingestão diária recomendada (IDR), o consumo de 100 g do alimento cozido sugere que o feijão guandu pode ser uma fonte alternativa de

nutrientes, destacando Mg e P, apesar de sua contribuição ser menor comparado as variedades comerciais de feijão carioca e preto. Além disso, todos os feijões estudados apresentam potencialidade para suplementação de proteínas, variando de 32,8 – 38,8% da IDR, reforçando a importância dessas leguminosas e de outras na nutrição humana. Os resultados obtidos são relevantes do ponto de vista nutricional, apresentando dados inéditos sobre os aspectos nutritivos de duas variedades de feijão guandu e a bioacessibilidade de elementos essenciais, indicando sua viabilidade como alternativa de consumo.

ABSTRACT

PIGEON PEA FOR FOOD USE: CHEMICAL COMPOSITION, FUNCTIONALITY AND NUTRITIONAL ASPECTS. This dissertation aims to develop and apply analytical procedures to evaluate the total levels, bioaccessibility, and bioavailability of essential elements and total proteins in two pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) varieties previously selected for human consumption. Raw and cooked samples were evaluated at different stages of maturation, as well as commercial varieties of common beans (carioca and black). Bioaccessibility and bioavailability were obtained after *in vitro* gastrointestinal digestion simulations and bioassays with Caco-2 cells. For proteins, the total fraction and the bioaccessible fraction were quantified by combustion (Dumas), and free amino acids by high-performance liquid chromatography (HPLC). The macro and micronutrients evaluated, Ca, Mg, P, Cu, Fe, and Zn, were determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry (ICP OES and ICP-MS), after microwave-assisted decomposition using diluted acid (7.0 mol L^{-1}), both for total contents and for bioaccessible and bioavailable fractions. The bioaccessibility of elements varied from 0.8 to 19% for Ca and from 48 to 67% for Cu. Bioaccessibility of Ca, Fe, Mg, and Zn decreased with bean maturation. Finally, an *in vitro* intestinal simulation with Caco-2 cells, aimed at estimating nutrient bioavailability, faced issues with the integrity of the cell monolayer, making it impossible to estimate bioavailability values. However, the results obtained suggest the direction to be followed for improving this experiment and obtaining reliable results. Regarding crude protein content, pigeon pea samples were close to 20%. For amino acids, amounts $\geq 1\%$ of glutamic acid, aspartic acid, and leucine were found. For the mature grain, lysine and phenylalanine were present in amounts $\geq 1\%$, compared to the green grain. However, in the mature grain, the amounts of glycine, histidine, threonine, alanine, and tyrosine were low ($\leq 0.4\%$), and no methionine, cystine, or taurine were detected in either grain. The protein bioaccessibility varied between 16.4% and 19.4%. There was an increase in the total protein content with the maturation of the beans, while the bioaccessible percentage remained unchanged. For the recommended daily intake (RDI), the consumption of 100 g of cooked food suggests that the pigeon pea may be an alternative source of nutrients, highlighting Mg and P, although its contribution is lower compared to the commercial varieties of carioca and black beans. Additionally, all the beans studied show potential for protein supplementation, ranging from 32.8 –

38.8% of the RDI, reinforcing the importance of these legumes and others in human nutrition. This study is significant from a nutritional perspective, providing unprecedented data on the nutritional aspects of two varieties of pigeon peas and the bioaccessibility of essential elements, indicating their use as a consumption alternative.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo geral.....	5
2.2 Objetivos específicos	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1 Feijão guandu como fonte alternativa para dieta humana	7
3.2 Estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade	12
3.3 Uso de células em estudos de biodisponibilidade	18
3.4 Quantificação da fração bioacessível e biodisponível	22
3.5 Estratégias de preparo de amostras e estratégias instrumentais para procedimentos de análise direta.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Instrumentação	27
4.2 Reagentes e soluções	29
4.3 Amostras e pré-preparo.....	30
4.4 Determinação dos teores totais, da bioacessibilidade e biodisponibilidade de macro e micronutrientes	31
4.4.1 Digestão <i>in vitro</i>	31
4.4.2 Modelo intestinal humano baseado em células Caco-2	33
4.4.2.1 Cultura celular.....	33
4.4.2.2 Experimentos de biodisponibilidade	33
4.4.3 Procedimentos de preparo de amostras	35
4.4.4 Determinação dos teores totais e frações bioacessíveis.....	36
4.4.5 Determinação nas soluções basais e apicais.....	36

4.4.6	Características dos métodos analíticos.....	36
4.4.7	Tratamento dos dados e análise estatística	38
4.5	Procedimentos de determinação do teor total, da bioacessibilidade e biodisponibilidade de macro e micronutrientes	39
4.5.1	Matéria seca e matéria mineral	39
4.5.2	Quantificação total de carbono, proteína bruta e aminoácidos ..	39
4.5.3	Fibras e extrato etéreo	41
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	Avaliação do procedimento analítico para determinação do teor total dos elementos	44
5.2	Influência do método de cocção sobre o teor total dos elementos	47
5.3	Avaliação do procedimento analítico para estimativa da bioacessibilidade <i>in vitro</i>	50
5.4	Influência do método de cocção e do grau de maturação na bioacessibilidade de elementos essenciais e proteínas	54
5.5	Avaliação da integridade das células Caco-2	58
5.6	Avaliação do procedimento analítico para determinação do conteúdo basal e apical	59
5.7	Avaliação da composição bromatológica.....	64
5.8	Avaliação da bioacessibilidade <i>in vitro</i> de proteínas e composição de aminoácidos	66
5.9	Aspectos nutricionais: suprimento de proteína e elementos essenciais através do consumo de feijão guandu	69
6.	CONCLUSÕES	73
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

O feijão guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) é uma leguminosa originária de países em desenvolvimento da Ásia, África e América do Sul (SUN *et al.*, 2020). De acordo com o relatório *The Global Economy of Pulses* da FAO (RAWAL *et al.*, 2019), o feijão guandu está entre as leguminosas mais relevantes em termos de produção e consumo global, ao lado do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), grão-de-bico, ervilha, lentilha, feijão-caupi, entre outros. A produção mundial anual do feijão guandu alcança cerca de 5,5 milhões de toneladas, representando 5,8% do total global de leguminosas. A Índia é tanto o maior produtor quanto o maior consumidor, respondendo por 90% da produção global (SARKAR *et al.*, 2020; TAPAL *et al.*, 2019).

O feijão guandu é considerado uma das leguminosas mais resistentes à seca, graças ao seu sistema radicular profundo e a um germoplasma com maior ajuste osmótico em comparação com outras leguminosas (KUMAR; SAXENA; SAMEERKUMAR, 2017). Isso permite que as plantas se desenvolvam melhor em condições de baixo potencial hídrico, ajustando suas funções fotossintéticas e a condutância estomática, além de retardar a senescência das folhas (BASU *et al.*, 2016). Apesar dessas características agronômicas vantajosas, a produção de feijão guandu é predominantemente restrita a pequenos produtores. Seu rendimento médio varia consideravelmente, dependendo das práticas agronômicas, da densidade de plantio e da variedade de sementes, visto que é comumente cultivado em consórcio com outras culturas (ADENEKAN *et al.*, 2018; FULLER *et al.*, 2019). Um fator crucial para aumentar a produção em larga escala de sementes de feijão guandu é o desenvolvimento de novas cultivares. Embora a maioria das leguminosas seja naturalmente autofértil, o feijão guandu apresenta um grau de polinização cruzada, realizada por abelhas melíferas, o que possibilita o desenvolvimento de híbridos com características agronômicas aprimoradas (RAWAL *et al.*, 2019). O desenvolvimento de cultivares de feijão guandu mais tolerantes à seca tem sido liderado pelo Centro Internacional de Pesquisa Agrícola em Áreas Secas (ICARDA), no Líbano, e pelo Instituto Internacional de Pesquisa de Cultivos para os Trópicos Semiáridos (ICRISAT), na Índia (SARKAR *et al.*, 2020; SINGH *et al.*, 2018). No Brasil, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) também tem se dedicado à obtenção de cultivares mais adequados ao consumo humano, com tempos de cozimento reduzidos e melhores propriedades tecnológicas (MIANO *et al.*, 2020).

Dados a importância socioeconômica e o potencial do consumo do feijão guandu para dieta humana, esta dissertação de mestrado tem como objetivo explorar estratégias analíticas instrumentais e de calibração para quantificar as frações bioacessível e biodisponível de elementos essenciais presentes em duas variedades de feijão guandu que mesmo originalmente desenvolvidas para alimento animal, apresentaram potencial para consumo humano. Foram realizados ensaios para a determinação dos teores totais de proteína e macro e micronutrientes e estudos *in vitro* visando avaliar a digestão e absorção gastrointestinal destes analitos. Na Figura 1 é apresentado um fluxograma com um resumo das principais etapas realizadas.

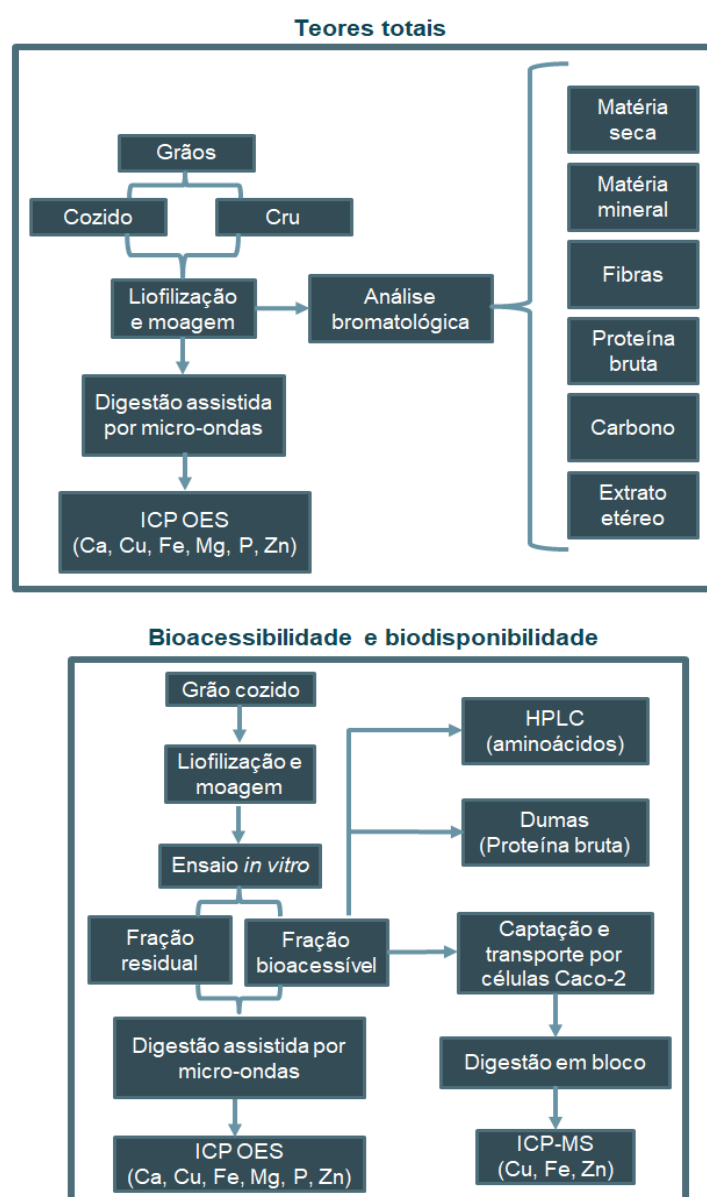


FIGURA 1 - Fluxograma das principais etapas desenvolvidas neste trabalho. Os grãos utilizados foram: feijão guandu (verde e maduro), feijão carioca e feijão preto.

OBJETIVOS

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Avaliar a bioacessibilidade e a biodisponibilidade de elementos essenciais e proteína em amostras de feijão guandu usando modelos de digestão gastrointestinal e absorção *in vitro* e métodos instrumentais baseados em plasma indutivamente acoplado.

2.2 – Objetivos específicos

- Definir procedimentos analíticos para a determinação dos teores totais de Ca, Cu, Fe, Mg, P e Zn em amostras de feijão guandu usando espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS);
- Analisar o teor de proteína total nas amostras de feijão guandu avaliadas;
- Estimar a fração bioacessível de elementos essenciais e proteína nas amostras de feijão guandu após ensaios *in vitro* de digestão simulada;
- Estimar a fração biodisponível de elementos essenciais em feijão guandu após bioensaios com células Caco-2;
- Avaliar a influência de tradicionais métodos de cozimento sobre o teor total, bioacessibilidade e biodisponibilidade dos nutrientes estudados em feijão guandu;
- Avaliar a composição bromatológica (proteína bruta, aminoácidos, fibras, matéria seca, matéria mineral, extrato etéreo) e a influência do estágio de maturação nos teores determinados;
- Avaliar a contribuição dos feijões na nutrição humana comparando com a Ingestão Diária Recomendada (IDR).

***REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA***

3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 – Feijão guandu como fonte alternativa para dieta humana

Grãos de leguminosas são amplamente utilizados na dieta humana e na alimentação animal devido ao seu alto teor de proteínas, composição mineral e de compostos bioativos (CHEN et al., 2015; HOWARD et al., 2018). O cultivo do feijão guandu (*Cajanus cajan* (L. Millsp) é especialmente significativo nas regiões tropicais e subtropicais, com a Índia sendo o principal produtor global, responsável por cerca de 72% da produção total (FAO, 2019). Assim como outras leguminosas, o feijão guandu demonstra uma notável versatilidade e se adapta a diversas condições ambientais, servindo como uma fonte alternativa de alimentos e ração (MIANO et al., 2020). Diante das preocupações globais relacionadas ao crescimento populacional e à segurança alimentar, há uma crescente necessidade de práticas agrícolas inovadoras e do desenvolvimento de novas variedades que ofereçam maiores rendimentos, melhores características tecnológicas e benefícios nutricionais aprimorados (VARSHNEY et al., 2010).

Variedades bem-sucedidas devem atender a critérios essenciais, como características favoráveis de hidratação e cozimento, que são fundamentais tanto para aplicações alimentares domésticas quanto industriais. As propriedades de hidratação e cocção das leguminosas envolvem processos complexos influenciados por fatores como composição da semente, teor de umidade e características da casca da semente. Fatores ambientais relacionados à localização de produção, métodos de colheita e condições de armazenamento também desempenham papéis significativos (VASANTHAKAALAM; KARAYIRE; NYAGAHUNGU, 2020). As características de cocção são critérios comerciais essenciais, fundamentais para garantir a qualidade sensorial (WOOD, 2017).

Diferente da maioria das leguminosas que são predominantemente autopolinizadoras, o guandu se beneficia da polinização cruzada realizada pelas abelhas, o que abre a possibilidade de criar híbridos com características agronômicas superiores (RAWAL et al., 2019). Ao criar novas linhagens de feijão guandu para aprimorar seu valor nutricional ou suas características agronômicas, é crucial avaliar minuciosamente suas propriedades tecnológicas antes de sua introdução ao mercado

consumidor ou ao setor de processamento. Embora a Ásia e a África possuam uma ampla diversidade de variedades de feijão guandu, a América do Sul também possui genótipos que ainda não foram adequadamente caracterizados ou selecionados para uso prático. Nesse contexto, estudos como os realizados por Miano e colaboradores buscaram identificar linhagens de feijão guandu com atributos nutricionais e tecnológicos superiores, examinando parâmetros como amido, proteína, fibra, compostos fenólicos e teor mineral, conforme demonstrado na Tabela 3.1.

TABELA 3.1 - Composição química de diferentes linhagens de feijão guandu (média \pm desvio padrão) (MIANO *et al.*2020).

Parâmetros	g137-99	g146-97	g57-95	g119-99	g184-97	g18-95	g47-94
Hidratação (%)	78,3 \pm 0,7	76,7 \pm 1,2	99,7 \pm 0,5	89,8 \pm 0,6	75,3 \pm 0,8	98,1 \pm 0,1	57,2 \pm 0,6
Amido (% b.s*)	31,7 \pm 0,1	33 \pm 1	36,2 \pm 0,1	32,9 \pm 0,1	35,1 \pm 0,1	31,5 \pm 0,1	30,8 \pm 0,1
Proteína (% b.s)	19,2 \pm 0,1	20,1 \pm 0,1	17,1 \pm 0,1	18,7 \pm 0,1	19,4 \pm 0,2	19,1 \pm 0,3	19,8 \pm 0,1
Fibra insolúvel (% b.s)	26,4 \pm 0,4	21 \pm 0,3	22,2 \pm 0,4	22,7 \pm 0,2	20,8 \pm 0,2	19,2 \pm 0,6	19,1 \pm 0,6
Fibra solúvel (% b.s)	6,7 \pm 0,6	7,4 \pm 0,4	7,9 \pm 0,2	6,9 \pm 0,1	7,1 \pm 0,1	4,4 \pm 0,5	4,3 \pm 0,2
Compostos fenólicos (% b.s)	1,7 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	0,57 \pm 0,02	0,6 \pm 0,1	0,55 \pm 0,02	1,4 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1
Mg (g kg ⁻¹ b.s)	0,89 \pm 0,02	0,94 \pm 0,02	0,79 \pm 0,05	0,77 \pm 0,04	0,88 \pm 0,02	0,48 \pm 0,13	0,58 \pm 0,03
P (g kg ⁻¹ b.s)	2,2 \pm 0,1	2,5 \pm 0,1	2,6 \pm 0,1	2,1 \pm 0,1	2,13 \pm 0,03	2,12 \pm 0,23	2,52 \pm 0,04
S (g kg ⁻¹ b.s)	1,38 \pm 0,02	1,36 \pm 0,04	1,2 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	1,29 \pm 0,02	1,14 \pm 0,13	1,19 \pm 0,02
K (g kg ⁻¹ b.s)	8,1 \pm 0,1	9,1 \pm 0,1	8,51 \pm 0,1	8,5 \pm 0,4	9,3 \pm 0,1	7,3 \pm 0,3	7,7 \pm 0,1
Ca (g kg ⁻¹ b.s)	2,3 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1	1,6 \pm 0,2	1,8 \pm 0,2	1,7 \pm 0,1	1,3 \pm 0,3	1,39 \pm 0,04
Fe (mg kg ⁻¹ b.s)	32,0 \pm 1,1	31,7 \pm 0,1	25,8 \pm 1,3	27,9 \pm 0,7	31,0 \pm 3,2	24,5 \pm 1,5	26,1 \pm 0,5
Cu (mg kg ⁻¹ b.s)	3,2 \pm 0,1	3,8 \pm 0,2	3,2 \pm 0,2	3,5 \pm 0,1	3,6 \pm 0,1	3,2 \pm 0,1	3,14 \pm 0,11
Zn (mg kg ⁻¹ b.s)	44,6 \pm 2,7	38,2 \pm 1,5	31,5 \pm 2,6	28,4 \pm 1,0	35,73 \pm 3,01	32,8 \pm 2,3	37,9 \pm 1,8

* b.s: base seca

Os autores relataram que, apesar das linhagens de feijão guandu apresentarem elevados níveis de cálcio, manganês e fibra, demonstraram teores inferiores de ferro, proteína e zinco quando comparados com leguminosas comercialmente populares, como grão-de-bico e feijão comum. Dada a semelhança na composição nutricional entre as nove linhagens estudadas, a preferência foi dada àquelas com maior capacidade de hidratação, a fim de assegurar uma textura uniforme após o cozimento. Como resultado duas linhagens específicas (g18-95 e g57-95) foram selecionadas e recomendadas para a produção em larga escala devido às suas excelentes propriedades de hidratação e baixo tempo de cozimento, tornando-as opções adequadas para o consumo humano.

Além da avaliação nutricional, as análises sensoriais de um alimento também são parâmetros importantes que servem como suporte técnico para pesquisa, industrialização, marketing e controle de qualidade, assim reforçando sua presença no mercado e no cotidiano da população (ROSSINI; ANZANELLO; FOGLIATTO, 2012). A análise sensorial avalia as características de um produto ou alimento como textura, sabor, aparência e aroma por meio dos sentidos sensoriais (RUIZ-CAPILLAS; HERRERO, 2021). Esse método tem sido utilizado por séculos para determinar se os produtos alimentares devem ser aceitos ou rejeitados. Tradicionalmente, a análise sensorial complementava as avaliações tecnológicas e microbiológicas da qualidade dos alimentos. No entanto, sua evolução nas últimas décadas a tornou uma metodologia chave para garantir a aceitação do consumidor em relação a novos produtos (ŚWIĄDER *et al.*, 2020).

Técnicas sensoriais tradicionais, incluindo avaliações discriminatórias e descritivas, bem como testes de preferência e hedônicos, continuam amplamente utilizadas. No entanto, métodos mais novos e eficientes surgiram, como *check-all-that-apply* (CATA), *napping* (N), *flash profile* (FP) e dominância temporal de sensações (TDS), apoiados por análises estatísticas robustas. Embora essas técnicas sejam valiosas para o desenvolvimento de novos alimentos, não são os únicos determinantes da aceitação de um produto. Fatores como cultura, contexto ambiental, conhecimento nutricional, restrições alimentares, respostas emocionais, considerações de saúde, natureza do produto e embalagem também desempenham papéis significativos (RUIZ-CAPILLAS; HERRERO, 2021).

Diante destas considerações, o feijão guandu tem recebido mais atenção devido a ser uma importante fonte nutritiva, além de apresentar rusticidade e

adaptabilidade à maioria das regiões brasileiras, o que justifica o lançamento de novas cultivares dessa leguminosa. Para introduzir novos feijões no mercado, é fundamental estudar suas características tanto culinárias quanto sensoriais. Em um estudo realizado em 2022 (SILVA *et al.*, 2022), algumas variedades do feijão foram avaliadas por suas características de hidratação e tempo de cozimento como parâmetros, na finalidade de selecionar as variedades mais adequadas ao consumo humano. Foram utilizadas amostras de diferentes variedades de feijão, colocadas em remolho por 16 horas e depois cozidas em uma panela de pressão elétrica por dois períodos: 30 e 45 minutos. Após o cozimento, foi realizado um teste com o polegar e o indicador para verificar se os feijões haviam atingido o tempo de cocção ideal, observando a facilidade de amassar os grãos e a presença de granulações. Segundo os autores, entre as linhagens de feijão guandu analisadas, as variedades g18-95 e g57-95 se destacaram por apresentarem as características ideais para feijões cozidos em apenas 30 minutos, enquanto as demais necessitaram de 45 minutos ou mais. Além disso, essas linhagens demonstraram melhor textura e maior grau de maciez em comparação com as outras, mostrando maior potencialidade para comercialização, pois requerem menos tempo de cozimento, preservando assim a qualidade nutricional do alimento (SILVA *et al.*, 2022).

Um outro estudo levantou dados sobre a aceitação sensorial das variedades g18-95 e g57-95 (SILVA *et al.*, 2020). Nele, as variedades foram preparadas como descrito anteriormente e testadas sensorialmente. A análise sensorial foi realizada em cabines individuais com a participação de 59 provadores (63% homens e 37% mulheres). A maioria dos participantes, cerca de 98%, era consumidora de feijão e 89% já haviam ouvido falar do feijão guandu. Foram avaliados os atributos de aceitação global utilizando uma escala hedônica estruturada de 9 pontos, variando de 1 (desgostei extremamente) a 9 (gostei muitíssimo), e a intenção de compra foi medida com uma escala de 5 pontos, variando de 1 (certamente não compraria) a 5 (certamente compraria). Além disso, foi aplicado o teste CATA, que continha uma lista de 16 termos relacionados às características sensoriais dos produtos, selecionados a partir de um levantamento de atributos. Para a linhagem g-18, as médias nas escalas hedônicas e estruturadas foram de 7,0 e 3,9, respectivamente, enquanto a linhagem g-57 apresentou médias de 6,8 e 3,7. Os atributos que se destacaram no CATA para ambas as linhagens foram "macio", "sabor suave" e "sabor característico de feijão tradicional". Segundo os autores, as duas

linhagens mostraram boa aceitação sensorial e têm potencial para comercialização.

Desenvolvedores de novos produtos alimentares devem considerar não somente as qualidades nutricionais, mas também as atitudes e expectativas dos consumidores. Obter referências sobre as experiências sensoriais dos potenciais consumidores fomenta a inovação e orienta o desenvolvimento (KUMAR *et al.*, 2021). Por essas razões, a análise sensorial combinada com a pesquisa de consumidores é reconhecida por profissionais da indústria e pesquisadores como uma ferramenta essencial em todas as etapas do desenvolvimento de novos produtos, desde o design até a comercialização (GŁUCHOWSKI *et al.*, 2021).

3.2 – Estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade

Elementos essenciais são fundamentais para o funcionamento adequado do corpo humano. Cálcio e fósforo são indispensáveis para a manutenção da saúde dos ossos e dentes, enquanto potássio e magnésio são cruciais para o equilíbrio de fluidos e a transmissão de impulsos nervosos. Cobre e zinco desempenham papéis vitais em várias reações enzimáticas e na função imunológica, e ferro é necessário para a produção de hemoglobina, que transporta oxigênio para as células do corpo (SANTOS; DE HIGUEIRA; NOGUEIRA, 2022). Como o organismo não é capaz de sintetizar esses elementos é necessário obtê-los através da alimentação. Desta forma, o feijão guandu, assim como outras leguminosas, exerce um papel significativo para pequenos agricultores em regiões tropicais e subtropicais, contribuindo para a segurança alimentar e para a oferta de nutrientes, especialmente ao fornecer uma importante fonte de proteínas, minerais e fibras. Esta contribuição é particularmente relevante devido à frequente deficiência nutricional nessas áreas, agravada pelo rápido crescimento populacional e pelos altos custos dos alimentos de origem animal (SAXENA *et al.*, 2017).

As leguminosas são fontes sustentáveis de proteína vegetal e desempenham um papel crucial na segurança alimentar futura, contendo de 17 a 30% de proteína, predominantemente na forma de globulinas solúveis em sal (legumina e vicilina) e albuminas solúveis em água, além de algumas glutelinas e prolaminas (PEREZ-MORAL *et al.*, 2023). Essas proteínas são ricas em aminoácidos essenciais, com destaque para a lisina, que está ausente nas proteínas dos cereais (HERREMAN *et al.*, 2020). No entanto, o valor nutricional das leguminosas depende, de forma mais

precisa, da quantidade de aminoácidos que são efetivamente absorvidos, o que está relacionado à sua liberação da proteína e da matriz alimentar para o lúmen intestinal durante a digestão. A digestibilidade das proteínas das leguminosas é geralmente estimada em cerca de 65-70%, embora existam grandes variações, que parecem depender da origem botânica, bem como dos tratamentos de processamento e das metodologias de digestão (GU *et al.*, 2023).

A ingestão de fibras dietéticas (ou fibra alimentar) oferece diversos benefícios à saúde. Um consumo adequado de fibras pode reduzir o risco de desenvolver doenças como doença coronariana, acidente vascular cerebral, hipertensão, diabetes, obesidade e certos problemas gastrointestinais (ANDERSON *et al.*, 2009). Além disso, o aumento na ingestão de fibras dietéticas melhora os níveis de lipídios no sangue, reduz a pressão arterial, facilita o controle da glicose no diabetes, favorece a regularidade intestinal, auxilia na perda de peso e parece fortalecer a função imunológica (ANDERSON *et al.*, 2004; BIRKETVEDT *et al.*, 2005). Tradicionalmente, as fibras dietéticas eram definidas como as porções dos alimentos vegetais que eram resistentes à digestão pelas enzimas digestivas humanas, incluindo polissacarídeos e lignina. Essa definição foi ampliada para incluir oligosacarídeos, como a inulina, e amidos resistentes. De forma simplificada, as fibras foram classificadas como solúveis, como as fibras viscosas ou fermentáveis (como a pectina), que são fermentadas no cólon, e insolúveis, como o farelo de trigo, que possuem ação volumosa, mas são fermentadas de forma limitada no cólon (ANDERSON *et al.*, 2009). Em feijão guandu, a presença de fibras traz resistência à digestão no intestino delgado e grosso, favorecendo a fermentação pelas bactérias e a produção de ácidos graxos de cadeia curta (ABEBE, 2022). As fibras alimentares, tanto solúveis quanto insolúveis, têm mostrado efeitos positivos na redução do colesterol sanguíneo e na resposta glicêmica. Suas raízes contêm aproximadamente 22% de fibras solúveis e 19% de fibras insolúveis (BROWN *et al.*, 1999; MALLILLIN *et al.*, 2008).

Para determinar com precisão o valor nutricional de um alimento, é necessário avaliar a quantidade de nutrientes disponível para a absorção intestinal por meio de estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade. A bioacessibilidade refere-se à fração de um nutriente que, após a digestão, é liberada da matriz alimentar e torna-se potencialmente disponível para absorção pelas células intestinais (CARDOSO *et al.*, 2015). Já a biodisponibilidade descreve a fração do nutriente que,

após ser liberada, é efetivamente absorvida pelo organismo e utilizada em funções fisiológicas ou armazenada (VERHOECKX *et al.*, 2015). O processo é resumidamente composto por três etapas principais: i) a bioacessibilidade do nutriente no trato gastrointestinal, ii) a absorção pelas células intestinais específicas, e iii) o transporte para a circulação sanguínea. Esses estudos podem ser realizados por métodos *in vivo*, considerados o padrão ideal, ou por modelos *in vitro* que simulam as condições fisiológicas e físico-químicas do trato gastrointestinal humano (XU *et al.*, 2021).

Os estudos mais representativos e precisos para avaliar a biodisponibilidade são os testes *in vivo*, que envolvem experimentos com animais ou humanos e consideram as complexas interações dos processos fisiológicos. Embora esses testes ofereçam uma representação mais fiel das condições reais, enfrentam desafios significativos, tais como altos custos e extensa demanda de tempo e restrições éticas, especialmente no que diz respeito à avaliação de possíveis riscos à saúde humana (BOYD *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2021). Em contrapartida os modelos *in vitro* emergem como alternativas promissoras, capazes de superar algumas das limitações associadas aos ensaios *in vivo*.

Os métodos *in vitro* consistem na realização de experimentos que replicam os processos bioquímicos e fisiológicos da digestão humana, incluindo fatores como a composição enzimática dos fluidos digestivos sintéticos, valores específicos de pH em diferentes fases da digestão, temperatura e tempo de digestão (MARCANO; HERNANDO; FISZMAN, 2015). Após a simulação do processo de digestão gastrointestinal, espera-se que a fração dos elementos bioacessíveis esteja solubilizada no extrato resultante (fração bioacessível ou quimo), desde que não haja erros sistemáticos durante o procedimento. A parte sólida que permanece é denominada fração residual ou não-bioacessível. Para avaliar a biodisponibilidade *in vitro* são conduzidos experimentos adicionais que simulam o processo de absorção dos elementos solubilizados no quimo.

Diversas abordagens para métodos de digestão *in vitro* foram apresentadas, com diferentes níveis de complexidade, para estimar a bioacessibilidade de vários elementos em amostras alimentares. Métodos dinâmicos como o SHIME (Simulador do Ecosistema Microbiano Intestinal Humano), o TIM (Modelo Gastrointestinal da TNO) e o sistema DIDGI[®] são altamente sofisticados e incorporam parâmetros como atividades variáveis de enzimas e mudanças de pH durante a digestão, proporcionando uma maior semelhança com as condições *in vivo*

(LI *et al.*, 2020). Entre esses, o Sistema Gastrointestinal Humano Dinâmico (DHIS, *Dynamic Human Stomach-Intestine System*) é um dos métodos mais avançados, utilizando um modelo de estômago em silicone, com morfologia e anatomia que imitam o estômago humano real, produzido por tecnologia de impressão 3D (LI *et al.*, 2020). No entanto, apesar de suas características avançadas, seu uso ainda é limitado devido ao alto custo, tempo para a realização dos experimentos e à necessidade de equipamentos específicos, sendo condições indisponíveis na maioria dos laboratórios de rotina.

A maioria dos estudos de bioacessibilidade *in vitro* utiliza métodos estáticos nos ensaios. Nessas abordagens as condições bioquímicas nos diferentes compartimentos do trato digestivo (enzimas, sais biliares, pH, temperatura) são mantidas em valores médios constantes, diferente das variações dinâmicas que ocorrem *in vivo* (MINEKUS *et al.*, 2014). A rede internacional COST INFOGEST desenvolveu e atualizou um protocolo padronizado para ensaios de digestão *in vitro* (BRODKORB *et al.*, 2019; MINEKUS *et al.*, 2014). No entanto, a disponibilidade limitada de enzimas digestivas específicas e o alto custo de reagentes e kits para a determinação da atividade enzimática ainda restringem a aplicação desse protocolo em muitos laboratórios. A digestão simulada geralmente emprega frascos tipo Erlenmeyer ou tubos de centrífuga como biorreatores, dependendo do equipamento disponível para a incubação. Dentro dos recipientes, cada fase da digestão é replicada misturando a amostra com fluidos digestivos artificiais (Figura 3.1).

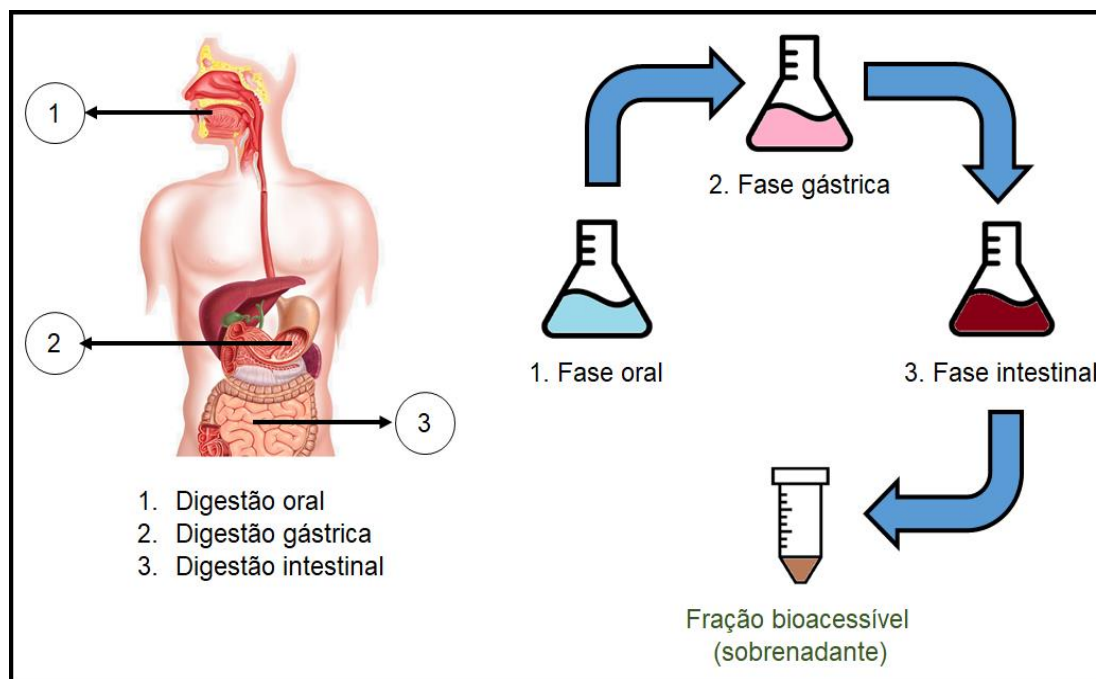


FIGURA 3.1 - Representação esquemática de um modelo de digestão *in vitro* estático baseado em três etapas. A fase oral é recomendada em aplicações em amostras contendo carboidratos, sendo opcional em alguns casos (Imagem gerada no BioRender, versão gratuita).

Modelos estáticos de digestão *in vitro* são comumente utilizados para estimar a fração bioacessível de diversos constituintes orgânicos e inorgânicos em amostras vegetais. Esses modelos têm o objetivo de avaliar a qualidade nutricional dos alimentos e/ou identificar potenciais riscos de contaminação. A Tabela 3.2 ilustra algumas aplicações desses modelos para a avaliação da bioacessibilidade de elementos essenciais e contaminantes em amostras vegetais.

TABELA 3.2 - Aplicações de modelo *in vitro*, em amostras vegetais, para avaliação da bioacessibilidade de elementos essenciais e contaminantes.

Amostras	Elementos	Digestão <i>in vitro</i>	Método(s) analítico(s)	Referência
Amaranto, quinoa e chia	Al, B, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, V, Zn	Fluido salivar (pH = 7,0; 37 °C; 10 min); fluido gástrico (pH = 3,0; 37 °C; 2h); fluido intestinal (pH = 7,0; 37 °C; 2h)	MIP OES	CLASEN <i>et al.</i> , 2023
Feijão-vermelho	Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Pb, Zn	Fluido salivar (pH = 7,0; 37 °C; 10 min); fluido gástrico (pH = 3,0; 37 °C; 2h); fluido intestinal (pH = 7,0; 37 °C; 2h)	MIP OES	PEREIRA <i>et al.</i> , 2020
Endro, salsa, hortelã-verde, tomilho, alecrim, orégano	Fe, Cu, Zn, Mg, Pb, Ni, and Co	Fluido salivar (pH = 7,0; 37 °C; 10 s); fluido gástrico (pH = 1,0; 37 °C; 1h), fluido intestinal (pH = 6,0; 37 °C; 4h)	ICP OES	CHOLEVA <i>et al.</i> , 2023
Variedades de feijão (preto, rajado, rosinha, bolinha, fradinho, jalo)	Ca, Cu, Fe, S, Zn	Fluido gástrico (pH = 1,5; 36 °C; 2h), fluido intestinal (pH = 6,8; 36 °C; 2h)	ICP OES	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2018
Polpa de açaí	Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, and Zn	Fluido gástrico (pH = 1,5; 36 °C; 2h), fluido intestinal (pH = 6,8; 36 °C; 2h)	ICP OES	SANTOS <i>et al.</i> , 2021
Alface, repolho-chinês (pak choi), couve-flor	Cu, Fe, Mn, and Zn	Fluido gástrico (pH = 2,1; 37 °C; 2h), fluido intestinal (pH = 6,4; 37 °C; 2h)	ICP OES; ICP-MS	YIN <i>et al.</i> , 2017

3.3 – Uso de células em estudos de biodisponibilidade

O intestino delgado é o principal local de absorção de nutrientes e potenciais contaminantes da matriz alimentar após o processo digestivo, sendo responsável por cerca de 90% da absorção intestinal total (XU *et al.*, 2021). A absorção desses elementos pode ocorrer de duas maneiras distintas: ativa e passiva. O transporte ativo é um processo que requer energia para mover substâncias contra um gradiente de concentração, utilizando proteínas transportadoras específicas (LEME, 2015). O transporte passivo ocorre por difusão ao longo de um gradiente de concentração e pode se dar de duas formas: através das junções de oclusão entre células intestinais adjacentes (via paracelular) ou diretamente através da membrana celular (via transcelular). No transporte transcelular, a difusão pode ser simples ou mediada por transportadores que não demandam energia (MA; NIGHOT; AL-SADI, 2018).

Devido à complexidade do processo de absorção, a avaliação da biodisponibilidade *in vitro* é crucial e apresenta desafios significativos. Após a simulação da digestão é necessário realizar experimentos adicionais que reproduzam os processos celulares intestinais responsáveis pela absorção dos elementos bioacessíveis solubilizados no quimo (YOUHANNA; LAUSCHKE, 2021). Métodos baseados em culturas celulares são amplamente utilizados para essa finalidade, especialmente na pesquisa farmacêutica para investigar a absorção de novos fármacos, apresentando resultados consistentes com os modelos *in vivo* (VAN BREEMEN; LI, 2005). Nesse contexto, diversas linhagens celulares têm sido propostas, sendo a linhagem Caco-2 uma das mais conhecidas e empregadas para esses estudos.

As células Caco-2, derivadas de um adenocarcinoma de cólon humano, foram inicialmente introduzidas na década de 1980 como um modelo para simular a absorção pelo epitélio intestinal (SHARMA *et al.*, 2020; VAN BREEMEN; LI, 2005). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) atualizou os requisitos para ensaios de permeabilidade de fármacos com a RDC nº 749 (ANVISA, 2022). Essas regulamentações estabelecem critérios para isentar estudos *in vivo*, recomendando o uso de células Caco-2 como uma alternativa para avaliar a absorção de medicamentos genéricos, similares, novos e inovadores. Essas diretrizes refletem uma tendência de promover métodos alternativos aos testes em animais,

evidenciando a relevância contínua do modelo celular Caco-2 para pesquisas sobre biodisponibilidade.

É fundamental destacar que o modelo celular Caco-2 possui algumas limitações quando utilizado para estudos de biodisponibilidade. Embora o modelo seja composto predominantemente por enterócitos (células epiteliais diferenciadas com microvilosidade), ele não replica completamente a complexidade do epitélio intestinal humano, do qual também se inclui outros tipos de células, como as células caliciformes, responsáveis pela secreção de muco, e as células endócrinas, que liberam hormônios intestinais em resposta a estímulos como a absorção de nutrientes (VERHOECKX *et al.*, 2015). Para a utilização em estudos de biodisponibilidade, as células Caco-2 são inicialmente cultivadas em frascos de cultura e, posteriormente, semeadas em insertos poliméricos semipermeáveis, como os do tipo Transwell®, que são colocados em placas de cultura.

No modelo intestinal *in vitro*, como ilustrado na Figura 3.2, a monocamada celular no inserto cria uma barreira física e bioquímica que divide a placa em dois compartimentos distintos: o compartimento superior (apical), que simula o lúmen intestinal, e o compartimento inferior (basal), que simula a matriz extracelular. O extrato (quimo) contendo as espécies bioacessíveis de interesse é adicionado ao compartimento apical da placa, enquanto uma solução de transporte, que simula condições fisiológicas, é colocada no compartimento basal. Após a incubação das células sob condições apropriadas a fração biodisponível do elemento será encontrada na solução de transporte do compartimento basal, evidenciando a absorção do nutriente ou contaminante através da monocamada celular (BEISEIGEL *et al.*, 2007; LEME, 2015).

A confiabilidade do bioensaio com células Caco-2 para estimar a absorção intestinal depende da capacidade dessas células de replicar com precisão as características da integridade da barreira intestinal *in vivo* (SHAUGHNESSEY *et al.*, 2022). A integridade das monocamadas celulares formadas após o período de diferenciação pode ser avaliada medindo a resistência elétrica transepitelial (TEER, Transepithelial Electrical Resistance) com o auxílio de equipamentos especializados (SRINIVASAN *et al.*, 2015). Em geral, valores de TEER superiores a 250 Ω cm² indicam que as monocamadas possuem uma integridade adequada e são apropriadas para a realização dos experimentos (FELIX *et al.*, 2021). O modelo celular Caco-2 tem sido amplamente utilizado para a avaliação *in vitro* da biodisponibilidade de elementos

essenciais e contaminantes em diversas amostras alimentares, conforme evidenciado nas aplicações mais recentes apresentadas na Tabela 3.3.

TABELA 3.3 - Aplicações do modelo celular Caco-2 em ensaios *in vitro* para estudos de biodisponibilidade em alimentos.

Amostras	Elementos	Digestão <i>in vitro</i>	Solução de transporte	Método(s) analítico(s)	Referência
Queijos	Ca, Mg, Zn	Fluido salivar (pH = 7,0; 2 min); fluido gástrico (pH = 3,0; 2h); fluido intestinal (pH = 7,0; 2h)	Meio salino (NaCl + KCl + Glicose + HEPES)	F AAS	TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2022
Espinafre e repolho chinês (pakchoi)	Ca, Cd, Pb	Fluido gástrico (pH = 1, 5; 1h); fluido intestinal (pH = 7,0; 4h)	Meio de cultura (DMEM)	ICP OES; ICP-MS	FU; CUI, 2013
Arroz branco e integral	As	Fluido salivar (pH = 6,5; 5 min); fluido gástrico (pH = 1.1; 2h); fluido intestinal (pH = 7,0; 2h)	Meio de cultura (DMEM)	ICP-MS	LEE <i>et al.</i> , 2018
Feijão	Ca, Fe, Mg, Zn	Fluido salivar (pH = 7,0; 2 min); fluido gástrico (pH = 3,0; 2h); fluido intestinal (pH = 7,0; 2h)	Meio salino (NaCl + KCl + MgSO ₄ + Glicose + HEPES)	HRCS-F AAS; ICP-MS	FARIA <i>et al.</i> , 2018
Alface, amaranto, repolho, couve, espinafre	Cu, Fe, Mn, Zn	Fluido gástrico (pH = 1, 5; 1h); fluido intestinal (pH = 7,0; 4h)	Meio de cultura (DMEM)	ICP OES; "ICP-MS	CAI <i>et al.</i> , 2017
Trigo fortificado	Se	Fluido salivar (pH = 7,0; 10 min); fluido gástrico (pH = 3,0; 2h); fluido intestinal (pH = 7,0; 2h)	Meio salino (NaCl + KCl + Glicose + HEPES)	GF AAS	DELAQUA <i>et al.</i> , 2022
Feijão fortificado	Fe, Zn	Fluido salivar (pH = 7,0; 2 min); fluido gástrico (pH = 3,0; 2h); fluido intestinal (pH = 7,0, 2h)	Meio de cultura (MEM)	ICP OES	BRIGIDE <i>et al.</i> , 2019

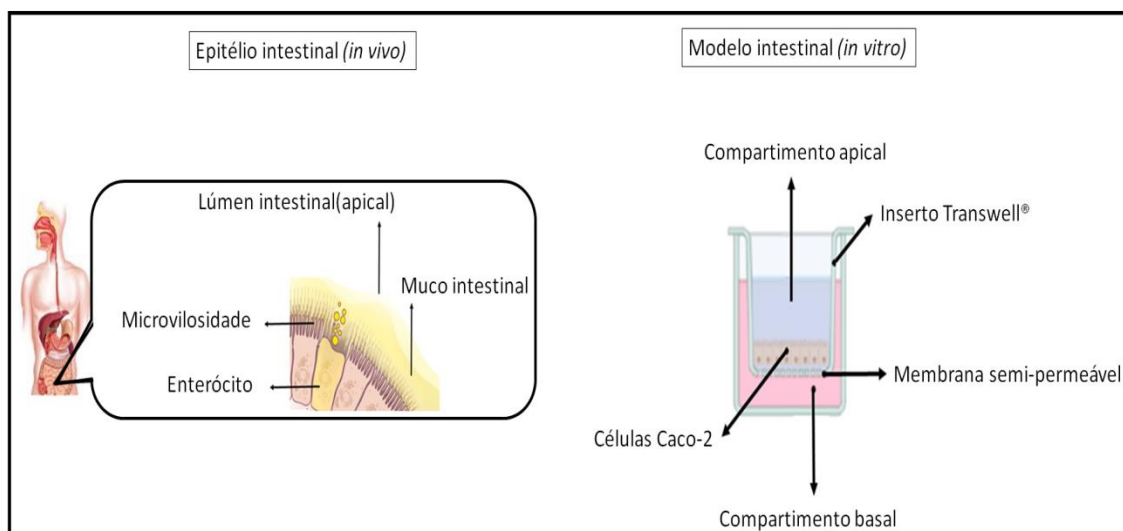


FIGURA 3.2 - Representação do modelo intestinal humano (imagem gerada no BioRender, versão gratuita).

3.4 – Quantificação das frações bioacessível e biodisponível

As soluções obtidas a partir dos ensaios *in vitro* são analisadas para quantificar o elemento de interesse, fornecendo estimativas de bioacessibilidade e/ou biodisponibilidade. A escolha de uma técnica analítica adequada é, portanto, essencial para a precisão dos resultados. Como evidenciado nas Tabelas 2 e 3 das seções anteriores, técnicas baseadas em plasma de argônio são amplamente utilizadas para a quantificação de múltiplos elementos. A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) são métodos consolidados que oferecem alta sensibilidade e precisão para a determinação multielementar, com limites de detecção na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} , respectivamente (NARDI *et al.*, 2009; OLESZCZUK *et al.*, 2007).

No entanto, as soluções obtidas dos experimentos de digestão *in vitro* (quimo) e dos bioensaios com células Caco-2 (solução de transporte) contêm quantidades relativamente elevadas de compostos orgânicos, o que pode representar dificuldades analíticas significativas devido ao alto teor de carbono, sólidos dissolvidos totais (TDS) e potenciais efeitos de matriz (THOMAS, 2004). Independentemente do método de digestão *in vitro* escolhido, o extrato gastrointestinal resultante sempre apresenta uma amostra complexa com quantidades consideráveis de compostos de

carbono provenientes dos reagentes utilizados nos ensaios (como pepsina, pancreatina, sais biliares e bicarbonato), os quais podem causar efeitos significativos de matriz na determinação elementar por métodos baseados em plasma (SERRANO *et al.*, 2021). Para contornar essas dificuldades, diversas abordagens analíticas têm sido desenvolvidas, incluindo estratégias de preparo de amostras e a otimização de métodos instrumentais e de calibração (PEREIRA *et al.*, 2020; CHOLEVA *et al.*, 2023; CLASEN *et al.*, 2023).

Além disso, a análise elementar do quimo por métodos espectroanalíticos pode ser impraticável em algumas situações devido à alta concentração de eletrólitos utilizados para simular os fluidos digestivos. Esses eletrólitos podem contribuir para altos valores de branco analítico, aumentando os limites de quantificação (LOQ, *Limit of Quantification*) e dificultando a quantificação de elementos nutricionalmente relevantes, como Ca e Mg (REBELLATO *et al.*, 2022). Nesse contexto existem modelos mais simples que oferecem uma alternativa viável para estimar a bioacessibilidade de elementos químicos utilizando técnicas de plasma (LAPARRA *et al.*, 2003).

3.5 – Estratégias de preparo de amostras e alternativas instrumentais para procedimentos de análise direta

Para quantificar a fração bioacessível utilizando ICP OES e ICP-MS, o método mais comum envolve um preparo da amostra que visa destruir a matriz orgânica do extrato (quimo). Tradicionalmente este preparo inclui a decomposição em mufla a aproximadamente 550°C, seguida pela dissolução das cinzas resultantes para a quantificação de elementos como Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn e Zn (GABAZA *et al.*, 2018; GWALA *et al.*, 2020). No entanto é importante destacar que o uso de altas temperaturas em recipientes abertos pode levar à perda de elementos voláteis, o que compromete a determinação de elementos como As, Hg e S. Além disso o risco de contaminação da amostra é uma limitação significativa associada aos sistemas abertos (ROCHA; NÓBREGA; KAMOGAWA, 2016). Como alternativa a literatura apresenta trabalhos que abordam o uso de blocos digestores, onde ácido nítrico concentrado é aplicado ao quimo em um bloco aquecido para decompor a amostra e quantificar a fração bioacessível após o ensaio de digestão *in vitro* (CHEN, SINGH, KITTS, 2020; FERREIRA *et al.*, 2022). Neste enfoque, Gedik propôs a determinação

da fração bioacessível de Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn em moluscos por ICP OES e ICP-MS (GEDIK, 2018). Após a digestão a solução foi diluída para manter a acidez residual em níveis adequados para as análises ($\leq 10\% v v^{-1}$ para ICP OES e $\leq 1\% v v^{-1}$ para ICP-MS). É fundamental manusear ácidos concentrados com extremo cuidado devido à sua alta corrosividade, risco de acidentes e também considerar a possibilidade de contaminação das soluções caso os ácidos não forem ultrapuros ou previamente destilados abaixo do ponto de ebulição.

Para contornar as limitações associadas ao uso de ácidos concentrados, meios alternativos como a decomposição assistida por radiação micro-ondas combinada com ácido nítrico diluído e peróxido de hidrogênio, têm se mostrado eficazes no preparo de amostras (PINHEIRO *et al.*, 2019). A decomposição do H_2O_2 gera oxigênio, que promove a regeneração do HNO_3 , permitindo a utilização de concentrações ácidas mais baixas sem perder a eficácia na decomposição da amostra (ARAÚJO *et al.*, 2002). A decomposição micro-ondas com ácido diluído tem sido bem-sucedida em estudos de bioacessibilidade elementar, como demonstrado por Santos e colaboradores (2022), que usaram HNO_3 a $7,0 \text{ mol L}^{-1}$ e H_2O_2 para decompor o sobrenadante de digestões *in vitro* de filé de tilápia e quantificar a fração bioacessível de macronutrientes por ICP OES.

Analisar diretamente o quimo sem realizar a decomposição da matriz orgânica é uma alternativa viável para minimizar os riscos de contaminação. No entanto, ambos os métodos são suscetíveis a interferências, que podem ser espectrais ou não-espectrais. Essas interferências podem ocorrer durante a introdução da amostra (transporte e nebulização), ou devido a variações nas condições energéticas do plasma no ICP (THOMAS, 2004). Teores elevados de carbono na matriz podem causar efeitos severos, como reações de transferência de carga, que aumentam o sinal para elementos como As, Se e P e também efeito de supressão de sinal, para elementos como Ca, Mg, Fe e Mn, devido à redução da energia necessária para a decomposição da matriz orgânica (LECLERCQ *et al.*, 2015).

Devido aos teores máximos de sólidos dissolvidos ($0,1\% m v^{-1}$) e de acidez residual ($1\% v v^{-1}$) que o ICP-MS pode suportar, frequentemente é necessário diluir as amostras para evitar a desestabilização do plasma e a formação de depósitos de sais e carbono nos componentes da interface do equipamento. Amostras com teores de sólidos dissolvidos superiores a $0,1\%$ podem comprometer o desempenho

do plasma e causar problemas operacionais. Além disso, um desafio considerável na análise por ICP-MS é a presença de interferências espectrais, que podem ser causadas por íons poliatômicos ou por íons da matriz com a mesma razão massa/carga (m/z) do analito (THOMAS, 2004). Essas interferências são comuns devido à composição dos fluidos digestivos sintéticos utilizados na simulação da digestão *in vitro* e ao meio salino empregado na solução de transporte para os ensaios de biodisponibilidade. Para mitigar essas interferências diversas abordagens instrumentais podem ser empregadas, como o uso de células de colisão e reação. Por exemplo, Liao e colaboradores demonstraram a eficácia de uma célula de colisão preenchida com hélio para remover interferências poliatômicas de $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ durante a quantificação de $^{75}\text{As}^+$ em amostras de moluscos após um ensaio de digestão *in vitro* (LIAO *et al.*, 2018). O extrato resultante foi filtrado através de um filtro de acetato de celulose (0,22 μm) antes da análise direta por ICP-MS para evitar a presença de partículas que poderiam interferir nas análises e causar bloqueio no nebulização.

Uma alternativa eficaz para contornar as limitações associadas à diluição excessiva da amostra é a utilização do sistema HMI[®] (High Matrix Introduction). Este aparelho controla o fluxo de argônio entre a câmara de nebulização e a tocha para diluir o aerossol da amostra antes de entrar no plasma, permitindo a análise de soluções com altos teores de sólidos dissolvidos e acidez residual (AGILENT TECHNOLOGIES, 2020). Além de possibilitar a análise de amostras complexas, a diluição do aerossol minimiza erros e contaminações que podem ocorrer com métodos de diluição convencionais. O HMI[®] tem sido utilizado com sucesso para a determinação de elementos em amostras complexas, como urina e soluções de diálise (BARROS *et al.*, 2018), medicamentos líquidos (LORENÇATTO; ARANTES DE CARVALHO; OLIVEIRA, 2020), e sangue (CAÑABATE *et al.*, 2017). Assim a tecnologia HMI[®] se apresenta como uma estratégia promissora para análises diretas em estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Instrumentação

Um espectrômetro óptico de emissão com plasma indutivamente acoplado (Agilent 5110 ICP OES, Santa Clara, CA, EUA), equipado com um arranjo de visão dupla vertical síncrona (SVDV) e um nebulizador DuraMist™ (Glass Expansion, Port Melbourne, Victoria, Australia), e um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado modelo (ICP-MS 7800, Agilent, Santa Clara, CA, EUA) foram utilizados para determinar os teores totais e as frações bioacessíveis e biodisponíveis de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn. As condições instrumentais aplicadas aos espectrometros estão detalhadas nas Tabela 4.1 e Tabela 4.2, respectivamente. O gás argônio de alta pureza (> 99,99%), fornecido pela White Martins-Praxair (Sertãozinho, Brasil), foi utilizado para geração do plasma, nebulização e gás auxiliar e o He de alta pureza (99,9999%) (White Martins-Praxair, Sertãozinho, SP, Brasil) foi utilizado na célula de colisão do ICP-MS.

TABELA 4.1 - Parâmetros instrumentais aplicados ao ICP OES.

Parâmetro Instrumental	Condição operacional
Potência de radiofrequência aplicada (kW)	1,2
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	12
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,7
Profundidade de amostragem (mm)	150
Nebulizador	DuraMist®
Câmara de nebulização	Ciclônica
Modo de visualização	SVDV
Número de réplicas	3
Analitos	Comprimento de onda (nm)
Ca, Cu, Fe, Mg, P, Zn	Ca (I) 183,944; Cu (I) 327,395; Fe (II) 238,204; Mg (II) 279,078; P (I) 214,914; Zn (I) 213,857

(I): linha atômica; (II): linha iônica

TABELA 4.2 – Parâmetros instrumentais aplicados ao ICP-MS

Parâmetro Instrumental	Condição operacional
Potência de radiofrequência aplicada (kW)	1,5
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,6
Vazão de He na célula de colisão (mL min ⁻¹)	4,5
Nebulizador	MiraMist®
Câmara de nebulização	Tipo Scott
Número de réplicas	3
Isótopo (m/z)	⁵⁶ Fe ⁺ , ⁶⁴ Zn ⁺ , ⁶⁵ Cu ⁺

A cultura das células foi realizada utilizando uma incubadora modelo MCO-17AC (Sanyo Electric Co., Osaka, Japão), com 95% de umidade relativa e 5% de CO₂, e uma bancada de fluxo laminar vertical (AV-100, Telstar, Barcelona). O crescimento celular foi observado com um microscópio invertido Axiovert 40 CFL, enquanto a contagem celular foi feita com um microscópio Primo Star (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Além disso, foram usados outros equipamentos, como uma estação de aspiração (Gilson Inc., Midleton, EUA) e uma centrífuga 5810R (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

Para o preparo das amostras foi utilizado um sistema de digestão assistida por radiação micro-ondas Multiwave Go (Anton-Paar GmbH, Graz, Áustria), com 12 frascos de PTFE-TFM (PTFE modificado) e um bloco digestor (Tecnal, Piracicaba, Brasil) com frascos de PFA (*perfluoroalkoxy*). A digestão gastrointestinal *in vitro* foi realizada em um banho termostático com agitação (Dubnoff, Novatecnica, São Paulo, Brasil). O ajuste de pH foi feito com um medidor de pH modelo W3B (BEL, Monza, Itália), e a separação do sobrenadante foi realizada em uma centrífuga modelo Excelsa II 206 (FANEM, São Paulo, Brasil). Para liofilização e moagem das amostras, foram utilizados um liofilizador modelo LIOTOP L108[®] (Edwards, Reino Unido) e um moinho de lâminas IKA[®] (IKA-Werke, Staufen, Alemanha), respectivamente. O método de cocção foi realizado com uma panela de pressão elétrica (Modelo PE-09, Mondial, Manaus, Brasil).

4.2 – Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (resistividade de 18,2 MΩ cm) obtida de um sistema de purificação Milli-Q (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Utilizou-se ácido nítrico (65% m m⁻¹), previamente purificado por destilação abaixo do ponto de ebulição (Berghof, Eningen, Alemanha) e peróxido de hidrogênio (30% m m⁻¹) da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA) para o preparo das amostras. Os fluidos digestivos simulados para o ensaio de digestão *in vitro* foram preparados com os seguintes reagentes e enzimas: bicarbonato de sódio ACS EMSURE[®] (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), ácido clorídrico previamente purificado por destilação abaixo do ponto de ebulição, hidróxido de sódio (≥ 98%), acetato de sódio (≥ 99%), ácido acético glacial (≥ 99,97%), α-amilase de fonte biológica *Bacillus* sp. (A3306, 2000 – 60000 unidades mL⁻¹ unidades mL⁻¹), pepsina

de mucosa gástrica suína (P7000, ≥ 250 unidades mg^{-1}), pancreatina de pâncreas suíno (P1750, 4x especificações USP) e sais biliares (B8756, 50% colato de sódio e 50% desoxicolato de sódio), todos fornecidos pela Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). As soluções de calibração para a determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, P e Zn foram preparadas utilizando soluções estoque mono-elementares de 1000 mg L^{-1} da Specsol (São Paulo, Brasil).

Para a cultura celular e ensaios de biodisponibilidade, foram utilizados o meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium $4,5 \text{ g L}^{-1}$ de glicose), bicarbonato de sódio (BioReagent, $\geq 99,5\%$), solução salina tamponada com fosfato (PBS sem Ca^{2+} e Mg^{2+}), solução de tripsina-EDTA $0,25\%$ (BioReagent), cloreto de potássio, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio e glicose, todos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA), além de soro fetal bovino inativado (FBS) da Cripion (Andradina, SP, Brasil). Com exceção dos materiais exclusivos para o cultivo celular, todas as vidrarias e recipientes plásticos foram descontaminados por imersão em solução de HNO_3 10% (v v^{-1}) por 24 horas e posteriormente lavados com água ultrapura antes do uso.

4.3 – Amostras e pré-preparo

Dois linhagens de feijão guandu, obtidas na Embrapa Pecuária Sudeste, foram disponibilizadas para o desenvolvimento do projeto. Dessas linhagens, foram utilizados tanto os grãos verdes (denominados g18-95V e g57-95V), os quais foram coletados imediatamente antes da realização dos experimentos, quanto os grãos maduros (g18-95 e g57-95), já coletados e armazenados em câmara fria. Além do feijão guandu, também foram utilizadas amostras comerciais de feijão carioca e feijão preto, ambas anteriormente estudadas por outros autores (FARIA *et al.*, 2018, FEITOSA *et al.*, 2018, OLIVEIRA *et al.*, 2018, PEREIRA *et al.*, 2020). Todas as amostras foram armazenadas em câmara fria em condições controladas de temperatura ($+ 10^\circ\text{C}$), ventilação e umidade. Uma parte das amostras (100 g de cada feijão) foi destinada à cocção. Uma segunda parte (100 g de cada) foi destinada à secagem e moagem. Outra fração foi destinada às análises bromatológicas.

A fração destinada à cocção foi lavada com água ultrapura e deixada de molho por 16 horas à temperatura ambiente. Após molho, os grãos foram lavados e então realizou-se o cozimento das amostras em uma panela de pressão elétrica

(PE-09, Mondial) por 20 minutos, usando 400 mL de água ultrapura. Tal condição foi selecionada baseando-se em experimentos prévios, a fim de obter grãos macios e mastigáveis. Após cozimento, a água resultante foi retirada, e tanto os grãos cozidos quanto os grãos crus foram submetidos às etapas de secagem e moagem utilizando um liofilizador (LIOTOP L108, Liobras) e um moinho portátil (A11 Basic, IKA), respectivamente. O material moído foi armazenado em tubos Falcon de 50 mL e estocados em dessecador de vidro para posterior análise.

4.4 – Determinação dos teores totais, da bioacessibilidade e biodisponibilidade de macro e micronutrientes

4.4.1 – Digestão *in vitro*

Baseado no trabalho de Minekus e parceiros, com pequenas modificações, um protocolo *in vitro* foi proposto para simular as fases bucal, estomacal e intestinal sob condições estáticas, sendo aplicado à digestão *in vitro* (MINEKUS *et al.*, 2014). O fluído salivar (FSS) foi simulado com uma solução de α -amilase (10% m v⁻¹) preparada em tampão acetato (pH = 7). O fluído gástrico (FGS) foi simulado com uma solução de pepsina (10% m v⁻¹) em meio de HCl a 0,1 mol L⁻¹, enquanto o fluído intestinal (FIS) foi simulado com uma solução composta por pancreatina e sais biliares (0,2% m v⁻¹ e 1,25% m v⁻¹, respectivamente), preparada em solução de NaHCO₃ a 0,1 mol L⁻¹. Os fluidos digestivos simulados foram preparados imediatamente antes de cada experimento para evitar a perda de atividade enzimática. Além disso, experimentos prévios foram realizados para ajustar o pH em cada etapa da digestão.

Cerca de 500 mg de amostra liofilizada e macerada foram pesados em um frasco de polipropileno de 50 mL e 10 mL de água ultrapura foram adicionados. O pH da mistura foi ajustado para 7,0 com uma solução de tampão acetato e 200 μ L de FSS foram acrescentados. Os frascos foram selados com Parafilm® e tampados para evitar contaminações externas. As amostras foram então incubadas em um banho termostático com agitação horizontal a 37,0° C e 150 rpm por 10 minutos, simulando a digestão bucal. Após a incubação, os frascos foram retirados do banho e em seguida foi adicionado uma solução de HCl 6,0 mol L⁻¹ para o ajuste de acidez (pH = 2) e cessão da atividade enzimática da α -amilase, sendo a seguir adicionado 200 μ L de FGS. As amostras foram novamente incubadas (37° C e 150 rpm) por 2 horas para

simular a digestão gástrica. Depois de incubadas, foi adicionado ao digerido gástrico NaOH 1,0 mol L⁻¹ para correção de pH (pH = 7) e cessão da atividade enzimática da pepsina; após esta etapa foram adicionados 5,0 mL de FIS e as amostras foram novamente incubadas (37°C, 150 rpm, 2 horas) para simular a etapa de digestão intestinal.

Ao final das etapas de incubação, os frascos foram colocados em banho de gelo por 10 minutos para interromper a ação enzimática. Finalmente, as amostras foram centrifugadas a 3600 rpm por 20 minutos para separar o sobrenadante (digerido gastrointestinal ou quimo) e a fração residual. A figura a seguir mostra uma representação esquemática do protocolo executado.

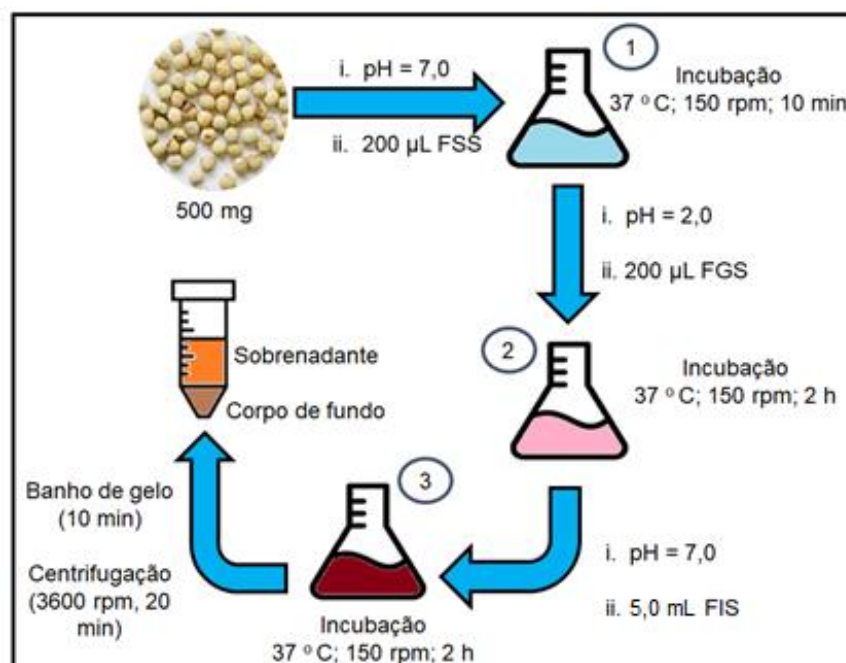


FIGURA 4.1 - Representação esquemática do protocolo *in vitro* usado para simulação da digestão. (1) fluido salivar simulado (FSS); (2) fluido gástrico simulado (FGS); (3) fluido intestinal simulado (FSS). Criado em BioRender, versão livre.

Os ensaios *in vitro* foram realizados em triplicata. Os brancos analíticos foram preparados nas mesmas condições que as amostras, adicionando-se 9,5 mL de água ultrapura e quantidades similares de fluidos digestivos simulados e alíquotas de tampão acetato, HCl e NaOH. A bioacessibilidade de cada elemento essencial dos grãos foi calculada de acordo com a Equação 1.

$$\text{Bioacessibilidade (\%)} = \frac{(F)_{\text{bio}}}{(F)_{\text{total}}} \times 100 \quad (1)$$

onde (F)bio é a fração bioacessível do elemento, expressa em mg kg⁻¹ b.u (base úmida) e (F)total é o teor total do elemento, expresso em mg kg⁻¹ b.u.

4.4.2 – Modelo intestinal humano baseado em células Caco – 2

4.4.2.1 – Cultura celular

A linhagem celular Caco-2 (células epiteliais intestinais derivadas de adenocarcinoma colorretal humano) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brasil) na passagem 46 e utilizada nos experimentos entre as passagens 48 e 51. As células foram cultivadas em frascos de 75 cm² com meio de cultura DMEM sem antibióticos, suplementado com NaHCO₃ (3,7 g L⁻¹) e SFB (10% v v⁻¹). O cultivo ocorreu em uma incubadora a 37°C com 5% de CO₂, sendo o meio trocado a cada 2 a 3 dias. A subcultura foi realizada quando as células atingiram 80% de confluência, conforme observado em microscópio invertido com contraste de fase.

4.4.2.2 – Experimentos de biodisponibilidade

As células cultivadas foram tripsinizadas e semeadas a uma densidade de 100.000 células/cm² em placas Transwell® de 6 poços, com insertos de membrana de policarbonato (24 mm de diâmetro, 4,67 cm² de área de crescimento, 0,4 µm de tamanho de poro, Corning Costar, EUA). Em cada poço, foram adicionados 1,5 mL de meio de cultura no compartimento apical e 2,0 mL no compartimento basal. O meio foi renovado a cada 48 horas até a diferenciação celular, que ocorreu entre 18 e 21 dias. A integridade da monocamada de células Caco-2 foi verificada por meio da medição da resistência elétrica transepitelial (TEER) utilizando um voltímetro epitelial (Millicell ERS-2, Merck). Valores de TEER superiores a 250 Ω cm² foram considerados indicativos de adequada integridade da monocamada celular, conforme recomendação da literatura (HUBATSCH, RAGNARSSON, ARTURSSON, 2007).

No dia dos experimentos de biodisponibilidade, o meio de cultura dos

compartimentos apical e basal foi cuidadosamente removido e as superfícies das monocamadas de ambos os lados foram lavadas três vezes com PBS (sem Ca^{2+} e Mg^{2+}) pré-aquecido a 37°C . Em seguida, foram adicionados 1,5 mL de quimo diluído em DMEM não suplementado (1:1) no lado apical e 2,0 mL de solução de transporte (KCl $0,7 \text{ g L}^{-1}$, NaHCO_3 $0,35 \text{ g L}^{-1}$, NaCl $8,0 \text{ g L}^{-1}$ e glicose $1,0 \text{ g L}^{-1}$), previamente filtrada em $0,22 \mu\text{m}$ e aquecida a 37°C , no lado basal. Após incubação por 2 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 , os conteúdos dos compartimentos apical e basal foram cuidadosamente pipetados e armazenados em microtubos para análise por ICP OES e ICP-MS. Uma representação esquemática dos experimentos pode ser vista na Figura 4.2.

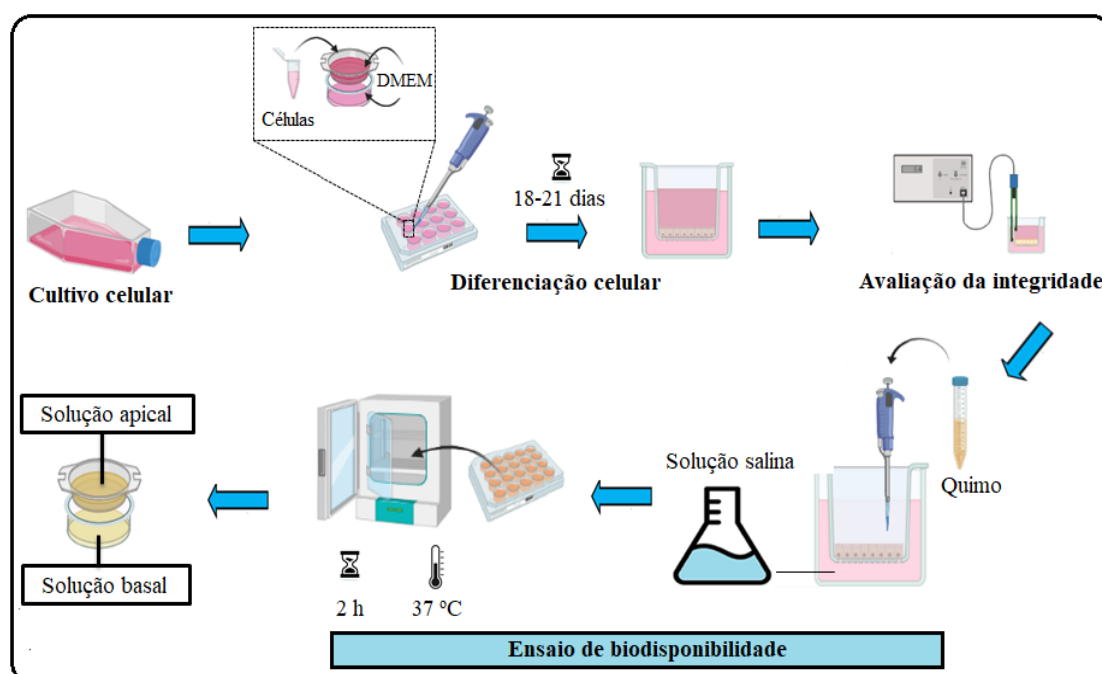


Figura 4.2 – Representação esquemática do ensaio de biodisponibilidade. Criado em BioRender, versão livre.

O transporte de elementos através das monocamadas de células Caco-2 foi expresso em μg ou ng/poço (dependendo do elemento), representando a quantidade transportada para o compartimento basolateral e também como a porcentagem da quantidade transportada em relação à quantidade inicial adicionada ao compartimento apical. A eficiência de transporte foi considerada como a estimativa da biodisponibilidade, levando em conta as diferenças de solubilidade de cada elemento, conforme descrito na Equação 2.

$$\text{Biodisponibilidade (\%)} = \frac{(\%)\text{transporte} \times (\%)\text{solubilidade}}{100} \quad (2)$$

Onde (%)transporte refere-se ao teor transportado do compartimento apical para o basal, e (%)solubilidade refere-se ao teor bioacessível de cada elemento após procedimento de bioacessibilidade (SANTOS; NICIURA; NOGUEIRA, 2023).

4.4.3 – Procedimentos de preparo de amostras

As amostras de grãos cru e cozidos liofilizados e moídas foram digeridas em forno micro-ondas. Para esse propósito, aproximadamente 200 mg de amostra foi pesada em frascos de digestão de PTFE-TFM e 6,0 mL de HNO₃ 7,0 mol L⁻¹ e 2,0 mL H₂O₂ foram adicionados. Em seguida, as amostras foram digeridas aplicando-se um programa de aquecimento baseado em três etapas: (1) rampa de 15 minutos para atingir 180°C; (2) patamar de 25 min em 180°C; e (3) resfriamento automático dos frascos até 55°C, conforme procedimento estabelecido no laboratório. Após decomposição, as amostras foram diluídas para 30,0 mL com água ultrapura. Todos os experimentos foram realizados em cinco réplicas (n = 5). Os brancos analíticos (n = 12) foram preparados de maneira similar, sem adição da amostra nos frascos de digestão.

Visando minimizar possíveis efeitos matriciais causados pelo alto teor de carbono, uma alíquota de 2,0 mL dos extratos gastrointestinais *in vitro* (quimo) também foi digerida nas mesmas condições descritas anteriormente. Após a digestão, a solução resultante foi diluída para 20 mL. Os brancos analíticos foram preparados usando 4,0 mL do branco do quimo e a mesma quantidade de solução digestora, seguido de diluição para 20 mL. A fração residual também foi submetida a digestão assistida por micro-ondas. Todo o resíduo obtido da digestão gastrointestinal *in vitro* foi transferido para os frascos de PTFE-TFM, onde foi adicionado 6,0 mL de HNO₃ 7,0 mol L⁻¹ e 2,0 mL H₂O₂. Após a digestão ácida, a solução resultante foi diluída para 30 mL.

Em relação ao procedimento de biodisponibilidade, as soluções dos compartimentos apicais (~ 1,5 mL) e basais (~ 2,0 mL) obtidas foram digeridas em um bloco digestor equipado com frascos fechados de PFA. A escolha desse sistema foi devido à baixa complexidade e carbono residual presente nessas soluções. As

amostras foram transferidas aos frascos reacionais, onde foi adicionado 2,0 mL de HNO₃ concentrado e 2,0 mL de água ultrapura. Em seguida os frascos foram fechados e aquecidos a 90°C por 4 h. Após digestão, a solução resultante foi diluída para 20 mL. Para evitar a presença de resíduos durante as análises, todas as amostras foram previamente filtradas através de filtros de seringa com tamanho de poro 0,22 µm.

4.4.4 – Determinação dos teores totais e frações bioacessíveis

O teor total e as frações bioacessível e residual de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn em amostras de feijões foram determinados por ICP OES com visão dupla vertical síncrona (SVDV). Este aparato utiliza a tecnologia do combinador espectral dicróico (DSC), que sincroniza os sinais de emissão das visões radial e axial no sistema óptico, permitindo a análise simultânea de elementos em baixas e altas concentrações em uma única medida (DONATI; AMAIS; WILLIAMS, 2017). Após a digestão as soluções foram diluídas para garantir que a acidez residual e a concentração total de sólidos dissolvidos (TDS) não ultrapassassem 10% v v⁻¹ e 1% m v⁻¹, respectivamente. Os resultados foram obtidos por meio de calibração externa, com curvas de calibração construídas nas seguintes faixas: 0,1 a 10 mg L⁻¹ para Cu, Fe e Zn; 1 a 100 mg L⁻¹ para Ca, Mg e P.

4.4.5 Determinações nas soluções basais e apicais

As soluções digeridas dos conteúdos basal e apical (aproximadamente 1,0 mL) foram diluídas em HNO₃ 1% (v v⁻¹) na proporção de 10 vezes e analisadas diretamente por ICP OES (Ca, Mg, P) e ICP-MS (Cu, Fe, Zn) para avaliar o transporte dos elementos através das monocamadas de células Caco-2. A calibração foi feita utilizando o meio salino (solução de transporte) diluído 10 vezes em HNO₃ 1% (v v⁻¹).

As condições instrumentais, como isótopo, modo de aquisição de sinal e padrão interno, foram ajustadas com base em experimentos de adição e recuperação em dois níveis para todos os elementos: 2,0 e 30,0 µg/L. As curvas de calibração foram estabelecidas na faixa de 0,1 a 100 µg/L para Cu, Fe e Zn. Para o ICP OES, as determinações foram realizadas utilizando os mesmos parâmetros descritos no item 4.4.4.

4.4.6 – Características dos métodos analíticos

Os procedimentos analíticos para a determinação do teor total, da fração bioacessível e da fração biodisponível foram avaliados com base em algumas figuras de mérito, incluindo a concentração equivalente ao sinal de fundo (BEC, *Background Equivalent Concentration*) para os cálculos dos limites de detecção (LOD, *Limit of Detection*) e quantificação (LOQ, *Limit of Quantification*), precisão e exatidão. Os valores de LOD e LOQ foram calculados a partir da razão entre o sinal analítico e o sinal de fundo (SBR) de acordo com as equações 3 e 4, respectivamente.

$$\text{LOD} = \frac{3 \times \text{BEC} \times \text{RSD}_{\text{br}}}{100} \quad (3)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \text{BEC} \times \text{RSD}_{\text{br}}}{100} \quad (4)$$

onde $\text{BEC} = C_{\text{analito}}/\text{SBR}$; e $\text{SBR} = (I_{\text{analito}} - I_{\text{branco}}) / I_{\text{branco}}$, onde C_{analito} é a concentração do analito na solução padrão (10 mg L^{-1}); I_{analito} e I_{branco} são as intensidades de emissão medidas para o analito na solução padrão e no branco, respectivamente (THOMSEN; ROBERTS; BURGESS, 2000).

A precisão foi determinada por meio da repetibilidade, com base no desvio padrão relativo (% RSD) das determinações realizadas em amostras de feijão cru ($n = 5$). Para avaliar a veracidade do procedimento de determinação do teor total, foram utilizados materiais de referência, como folhas de tomate (NIST SRM 1573a) e café verde (RM-Agro C1007a) ($n = 3$). A veracidade do procedimento de bioacessibilidade *in vitro* foi verificada através de um estudo de balanço de massa, que consistiu na comparação entre a soma das frações bioacessível e residual e o teor total de cada elemento (Equação 5). Esse balanço de massa foi realizado tanto para amostras cruas quanto para cozidas.

$$\% \text{BM} = \frac{(F)_{\text{bio}} + (F)_{\text{res}}}{(F)_{\text{total}}} \quad (5)$$

onde $(F)_{\text{bio}}$ e $(F)_{\text{res}}$ são, respectivamente, a média da fração bioacessível e residual do

elemento, expressas em mg kg^{-1} b.s (base seca); e $(F)_{\text{total}}$ é o teor total do elemento, expresso em mg kg^{-1} b.s. Além disso foram executados experimentos de adição e recuperação, realizados com amostras de feijão cozido, quimo e resíduo. Os elementos foram adicionados antes do preparo das amostras no sistema micro-ondas, em dois níveis, com base na concentração inicialmente estimada após uma análise preliminar das amostras.

O controle de qualidade dos resultados de biodisponibilidade foi realizado com base no balanço de massa (Equação 5), que considerou a quantidade inicial de cada elemento adicionada ao lado apical do sistema Transwell® e a soma da quantidade remanescente na solução apical e transferida para a solução basal após a incubação. A quantidade de elementos retidos nas células não foi analisada neste estudo em função da pequena massa resultante.

4.4.7 – Tratamento de dados e análise estatística

Os teores totais e as frações bioacessíveis foram expressos em peso úmido (exceto no estudo de balanço de massa), levando em consideração os fatores de rendimento de massa para as amostras cozidas (Equação 6). Esses fatores foram aplicados para compensar o acúmulo de água durante o processo de cozimento dos feijões.

$$(F)_{ww} = (F)_{dw} \times YF \times \frac{(100 - \%umidade)}{100} \quad (6)$$

em que $(F)_{ww}$ é o teor do elemento expresso em base úmida; $(F)_{dw}$ é o teor do elemento nas amostras liofilizadas (peso seco); YF o fator de retenção (*yield factor*) obtido a partir da razão entre a massa da amostra cozida e crua (SEMEDO TAVARES *et al.*, 2018).

Todos os resultados de bioacessibilidade e biodisponibilidade e suas respectivas incertezas de medida foram expressos como média \pm desvio padrão. Para avaliar diferenças significativas entre o teor total e cozido e a fração bioacessível nas amostras cruas e cozidas, foi aplicada análise de variância (ANOVA) e teste Tukey para comparação de médias múltiplas a um nível de confiança de 95%.

4.5 – Procedimentos de determinação da composição bromatológica e da bioacessibilidade de proteína total

A determinação de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), carbono total (C), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e extrato etéreo (EE), foram obtidos conforme recomendações (WHITE, 1986; HAGEN, 1989; AOAC, 1990; VAN SOEST, ROBERTSON, LEWIS, 1991; FAO, 2003; FAO, 2011 COMPÊNDIO, 2023). Foram usados como amostras grãos cru e cozidos, previamente secos e moídos e, moinhos de faca com peneira de 2 mm, de feijão guandu, feijão carioca e feijão preto. A avaliação da bioacessibilidade de proteína total e a composição de aminoácidos foram realizadas com as amostras de quimo obtidas pós procedimento de digestão *in vitro* descrito no item 4.4.1.

4.5.1 – Matéria seca e matéria mineral

O conteúdo de matéria seca e matéria mineral dos grãos crus foi determinado gravimetricamente por secagem em estufa a 105 °C até peso constante e por incineração em mufla a 550 °C, respectivamente (AOAC, 1990).

4.5.2 – Quantificação total de carbono, proteína bruta e aminoácidos

Os teores totais de carbono e nitrogênio dos grãos de feijão cru e cozidos foram determinados por combustão, empregando o método conhecido como Dumas (DUMATHERM, Gerhardt, Alemanha). A proteína bruta é obtida a partir de um fator de conversão de nitrogênio para proteína, de 6,25. Este fator foi estabelecido pois em média, as proteínas dos alimentos contêm aproximadamente 16% de nitrogênio. Assim, ao multiplicar o teor de nitrogênio presente no alimento por 6,25 a estimativa da quantidade total de proteína bruta é obtida (FAO, 2003). A fração bioacessível da proteína bruta foi obtida pelo método Dumas aplicado na solução obtida após o teste *in vitro*, conforme descrito no item 4.4.1. Trabalhos anteriores utilizaram a precipitação da proteína com ácido tricloroacético e a determinação do nitrogênio total no precipitado (CARREIRA *et al.*, 2003, MENEZES ET AL., 2018). Desta forma, para comprovação da ausência de N não proteico, foram quantificados os aminoácidos no

quimo das amostras g18-95V e g57-95, avaliados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com detector de arranjo de diodo (DAD) (SINDIRAÇÕES, 2023; WHITE, 1986; HAGEN, 1989). A quantificação dos aminoácidos foi realizada no laboratório CBO, localizado em Valinhos, SP. A seguir é apresentado o parâmetro instrumental e as condições de operação da cromatografia.

Tabela 4.3 - Parâmetros instrumentais aplicados ao cromatógrafo HPLC

Parâmetro Instrumental	Condição operacional
Fase móvel	Gradiente de Fase Móvel A* e Fase Móvel B** (Tabela 4.4)
Taxa de fluxo (mL min ⁻¹)	1,0
Volume de injeção (µL)	20
Temperatura da Coluna (°C)	50
Comprimento de onda (nm)	254
Tempo de corrida (min)	23
Coluna	Poroshell 120 EC-C18
Gradiente	Tabela 4.4

*Fase móvel A: solução de acetato de sódio trihidratado (9,5 mg L⁻¹); trietilamina (3,75 mL L⁻¹); acetonitrila (500 mL L⁻¹); EDTA dissódico (3,3 mg L⁻¹).

**Fase móvel B: solução de acetonitrila (600 mL L⁻¹); EDTA dissódico (0,4 mg L⁻¹).

Tabela 4.4 – Gradiente de fase móvel aplicados ao cromatógrafo HPLC

Tempo (min)	Fase Móvel A* (%)	Fase Móvel B** (%)
0	100	0
5	96	4
7	92	8
8	75	25
9	75	25
11	70	30
13	50	50
15	50	50
16	0	100
18	0	100
18,1	100	0
23	100	0

Tabela 4.5 – Mix de padrão de aminoácidos

Padrão	MM (g mol⁻¹)	Massa de padrão (g)
L - Ácido aspártico	133,10	0,11 ± 0,0005
L - Ácido glutâmico	147,13	0,111 ± 0,0005
L - Serina	105,09	0,11 ± 0,0005
Glicina	75,07	0,1075 ± 0,00005
L - Histidina	155,15	0,066 ± 0,0005
Taurina	125,15	0,025 ± 0,0005
L - Arginina	174,20	0,11 ± 0,0005
L - Treonina	119,12	0,093 ± 0,0005
L - Alanina	89,09	0,11 ± 0,0005
L - Prolina	115,13	0,11 ± 0,0005
L - Tirosina	181,19	0,0835 ± 0,0005
L - Valina	117,15	0,11 ± 0,0005
L - Metionina	149,21	0,044 ± 0,0005
L - Cistina	240,30	0,0365 ± 0,0005
L - Isoleucina	131,17	0,11 ± 0,0005
L - Leucina	131,17	0,11 ± 0,0005
L - Fenilalanina	165,19	0,11 ± 0,0005
L - Lisina	146,19	0,1105 ± 0,0005

4.4.3 – Fibras e extrato etéreo

A determinação das fibras em detergente neutro (FDN), detergente ácido (FDA) e extrato etéreo (lipídeos) foi realizada utilizando a tecnologia "filter bag" da Ankom (ANKOM Fiber Analyzer e ANKOM XT15 Extractor, ANKOM Technology, Macedonia, EU), modificada a partir dos protocolos originais descritos pela AOAC 991.43 (AOAC, 1991) e AACC 32-07.01 (SINDIRAÇÕES, 2023). No procedimento Ankom, as extrações para a determinação dos teores de fibra foram feitas com o uso das "filter bags" no equipamento Ankom 200 Fiber Analyzer. A metodologia segue uma extração sequencial utilizando detergente neutro (sulfito de sódio e α -amilase) e detergente ácido (ácido sulfúrico diluído) (VAN SOEST, ROBERTSON, LEWIS, 1991; FAO, 2011), realizada em um sistema automatizado, onde uma bomba multicanal controlada por computador automatiza a adição das soluções químicas, enzimas e enxágues. As temperaturas e os níveis de agitação são monitorados e controlados durante todo o processo e os resultados são obtidos por gravimetria. A determinação de gordura (extrato etéreo) foi feita com o emprego de "filter bags" em extrator de gordura (ANKOM XT15 Extractor) utilizando o princípio do método Soxhlet em sistema

fechado, sendo a extração realizada com éter de petróleo. O sistema possibilita rapidez, segurança e economia de aproximadamente 90% de reagentes. A quantificação final é feita por gravimetria.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Avaliação do procedimento analítico para determinação do teor total dos elementos

O uso de ácido diluído para o preparo de amostras tem se consolidado como uma alternativa aos procedimentos convencionais que utilizam reagentes concentrados, alinhando-se a alguns princípios da Química Verde (GAMA *et al.*, 2019). A Tabela 5.1 apresenta os parâmetros de desempenho do método analítico. Os valores de LOQ foram considerados adequados para o presente estudo, variando de 0,10 a 2,23 mg kg⁻¹ para Zn e Ca, respectivamente, possibilitando a determinação dos elementos em todas as amostras analisadas. Os desvios padrão relativos (RSDs) foram inferiores a 7% para todos os elementos, indicando precisão (repetibilidade) no procedimento analítico, conforme as métricas de validação de métodos analíticos (INMETRO, 2020).

TABELA 5.1 - Parâmetros analíticos para determinação do teor total dos elementos.

Elemento	LOD (mg kg ⁻¹)	LOQ (mg kg ⁻¹)	Precisão (% RSD*)
Ca II 317,933 nm	0,67	2,23	6,94
Cu I 327,395 nm	0,08	0,26	6,73
Fe II 238,204 nm	0,04	0,13	3,47
Mg II 279,078 nm	0,10	0,35	5,95
P I 214,914 nm	0,81	2,71	6,13
Zn I 213,857 nm	0,03	0,10	5,25

*RSD = desvio padrão relativo (n = 8) I: linha atômica; II: linha iônica

A exatidão dos resultados foi avaliada por meio da análise dos materiais de referência RM-Agro C1007a (café verde) e NIST SRM 1573a (folha de tomate) (n=3). Como mostrado na Tabela 5.2, os teores determinados nesses materiais de referência estavam em conformidade com os valores certificados, com recuperações variando entre 97 e 104% (INMETRO, 2020). Juntamente com os teores apresentados na Tabela 5.2, foi aplicado o teste F com 95% de confiança e o teste T pareado de

Student para avaliar a concordância entre os valores de recuperação – REC (%) - para cada elemento nos materiais de referência. O teste t foi realizado assumindo variâncias iguais para todos os elementos, de acordo com o teste F previamente realizado. Sob as condições calculadas ($n = 3$), com 95% de confiança ($t_{95\%} = 2,77$), nenhum elemento apresentou diferença estatisticamente significativa.

Embora seja um método analítico amplamente consolidado, os avanços recentes na instrumentação têm possibilitado a melhoria do desempenho da ICP OES. Nesse contexto, a utilização da configuração SVDV ofereceu desempenho analítico adequado na determinação de elementos essenciais em feijão guandu, além de otimizar a frequência analítica, ou seja, permitindo um menor tempo de análise em comparação ao sistema de visão dupla convencional, no qual a operação em modo axial e radial são executados de forma sequencial para a medição simultânea dos elementos (AGILENT TECHNOLOGIES, 2016).

TABELA 5.2 – Teor referência, teor determinado, recuperações, teste F e teste t de Student obtidos a partir dos materiais de referência RM – Agro CV-01/2021 (café verde) e NIST – SRM 1573a (folha de tomate).

Elemento	Materiais de referência						Testes estatísticos entre REC (%)			
	RM - Agro CV-01/2021			NIST - SRM 1573a			Teste F		Teste t de Student	
	Teor referência (mg kg ⁻¹)	Teor determinado (mg kg ⁻¹)	REC (%)	Teor referência (mg kg ⁻¹)	Teor determinado (mg kg ⁻¹)	REC (%)	Fcalc.	Fcrit.	tcalc.	tcrit.
Ca	1278 ± 60	1301 ± 26	102 ± 4	50450 ± 550	49261 ± 848	98 ± 3	1,3	9,6	1,79	2,77
Cu	20,1 ± 1,2	20,8 ± 0,4	103 ± 2	4,7 ± 0,1	4,6 ± 0,1	98 ± 5	2,5	9,6	2,08	2,77
Fe	44,1 ± 4,0	45,9 ± 3,0	104 ± 7	367,5 ± 4,3	358 ± 5	97 ± 2	3,5	9,6	2,15	2,77
Mg	2070 ± 122	2021 ± 37	98 ± 3	12000	11844 ± 136	99 ± 2	1,5	9,6	0,62	2,77
P	1706 ± 86	1732 ± 33	101 ± 9	2161 ± 28	2214 ± 33	102 ± 10	1,1	9,6	0,51	2,77
Zn	7,2 ± 0,8	7,1 ± 0,1	99 ± 10	30,9 ± 0,5	28,7 ± 0,4	93 ± 7	1,4	9,6	1,10	2,77

5.2 – Influência do método de cocção sobre o teor total dos elementos

Após a definição do procedimento analítico foi realizada a determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, P e Zn nas amostras empregadas neste trabalho, feijão guandu, feijão carioca e feijão preto (tanto crus quanto cozidos), a fim de verificar possíveis alterações nos teores totais dos elementos após processo de cozimento em panela de pressão elétrica. Os resultados foram expressos em peso úmido, considerando os fatores de rendimento de peso para as amostras cozidas (conforme descrito na Equação 5). Os teores totais de macronutrientes (Ca, Mg, P) e micronutrientes (Cu, Fe e Zn) são apresentados nas Figuras 5.1 e 5.2, respectivamente.

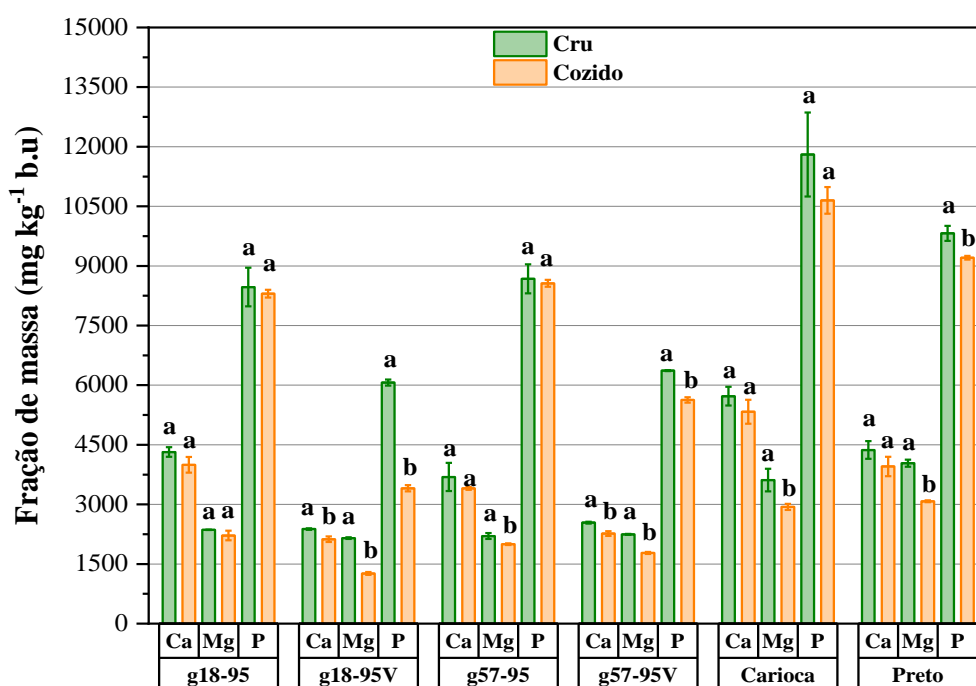


FIGURA 5.1 - Teor total de Ca, Mg e P em amostras de feijão cru (barra verde) e cozido (barra marrom) (n=5). Barras seguidas por letras sobrescritas iguais indicam diferença não significativa entre o grão cru e grão cozido de uma mesma amostra, baseado em Teste t pareado ($p < 0,05$).

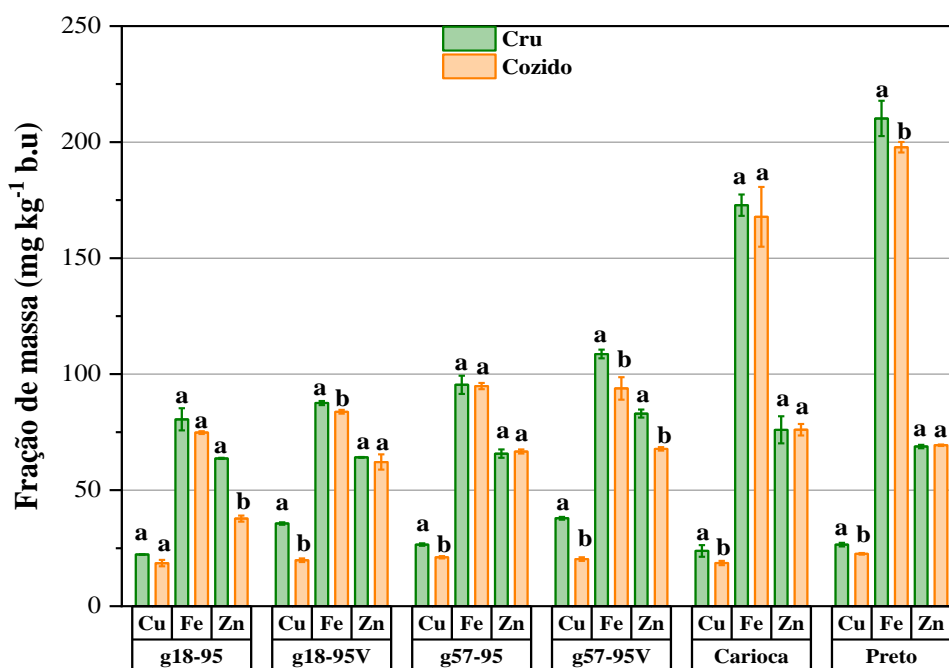


FIGURA 5.2 - Teor total de Cu, Fe e Zn em amostras de feijão cru (barra verde) e cozido (barra marrom) (n=5). Barras seguidas por letras sobrescritas iguais indicam diferença não significativa entre o grão cru e grão cozido de uma mesma amostra, baseado em Teste t pareado ($p < 0,05$).

Para os macronutrientes, fósforo apresenta o maior teor entre as amostras cruas e cozidas, variando, em mg kg^{-1} , de 8496 - 8304, 6066 - 3406, 8674 - 8562, 6366-5628, 11803-10650 e 9820-9205 para os feijões g18-95, g18-95V, g57-95, g57-95V, carioca e preto, respectivamente. O teor de fósforo nos feijões pode ser consideravelmente afetado pelo processo de cozimento, visto que esse elemento nos grãos de feijão está ligado a compostos orgânicos de reserva, como os fitatos, que estão envolvidos na regulação da síntese de amido durante o preenchimento dos grãos (MAMBRIN *et al.*, 2021). Os fitatos são sais derivados do ácido fítico, sendo a principal forma de fósforo nos grãos de cereais e leguminosas, representando aproximadamente 70% do conteúdo de fosfato (MARIA *et al.*, 2011). Por serem compostos termolábeis, durante o processo de cozimento o fitato pode ser parcialmente quebrado devido ao calor e à ação da água e uma vez disponível, fósforo é parcialmente migrado para a água, resultando em perda do nutriente (FARIA *et al.*, 2018).

Sobre os teores de cálcio, as amostras g18-95 e g57-95 apresentaram comportamento semelhante quanto ao percentual de perda antes e após cozimento, variando de 4318 mg kg⁻¹ a 3995 mg kg⁻¹ e 3689 mg kg⁻¹ a 3402 mg kg⁻¹, respectivamente. Ambos mostraram perdas próximas de 7% durante a cocção. Comportamento semelhante pode ser observado entre as amostras g18-95V e g57-95V (2379-2123 mg kg⁻¹; 2542-2268 mg kg⁻¹), e também entre o feijão carioca e feijão preto (5722-5330 mg kg⁻¹; 4370-3954 mg kg⁻¹). De maneira geral, a variação no teor de cálcio entre os grãos crus e cozidos foi inferior a 10% para todas as amostras. Em relação a magnésio, os pares g18-95 e g57-95, g18-95V e g57-95V, carioca e preto, apresentam comportamento semelhante quanto ao teor perdido pós cocção (respectivamente, 2360-2218 mg kg⁻¹; 2204-1998 mg kg⁻¹; 2152-1262 mg kg⁻¹; 2247-1778 mg kg⁻¹; 3613-2936 mg kg⁻¹; 4037-3079 mg kg⁻¹). Os percentuais perdidos variam de 6-9%, 21-41% e 19-24%, respectivamente, sendo o par g18-95V / g57-95V o de maior perda.

Quanto aos micronutrientes, ferro apresenta o maior teor entre as amostras cruas e cozidas, variando, em mg kg⁻¹, de 80 - 75, 87 - 84, 95 - 94, 109 - 94, 172 - 168 e 210 - 198 para os feijões g18-95, g18-95V, g57-95, g57-95V, carioca e preto, respectivamente. Dos feijões estudados, o feijão carioca e o feijão preto apresentam os maiores teores de ferro, o que também pode ser observado em estudos similares de bioacessibilidade (FERNANDES; NISHIDA; DA COSTA PROENÇA, 2010; PEREIRA *et al.*, 2020). Cobre apresenta o menor teor total dentre todos os elementos avaliados. As amostras g18-95 e g57-95 apresentaram comportamento semelhante na perda de Cu antes e após cozimento, variando de 22 mg kg⁻¹ a 19 mg kg⁻¹ e 27 mg kg⁻¹ a 21 mg kg⁻¹, respectivamente. Ambos mostraram perdas de 17 e 21%, respectivamente, pós cocção. Comportamento semelhante pode ser observado entre as amostras g18-95V e g57-95V (36-20 mg kg⁻¹; 38-20 mg kg⁻¹), e também entre o feijão carioca e feijão preto (24-19 mg kg⁻¹; 27-23 mg kg⁻¹). As perdas percentuais variam de 44-46% e 15-22%, respectivamente, sendo as amostras de feijão guandu verde as mais elevadas. Já em relação a zinco, as amostras g18-95V e g57-95V apresentaram as maiores perdas do elemento pós cozimento, com teor variando de 64 mg kg⁻¹ a 38 mg kg⁻¹ e 83 mg kg⁻¹ a 67 mg kg⁻¹, dos quais correspondem em perdas de 59% e 20%, respectivamente. Para as demais amostras, os teores variam de, em mg kg⁻¹, 64-62, 68-66, 83-67, 76-75 e 69-68 para os feijões g18-95, g57-95, carioca e preto, respectivamente.

Entre as amostras de feijão guandu verde e feijão guandu maduro, é notável a diferença entre o teor total dos elementos avaliados, bem como o teor de nutriente perdido na cocção. Assim como observado na composição bromatológica, esse comportamento pode estar relacionado com o estágio de maturação do grão (ABEBE, 2022; WU *et al.*, 2024), do qual se observa ao longo do processo modificações estruturais e composição química (SOUSA *et al.*, 2024; WU *et al.*, 2024). Para o feijão guandu, a diferença nos teores de nutrientes entre feijão seco e maduro foi observado em estudos anteriores (SAXENA; KUMAR; SULTANA, 2010), assim como para o feijão comum e outras variedades encontradas no Brasil (FERREIRA *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2018).

5.3 – Avaliação do procedimento analítico para estimativa da bioacessibilidade *in vitro*

Nos últimos anos, a rede internacional COST INFOGEST desenvolveu e atualizou um protocolo padronizado para ensaios de digestão *in vitro* (BRODKORB *et al.*, 2019). No entanto, a dificuldade em obter enzimas digestivas específicas e os altos custos de reagentes e kits para determinar a atividade enzimática dificultam a implementação desse protocolo em muitos laboratórios (MINEKUS *et al.*, 2014; REBELLATO *et al.*, 2022). Além disso, a análise do quimo resultante, por meio de métodos espectroanalíticos para determinação elementar, torna-se inviável em determinadas situações devido à elevada quantidade de eletrólitos usados para simular os fluidos digestivos, o que prejudica a qualidade dos brancos analíticos e torna mais difícil a quantificação de elementos essenciais como Ca e Mg. Em função disso, foi adotado um modelo mais simples, fundamentado em estudos anteriores, para estimar a bioacessibilidade de Ca, Cu, Fe, Mg, P e Zn em amostras de feijão guandu por ICP OES (MINEKUS *et al.*, 2014; SANTOS; DE HIGUERA; NOGUEIRA, 2022).

O extrato gastrointestinal obtido, independentemente do método de digestão *in vitro* utilizado, é sempre uma amostra complexa, contendo quantidades relativamente altas de compostos de carbono provenientes dos reagentes usados no ensaio, como pepsina, pancreatina, sais biliares e bicarbonato. Esses compostos podem causar interferências significativas de matriz na determinação elementar por métodos baseados em plasma (SANTOS; NICIURA; NOGUEIRA, 2023; MENEZES *et*

al., 2018; PEREIRA *et al.*, 2020). Diante disso, a amostra foi primeiramente submetida a um procedimento de decomposição assistida por radiação micro-ondas com ácido diluído. Para a análise do balanço de massa, o resíduo também foi digerido no mesmo sistema de micro-ondas utilizado para o quimo.

As condições instrumentais utilizadas para quantificar as frações bioacessível e residual por ICP OES foram avaliadas por meio de experimentos de adição e recuperação, como descrito no item 4.4.6. Como mostrado na Tabela 5.3, as recuperações obtidas (90-110%) (INMETRO, 2020) foram satisfatórias em ambos os níveis testados, indicando que não ocorreram efeitos significativos relacionados ao transporte ou nebulização da amostra injetada. A falta de protocolos estabelecidos para validação é uma limitação dos métodos de bioacessibilidade *in vitro*.

Neste estudo, foram avaliados diferentes parâmetros analíticos, como LOD, LOQ, precisão, efeitos de matriz e veracidade, para assegurar a qualidade dos resultados obtidos. A Tabela 5.4 apresenta os valores de LOD e LOQ, além da precisão (% RSD) obtida na estimativa da fração bioacessível de Ca, Cu, Fe, Mg, P e Zn em feijão guandu. Os valores de LOQ variam de 0,34 a 5,53 mg kg⁻¹ para Zn e Ca, respectivamente. A precisão foi considerada satisfatória, com desvios padrão relativos abaixo de 8% para todos os analitos (INMETRO, 2020).

Adicionalmente, foi realizado o balanço de massa com base na soma das frações bioacessível e residual, comparando-se com o teor total de cada elemento para avaliar a veracidade do método. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 5.5 e 5.6. O balanço de massas variou entre 95% a 109%. Os resultados obtidos no estudo de adição/recuperação e no balanço de massa indicam que não houve erros sistemáticos na quantificação da fração residual dos elementos. Com base nesses resultados, pode-se concluir que o método analítico foi confiável para estimar a bioacessibilidade de Ca, Cu, Fe, Mg, P, S e Zn nas amostras analisadas.

TABELA 5.3 - Experimentos de adição e recuperação (recuperação \pm desvio padrão, n = 3), por ICP OES, em dois níveis: 2 mg L⁻¹ e 30 mg L⁻¹.

Amostra*	Ca		Cu		Fe		Mg		P		Zn	
	2	30	2	30	2	30	2	30	2	30	2	30
A	103 \pm 3	103 \pm 9	107 \pm 4	106 \pm 7	108 \pm 6	105 \pm 10	97 \pm 11	100 \pm 4	90 \pm 10	103 \pm 12	103 \pm 5	102 \pm 13
B	98 \pm 9	99 \pm 6	108 \pm 3	109 \pm 9	107 \pm 4	104 \pm 8	90 \pm 9	98 \pm 9	91 \pm 5	102 \pm 4	103 \pm 2	102 \pm 7
C	104 \pm 1	103 \pm 5	106 \pm 3	105 \pm 7	112 \pm 4	106 \pm 5	101 \pm 1	101 \pm 3	104 \pm 6	101 \pm 2	104 \pm 3	102 \pm 11

*A: feijão carioca (fração bioacessível)

*B: feijão preto (fração residual)

*C: feijão guandu (variedade g57-95, grão cozido)

TABELA 5.4 - Parâmetros analíticos dos experimentos de bioacessibilidade *in vitro*. Determinação por ICP OES usando calibração externa (n = 8).

Elemento	LOD (mg kg ⁻¹)	LOQ (mg kg ⁻¹)	Precisão* (RSD %)
Ca II 317,933 nm	1,66	5,53	7,20
Cu I 327,395 nm	0,58	1,92	4,33
Fe II 238,204 nm	0,20	0,68	2,99
Mg II 279,078 nm	0,34	1,14	7,37
P I 214,914 nm	1,60	5,34	3,41
Zn I 213,857 nm	0,10	0,34	3,55

TABELA 5.5 - Teor total, fração bioacessível e fração residual em amostras de feijão cozido (média \pm desvio padrão, mg kg⁻¹, n = 3, base úmida).

Teor total	Ca	Cu	Fe	Mg	P	Zn
g18-95	3995 \pm 227	18,6 \pm 1,6	80,5 \pm 5,5	2218 \pm 141	3406 \pm 91	37,8 \pm 1,5
g18-95V	2123 \pm 80	19,8 \pm 0,9	83,8 \pm 0,9	1263 \pm 41	8304 \pm 113	62 \pm 4
g57-95	3402 \pm 40	21,1 \pm 0,6	94,9 \pm 1,6	1998 \pm 26	5628 \pm 80	66,66 \pm 1,03
g57-95V	2268 \pm 69	20,3 \pm 0,9	94 \pm 6	1778 \pm 28	8562 \pm 100	67,8 \pm 0,9
Carioca	5330 \pm 348	18,59 \pm 1,08	168 \pm 15	2936 \pm 87	10650 \pm 386	76,05 \pm 2,87
Preto	3954 \pm 280	22,6 \pm 0,4	197,8 \pm 2,6	3079 \pm 25	9205 \pm 54	69,4 \pm 0,4
Fração bioacessível	Ca	Cu	Fe	Mg	P	Zn
g18-95	32 \pm 1	12,4 \pm 0,2	7,4 \pm 0,3	1029 \pm 15	1989 \pm 70	10,2 \pm 1,6
g18-95V	276 \pm 32	12,6 \pm 0,2	21 \pm 2	861 \pm 10	3281 \pm 78	22,4 \pm 1,2
g57-95	31 \pm 1	12,4 \pm 0,7	9,2 \pm 0,6	866 \pm 11	3032 \pm 88	27,1 \pm 1,7
g57-95V	431 \pm 61	12,8 \pm 0,4	19,8 \pm 1,4	1096 \pm 12	3667 \pm 53	27,5 \pm 0,7
Carioca	558 \pm 30	8,9 \pm 0,5	26,8 \pm 0,1	1447 \pm 19	5235 \pm 111	30,5 \pm 0,7
Preto	444 \pm 18	13,7 \pm 0,1	28,9 \pm 0,2	1443 \pm 15	3927 \pm 52	29,1 \pm 0,6
Fração residual	Ca	Cu	Fe	Mg	P	Zn
g18-95	4014 \pm 377	5,94 \pm 0,31	72 \pm 7	1152 \pm 111	1253 \pm 60	27 \pm 1
g18-95V	1798 \pm 119	7,0 \pm 0,7	62 \pm 2	367 \pm 34	4997 \pm 630	38,6 \pm 1,3
g57-95	2801 \pm 271	8,4 \pm 0,9	85 \pm 8	1099 \pm 71	2396 \pm 88	54,8 \pm 2,6
g57-95V	1921 \pm 70	7,3 \pm 0,6	88 \pm 4	641 \pm 24	4675 \pm 269	39,08 \pm 4,76
Carioca	5135 \pm 509	10 \pm 1	145 \pm 11	1430 \pm 109	5115 \pm 412	43,89 \pm 6,02
Preto	3903 \pm 288	8,6 \pm 1,4	168 \pm 10	1584 \pm 143	5042 \pm 394	38,8 \pm 3,8

TABELA 5.6 - Balanço de massas (% m m⁻¹ ± desvio padrão) para as amostras de feijão cozido.

Amostras	Ca	Cu	Fe	Mg	P	Zn
g18-95	101 ± 12	99 ± 10	99 ± 12	98 ± 11	98 ± 14	98 ± 9
g18-95V	98 ± 13	99 ± 12	99 ± 9	97 ± 10	95 ± 6	98 ± 17
g57-95	109 ± 12	99 ± 13	99 ± 11	98 ± 7	97 ± 6	98 ± 12
g57-95V	104 ± 16	99 ± 10	99 ± 8	98 ± 4	96 ± 5	99 ± 8
Carioca	99 ± 12	99 ± 16	99 ± 8	98 ± 8	97 ± 9	98 ± 14
Preto	99 ± 10	99 ± 16	99 ± 6	98 ± 9	98 ± 8	98 ± 10

5.4 – Influência do método de cocção e do grau de maturação na bioacessibilidade de elementos essenciais e proteínas

Os resultados da fração bioacessível (expressa em mg kg⁻¹ base úmida) e da bioacessibilidade (expressa em porcentagem) de Ca, Cu, Fe, Mg, P e Zn nas amostras de feijão guandu, carioca e preto cozida estão apresentados na Tabela 5.5 e nas Figuras 5.3 e 5.4, respectivamente.

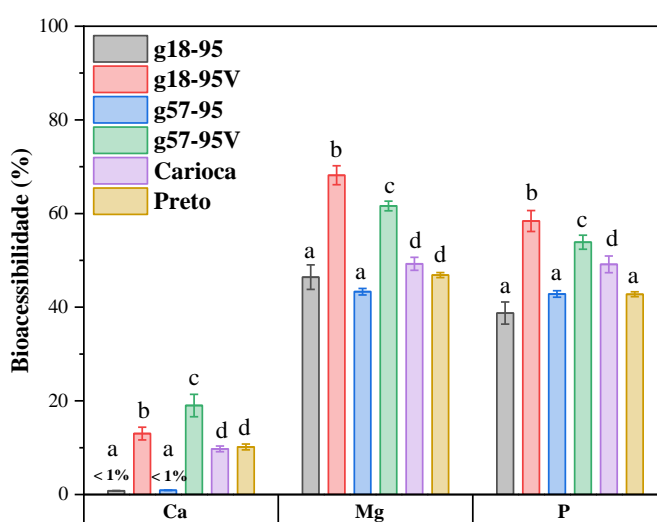


FIGURA 5.3 - Bioacessibilidade de Ca, Mg e P em amostras de feijão cozido. Barras seguidas por letras iguais indicam diferença não significativa baseado em teste Tukey ($p < 0,05$).

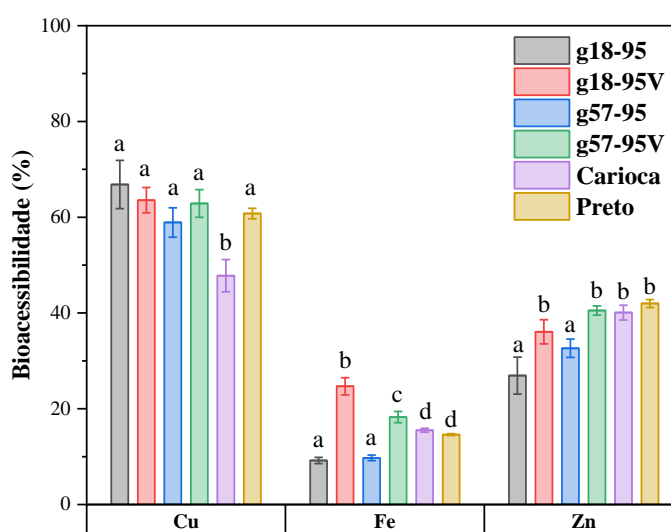


FIGURA 5.4 - Bioacessibilidade de Cu, Fe e Zn em amostras de feijão cozido. Barras seguidas por letras iguais indicam diferença não significativa baseado em teste Tukey ($p < 0,05$).

De forma geral, a bioacessibilidade variou entre 0,8% (Ca) e 68% (Cu), indicando que a quantidade desses nutrientes nos feijões não está totalmente disponível para absorção pelo epitélio intestinal. Para as amostras de feijão guandu maduro (g18-95 e g57-95), como mostrado nas Figuras 5.3 e 5.4, não foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) na fração bioacessível de todos os elementos analisados. Em relação aos grãos verdes (g18-95V e g57-95V), apenas Cu e Zn não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) na fração bioacessível. Para o feijão carioca e feijão preto, não foram observadas diferenças significativas na fração bioacessível de Ca, Mg, Fe e Zn.

A Figura 5.4 revela que a bioacessibilidade de Ca, Mg, Fe e Zn é negativamente afetada à medida que o feijão guandu atinge a maturação. Esse efeito pode ser atribuído à presença de compostos antinutricionais, como fitatos, ácido oxálico e taninos, que se acumulam durante o processo de maturação. Com o amadurecimento do grão, diversas alterações morfológicas, fisiológicas e funcionais acontecem, como variações na massa de matéria seca, nas fibras, no teor de umidade, no tamanho, na germinação, no teor mineral e em outras características (GUTKOSKI *et al.*, 2008; MUNDSTOCK; THOMAS, 2005). Nos estágios finais da

maturação, observa-se um aumento no acúmulo de biocompostos e minerais, incluindo os compostos antinutricionais.

Os compostos antinutricionais são substâncias naturais encontradas principalmente em cereais e leguminosas, que afetam suas propriedades funcionais e nutricionais. Do ponto de vista nutricional, a presença desses compostos é prejudicial, pois eles formam complexos insolúveis com minerais e proteínas, o que reduz a disponibilidade desses nutrientes (MARIA *et al.*, 2011). Entre os compostos antinutricionais, os fitatos, derivados do ácido fítico (ácido hexafosfórico – $C_6H_{18}O_{24}P_6$), têm a capacidade de se ligar a íons divalentes, formando complexos solúveis que são resistentes à digestão no trato intestinal. Durante a estocagem, fermentação, germinação, processamento e digestão de grãos e sementes, o ácido fítico pode ser parcialmente desfosforilado, originando pentafosfato (IP5), tetrafosfato (IP4), trifosfato (IP3) e, possivelmente, inositol difosfato (IP2) e monofosfato (IP1), devido à ação das fitases endógenas (ZHOU *et al.*, 1992). Dentre esses compostos, apenas o IP5 afeta negativamente a biodisponibilidade de minerais, formando complexos com zinco e ferro, enquanto os compostos IP4 e IP3 não apresentam esse efeito. Os outros compostos gerados têm uma capacidade reduzida de se ligar a minerais ou formam complexos mais solúveis (HAN *et al.*, 1994).

Em alimentos, o ácido fítico, em suas condições naturais, possui carga negativa, o que lhe permite formar complexos com moléculas carregadas positivamente, como cátions (Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} e Ca^{2+}), além de proteínas. Diversos estudos têm mostrado que o ácido fítico pode reduzir a absorção de minerais essenciais, como Fe, Zn e Ca, tanto em animais quanto em seres humanos, diminuindo sua bioacessibilidade (SANDBERG, 2002; SHARMA *et al.*, 2013; SILVA; SILVA, 1999). Prever a bioacessibilidade de minerais em alimentos que contêm fitatos é um desafio, devido às complexas interações entre os minerais e o ácido fítico, à atividade das fitases no alimento e/ou no intestino, ao processamento dos alimentos (principalmente o pH), à digestibilidade do alimento e ao estado fisiológico do consumidor (RAMÍREZ-CÁRDENAS; LEONEL; COSTA, 2008).

Uma revisão realizada em 2023 fez um levantamento sobre diferentes métodos de tratamento para leguminosas, bem como soluções tecnológicas para reduzir custos e maximizar a remoção de compostos antinutricionais (OZOLINA; SARENKOVA; MUIZNIECE-BRASAVA, 2023). Os autores destacam que, além do remolho, vários outros tratamentos podem ser aplicados para melhorar a

bioacessibilidade de nutrientes benéficos nas leguminosas, incluindo despelagem, torrefação, extrusão, fervura, germinação, secagem por ar quente e fermentação, todos com resultados positivos. Dentre esses, o remolho é um dos métodos mais simples, no qual os grãos são imersos em água por algumas horas antes de serem cozidos (SAMTIYA; ALUKO; DHEWA, 2020). Mohamed *et al.* (2011) observaram que a imersão de feijões pode diminuir a atividade de inibidores de tripsina abaixo dos níveis de controle. Khattab e Arntfield (2009) também encontraram que o tratamento de imersão em ervilhas (*Pisum sativum* L.) e feijão-carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) reduziu significativamente os níveis de inibidores de tripsina entre 10 e 19% (KHATTAB; ARNTFIELD, 2009; RASHA *et al.*, 2011).

Além disso, outros estudos citados no capítulo da Revisão da Literatura indicam que a imersão em pH baixo e em soluções salinas pode melhorar a firmeza dos feijões cozidos, prolongando assim o tempo de cozimento (KINYANJUI *et al.*, 2015). O mecanismo responsável pelo aumento do tempo de cozimento dos feijões é complexo. Os resultados do estudo de Kinyanjui *et al.* (2015) sugerem que tanto as cascas dos feijões quanto a pectina contribuem para esse prolongamento. Em resumo, a imersão dos feijões por períodos de 16 a 24 horas leva a uma perda de compostos fenólicos totais de até 31–55%. Essa redução nos compostos fenólicos pode ser atribuída ao fato de esses compostos se lixiviarem na solução de imersão devido ao gradiente de concentração (RAMAKRISHNA; RANI; RAO, 2006). Xu e Chang (2008) observaram que a variação na redução de compostos fenólicos totais durante o tratamento de imersão pode ser explicada pela diferença na distribuição e na quantidade de compostos fenólicos nas cascas e cotilédones dos feijões analisados (XU; CHANG, 2008).

Um estudo realizado por Garaniya e colaboradores avaliou os níveis de fatores antinutricionais em sementes inteiras e nas cascas de várias variedades de feijão-guandu (GARANIYA *et al.*, 2023). Os fatores antinutricionais analisados foram taninos, ácido fítico, ácido oxálico, inibidores de amilase e tripsina, com o objetivo de avaliar sua distribuição e presença nas diferentes variedades. Os resultados indicaram variações significativas nos níveis desses compostos entre as diferentes variedades e entre as sementes inteiras e suas cascas. Os autores observaram que as cascas das sementes apresentaram níveis mais elevados de antinutrientes em relação às sementes inteiras, destacando a importância de considerar ambos os componentes na análise da qualidade nutricional do feijão guandu. Segundo os autores, esses

resultados ressaltam a necessidade de selecionar variedades com menor concentração de fatores antinutricionais para melhorar tanto o valor nutricional quanto a digestibilidade do feijão guandu.

5.5 – Avaliação da integridade das células Caco - 2

Nos insertos *Transwell*®, para avaliar a integridade das monocamadas de células Caco-2, foram realizadas medidas de *TEER* no intervalo de diferenciação (15º ao 21º dia), e também no dia da execução do procedimento de biodisponibilidade. Neste dia, foram realizadas medidas antes e após incubação do quimo preparado, como descrito em Material e Métodos. Valores de *TEER* mensurados em um inserto vazio (ou seja, contendo apenas meio de cultura) foi usado para corrigir o valor medido em cada poço. Medidas de resistência transepitelial é um excelente parâmetro para avaliar o desenvolvimento das juntas de oclusão entre células adjacentes e pode ser utilizado como um indicador confiável da integridade da monocamada celular (SRINIVASAN *et al.*, 2015). A Figura 5.5 mostra que os valores de *TEER* medidos a partir do 15º dia até o 21º dia apresentaram valores inferiores a $250 \Omega \text{ cm}^2$ ($180\text{-}210 \Omega \text{ cm}^2$), indicando uma integridade não recomendada. Apesar disso, foi dado continuidade ao experimento com a incubação da quimo. Os valores de *TEER* reduziram para níveis próximo de $170 \Omega \text{ cm}^2$ após a incubação das amostras ($t = 2\text{h}$).

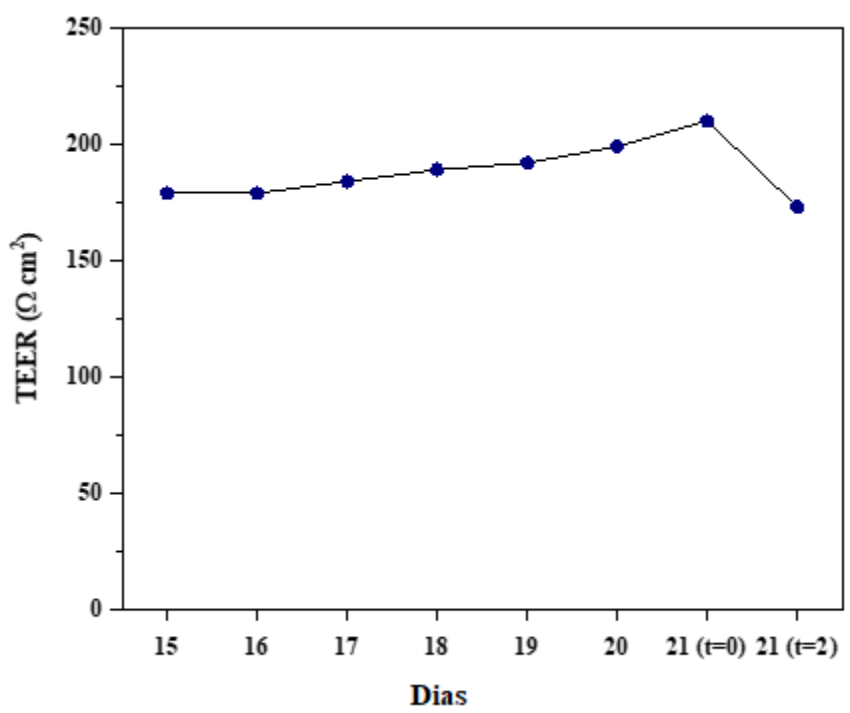


FIGURA 5.5 – Medidas de TEER antes e após incubação do quimo preparado.

Como mencionado, a recomendação confiável da integridade da monocamada são valores de TEER superiores a $250 \Omega \text{ cm}^2$. Valores abaixo trazem um indicativo de que a integridade da monocamada celular está comprometida devido à fatores bióticos (contaminação) e abióticos (composição da quimo). Ensaio colorimétrico MTT (Mosmann, 1983) é uma estratégia consolidada na literatura como forma optativa de avaliar a viabilidade celular da Caco-2 na presença da quimo. Na presente dissertação, tal ensaio não foi realizado.

5.6 – Avaliação do procedimento analítico para determinação do conteúdo basal e apical

A liberação de nutrientes da matriz alimentar e sua solubilização no meio intestinal simulado (bioacessibilidade *in vitro*) é a etapa inicial para avaliar a quantidade que pode ser potencialmente absorvida pelo organismo. Como apresentado e discutido anteriormente, a Tabela 5.5 mostra o teor total e a bioacessibilidade de Ca, Mg, P, Cu, Fe e Zn nos feijões quando submetidos à cocção. Para assegurar a qualidade das medições analíticas, as condições ideais para a

quantificação dos elementos nas soluções basais (fração biodisponível) por ICP OES e ICP-MS foram determinadas por meio de experimentos de adição e recuperação em dois níveis. Esses resultados, junto aos parâmetros analíticos dos experimentos de biodisponibilidade, são apresentados nas Tabelas 5.7 e 5.8.

Como mostrado na Tabela 5.8, foram obtidas recuperações entre 88 – 104% na quantificação de Ca, Mg e P, sem a necessidade de utilizar qualquer padrão interno. Exceto para o Zn, o uso do He como gás de colisão foi fundamental para garantir recuperações adequadas para os demais analitos na análise das soluções por ICP-MS. Considerando a composição química da solução de transporte (KCl, NaHCO₃, NaCl e C₆H₁₂O₆), é provável que interferências espectrais, como ⁴⁰Ar²³Na⁺ sobre ⁶³Cu⁺, ⁴⁰Ar¹⁶O⁺ sobre ⁵⁶Fe⁺ e ³⁹K¹⁶O⁺ sobre ⁵⁵Mn⁺, entre outras, tenham sido eficazmente minimizadas pelo uso da diluição de aerossol com He. Esses resultados indicam que a estratégia de compatibilização de matriz foi eficaz na minimização de possíveis efeitos de matriz na análise da solução basal por ICP OES. Além disso, os limites de quantificação variaram de 0,33 a 0,91 mg L⁻¹ para Ca, Mg e P, e de 0,07 a 0,38 µg L⁻¹ para Cu, Fe e Zn, valores considerados adequados para os objetivos do estudo (Tabela 5.7).

Para verificar a exatidão do procedimento, foi realizado um estudo de balanço de massa do sistema Transwell®. Nesse estudo, o teor de cada elemento remanescente na solução apical foi quantificado por ICP OES e ICP-MS após digestão assistida por radiação micro-ondas. Em seguida, a soma da quantidade de elemento (em massa) nas soluções basal e apical foi comparada com a quantidade inicialmente adicionada nos insertos Transwell® (Tabela 5.9 e Tabela 5.10).

TABELA 5.7 - Parâmetros analíticos dos experimentos de biodisponibilidade. Determinação de Ca, Mg e P por ICP OES (mg L⁻¹) e determinação de Cu, Fe e Zn por ICP-MS (µg L⁻¹) usando calibração externa (n = 8).

Elemento	LOD	LOQ	Precisão (RSD %)
Ca	0,28	0,91	5,62
Mg	0,097	0,33	3,52
P	0,27	0,88	4,69
Cu	0,001	0,002	7,56
Fe	0,004	0,013	9,55
Zn	0,003	0,009	2,35

TABELA 5.8 - Experimentos de adição e recuperação (recuperação \pm desvio padrão, n = 3), em dois níveis.

Amostra*	ICP OES (mg L ⁻¹)						ICP-MS (ug L ⁻¹)					
	Ca		Mg		P		Cu		Fe		Zn	
	2	30	2	30	2	30	2	30	2	30	2	30
A	100 \pm 6	100 \pm 8	102 \pm 2	101 \pm 2	88 \pm 6	100 \pm 4	94 \pm 7	97 \pm 3	87 \pm 4	100 \pm 3	88 \pm 5	97 \pm 4
B	95 \pm 4	96 \pm 3	103 \pm 1	104 \pm 3	87 \pm 5	99 \pm 7	87 \pm 7	95 \pm 4	88 \pm 6	99 \pm 4	88 \pm 7	97 \pm 6
C	101 \pm 8	100 \pm 4	101 \pm 4	100 \pm 3	92 \pm 4	101 \pm 4	98 \pm 5	98 \pm 2	101 \pm 4	98 \pm 3	89 \pm 9	97 \pm 6

*A: feijão carioca (fração biodisponível)

*B: feijão preto (fração residual)

*C: feijão guandu (variedade g18-95, fração total)

TABELA 5.9 – Balanço de massa (% m m⁻¹ \pm desvio padrão, n = 3) do experimento de biodisponibilidade.

Amostras	Ca	Mg	P	Cu	Fe	Zn
g18-95	N/A*	24 \pm 3	62 \pm 2	29 \pm 3	49 \pm 4	86 \pm 15
g18-95V	44 \pm 4	63 \pm 4	50 \pm 1	36 \pm 6	15 \pm 4	47 \pm 3
g57-95	N/A	17 \pm 4	35 \pm 1	45 \pm 4	36 \pm 4	34 \pm 4
g57-95V	25 \pm 4	28 \pm 3	35 \pm 1	37 \pm 3	9 \pm 1	30 \pm 2
Carioca	17 \pm 9	16 \pm 2	24 \pm 1	33 \pm 4	10 \pm 1	40 \pm 9
Preto	30 \pm 16	35 \pm 2	63 \pm 1	28 \pm 2	24 \pm 1	45 \pm 5

*N/A: não aplicado

TABELA 5.10 – Teor total, fração biodisponível e fração residual de Ca, Cu, Fe, Mg, P e Zn em amostras de feijão cozido (média \pm desvio padrão, n = 3).

Teor total	$\mu\text{g/poço}$			ng/poço		
	Ca	Mg	P	Cu	Fe	Zn
g18-95	1,07 \pm 0,03	34,3 \pm 0,5	66 \pm 2	413 \pm 6	247 \pm 10	340 \pm 53
g18-95V	9,2 \pm 1,1	28,7 \pm 0,3	109 \pm 3	420 \pm 7	700 \pm 66	747 \pm 40
g57-95	1,03 \pm 0,03	28,9 \pm 0,4	101 \pm 3	413 \pm 13	307 \pm 20	903 \pm 56
g57-95V	14,37 \pm 2,03	36,5 \pm 0,4	122 \pm 2	427 \pm 13	660 \pm 47	916 \pm 23
Carioca	19 \pm 1	48,2 \pm 0,6	174 \pm 4	297 \pm 17	893 \pm 3	1016 \pm 24
Preto	14,8 \pm 0,6	48,1 \pm 0,5	131 \pm 2	456 \pm 3	963 \pm 7	970 \pm 20
Fração biodisponível	$\mu\text{g /poço}$			ng/poço		
	Ca	Mg	P	Cu	Fe	Zn
g18-95	< LOQ*	3,7 \pm 0,4	18,59 \pm 0,09	51 \pm 4	93 \pm 3	154 \pm 10
g18-95V	1,83 \pm 0,07	9,9 \pm 0,5	25,2 \pm 0,1	70 \pm 9	29 \pm 7	203 \pm 11
g57-95	< LOQ*	2,8 \pm 0,3	17,71 \pm 0,09	109 \pm 7	42 \pm 3	178 \pm 12
g57-95V	1,85 \pm 0,04	5,1 \pm 0,3	20,2 \pm 0,1	83 \pm 3	2,99 \pm 0,14	140 \pm 6
Carioca	1,64 \pm 0,06	3,3 \pm 0,3	17,7 \pm 0,1	42 \pm 3	15,6 \pm 1,3	233 \pm 11
Preto	2,72 \pm 0,09	10,0 \pm 0,3	50,72 \pm 0,11	66 \pm 4	105 \pm 5	66 \pm 5
Fração residual	$\mu\text{g /poço}$			ng/poço		
	Ca	Mg	P	Cu	Fe	Zn
sdg18-95	< LOQ*	4,52 \pm 0,34	22,7 \pm 0,1	69 \pm 2	28 \pm 2	141 \pm 5
g18-95V	2,2 \pm 0,1	8,12 \pm 0,32	29,22 \pm 0,14	83 \pm 10	77 \pm 6	147 \pm 1
g57-95	< LOQ*	2,15 \pm 0,35	18,21 \pm 0,08	76 \pm 3	67 \pm 1	131 \pm 9
g57-95V	1,67 \pm 0,03	5,28 \pm 0,34	22,6 \pm 0,1	74 \pm 4	55 \pm 4	130 \pm 5
Carioca	1,49 \pm 0,05	4,31 \pm 0,35	23,82 \pm 0,08	57 \pm 2	76 \pm 1	173 \pm 37
Preto	1,74 \pm 0,08	6,73 \pm 0,33	32,13 \pm 0,14	63 \pm 3	126 \pm 2	374 \pm 27

*LOQ_{Ca} = 0,91 mg L⁻¹

Os resultados indicaram balanço de massa inferior a 86% para todos os elementos, indicando provável comprometimento do experimento em função da não integridade das células nos compartimentos do filtro Transwell, como discutido no item 5.8. Este fato pode ser observado na Tabela 5.10. Para maior facilidade de visualização os resultados estão descritos em concentração e não em fração de massa. Desta forma a biodisponibilidade não foi calculada, procurando-se evitar conclusões não pertinentes. Devido à complexidade do ensaio com células Caco-2, da inadequação dos resultados de balanço de massa e considerando que a quantidade de elemento retido nas monocamadas celulares não foi medida, esses resultados foram considerados adequados para prever a biodisponibilidade de elementos essenciais em feijão.

Embora a fração bioacessível forneça um indicativo importante do teor máximo de elementos disponíveis no trato gastrointestinal após a digestão *in vitro*, ela não é totalmente absorvida pelo epitélio intestinal, como foi observado em diversos trabalhos na literatura (BRIGIDE *et al.*, 2019; DELAQUA *et al.*, 2022; TEIXEIRA *et al.*, 2022.; SANTOS; NICIURA; NOGUEIRA, 2023). Por isso, células Caco-2 diferenciadas em insertos Transwell® são utilizadas para simular a absorção intestinal e estimar a fração biodisponível de nutrientes. Após a incubação das amostras por 2 horas, os valores de TEER obtidos foram inferiores a 250 Ω cm² em todos os poços, indicando que a integridade das monocamadas celulares foi comprometida durante os experimentos. No epitélio intestinal, os elementos podem ser absorvidos por diferentes mecanismos: através do transporte transcelular, no qual se difundem passivamente pelas células ou com o auxílio de proteínas transportadoras; ou por transporte paracelular, atravessando passivamente as junções de oclusão que conectam as monocamadas celulares adjacentes (XU *et al.*, 2021).

Estudos indicam que a maioria dos elementos liberados da matriz elementar no trato gastrointestinal humano pode se ligar a compostos de baixa massa molecular (como aminoácidos e peptídeos) e ser absorvida pela via paracelular (PISKIN *et al.*, 2022). Como a superfície da membrana apical da célula é significativamente maior do que a das junções de oclusão, os compostos transportados pela via paracelular tendem a ser absorvidos em menor quantidade em comparação aos que atravessam o epitélio pela via transcelular. Além disso, o transporte ativo mediado por transportadores, responsável por taxas de absorção mais elevadas, depende fortemente da espécie química do elemento disponível no trato gastrointestinal (VAN BREEMEN; LI, 2005).

5.7 – Avaliação da composição bromatológica

A composição bromatológica das amostras de feijão cru, estimados pelos métodos padrão, estão apresentados na Tabela 5.11.

TABELA 5.11 - Composição bromatológica das amostras de feijão. Matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), teor de carbono (C), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e extrato etéreo (EE). Os resultados são apresentados em % ($m\ m^{-1}$), corrigidos em base seca.

Amostra	MS (%)	MM (%)	PB (%)	C (%)	FDN (%)	FDA (%)	E.E (%)
G18-95*	92,78	4,29	21,58	44,75	19,87	11,08	2,47
G57-95*	93,67	4,00	22,73	43,47	22,83	12,06	2,03
G18-95V**	90,72	1,07	20,53	43,64	14,49	14,49	0,59
G57-95V**	93,54	1,23	18,86	43,72	16,07	15,90	0,81
Preto	93,37	2,47	23,38	42,68	24,39	14,87	1,54
Carioca	92,31	2,51	23,48	44,54	29,96	15,77	1,77

*feijão guandu (grão maduro)

**feijão guandu (grão verde)

De modo geral as amostras apresentam teores de matéria seca e carbono total similar, superiores a 90% e 40%, respectivamente. Quanto ao teor de cinzas (material mineral), é observado que as variedades do feijão guandu maduro (g18-95 e g57-95) apresentam valores superiores (4,29 e 4,00%, respectivamente) em relação ao feijão carioca (2,51%) e ao feijão preto (2,47%). É também notável a diferença na composição mineral entre grão maduro e grão verde (g18-95V, 1,07%; g57-95V, 1,23%). De maneira análoga, o teor de gordura total – expresso através do extrato etéreo (EE) – é superior nas amostras g18-95 e g57-95 (2,47 e 2,03%, respectivamente) em relação ao feijão carioca (1,77%) e ao feijão preto (1,54%), e também superiores em relação a g18-95V (0,59%) e g57-95V (0,81%). Para proteína bruta, as variedades do feijão guandu maduro apresentam teores próximos aos observados no feijão carioca e feijão preto, todos próximos a 23%. Além disso, nota-se que os teores de proteína bruta nos feijões verdes são relativamente inferiores quando comparados com as demais amostras avaliadas.

As diferenças observadas entre os grãos maduros e os grãos verdes

podem estar relacionadas com o estágio de maturação do grão (ABEBE, 2022; WU *et al.*, 2024). O processo de maturação da semente de uma planta compreende uma série de alterações morfológicas, fisiológicas e funcionais que ocorrem a partir da fertilização do óvulo, prosseguindo até o momento em que as sementes estão em condições para a colheita (DADLANI; YADAVA, 2023). Durante o processo de formação e maturação das sementes, são verificadas alterações na massa da matéria seca, fibras, teor de umidade, tamanho, germinação, teor mineral, dentre outras características. À medida que um grão atinge seus estágios finais de maturação, é observado um acúmulo crescente de biocompostos e minerais (SOUSA *et al.*, 2024; WU *et al.*, 2024).

A célula vegetal é envolvida por uma parede celular rígida, predominantemente composta por celulose, que pode sofrer espessamento, dando origem a uma segunda parede formada por lignina e hemicelulose (SALMAN *et al.*, 2010). No método de Van Soest (1991) para determinação de fibras, realiza-se a separação entre o conteúdo celular e a parede celular. Esse processo é realizado aquecendo uma parte da amostra em solução de detergente neutro. O conteúdo celular se dissolve no detergente, enquanto a parede celular não se solubiliza, podendo ser separada por filtração. As frações obtidas são classificadas como solúveis em detergente neutro (compostas por proteínas, nitrogênio não proteico (NNP), lipídeos, pigmentos, açúcares, ácidos orgânicos e pectina) e FDN (constituída principalmente por celulose, hemicelulose e lignina).

Ao utilizar uma solução de detergente ácido, a hemicelulose presente na FDN se dissolve, enquanto a lignina associada à celulose (lignocelulose) é separada por filtração. As frações obtidas são chamadas de solúveis em detergente ácido e FDA, respectivamente. Em alimentação animal, a fração solúvel é totalmente aproveitada por ruminantes e outros herbívoros, e parcialmente por monogástricos não herbívoros. A FDA corresponde à parte menos digestível da parede celular das plantas. A fibra detergente neutra é um bom indicativo da ingestão de fibras e, conseqüentemente, da quantidade de ração, enquanto a fibra detergente ácida é um bom indicador da digestibilidade e, por conseqüência, da ingestão de calorias (SOUZA *et al.*, 1999).

A diferença nos teores de fibra, e conseqüentemente na FDN, entre o grão verde e o grão maduro é explicada pelas mudanças na composição da parede celular da planta durante a maturação. Conforme o grão amadurece, a quantidade de

parede celular aumenta. No grão verde, as paredes celulares são mais finas e menos lignificadas, o que resulta em uma menor concentração de FDN. Já no grão maduro, a parede celular se torna mais espessa e mais lignificada, aumentando a quantidade de FDN (VAN SOEST, 2018).

5.8 – Avaliação da bioacessibilidade *in vitro* de proteínas e composição de aminoácidos

Na Tabela 5.12 é apresentado o teor total, a fração bioacessível, a fração residual e o balanço de massas de proteína bruta, que foi determinada pelo método da combustão de Dumas. A Figura 5.1 apresenta os teores totais e a fração bioacessível dos mesmos.

TABELA 5.12 - Teor total, fração bioacessível, fração residual (média \pm desvio padrão, % m m⁻¹, n = 3, base úmida) e balanço de massa (% m m⁻¹) de proteína* em amostras de feijão cozido. Nome das amostras seguidos por letras iguais indicam diferença não significativa baseado em teste Tuckey (p < 0,05).

Amostra	Teor total	Fração bioacessível	Fração residual	Balanço de massa (%)
g18-95^a	21,6 \pm 0,2	16,9 \pm 0,6	1,91 \pm 0,07	87 \pm 4
g18-95V^b	20,5 \pm 0,2	17,6 \pm 1,3	1,80 \pm 0,14	94 \pm 10
g57-95^c	22,7 \pm 0,1	19,4 \pm 1,9	2,00 \pm 0,08	90 \pm 9
g57-95V^d	18,9 \pm 0,3	16,8 \pm 0,7	1,90 \pm 0,14	99 \pm 8
Carioca^e	23,4 \pm 0,4	17,6 \pm 0,9	3,93 \pm 0,21	92 \pm 7
Preto^e	23,5 \pm 0,4	16,4 \pm 1,4	3,63 \pm 0,11	85 \pm 8

*Fator de conversão nitrogênio-proteína = 6,25

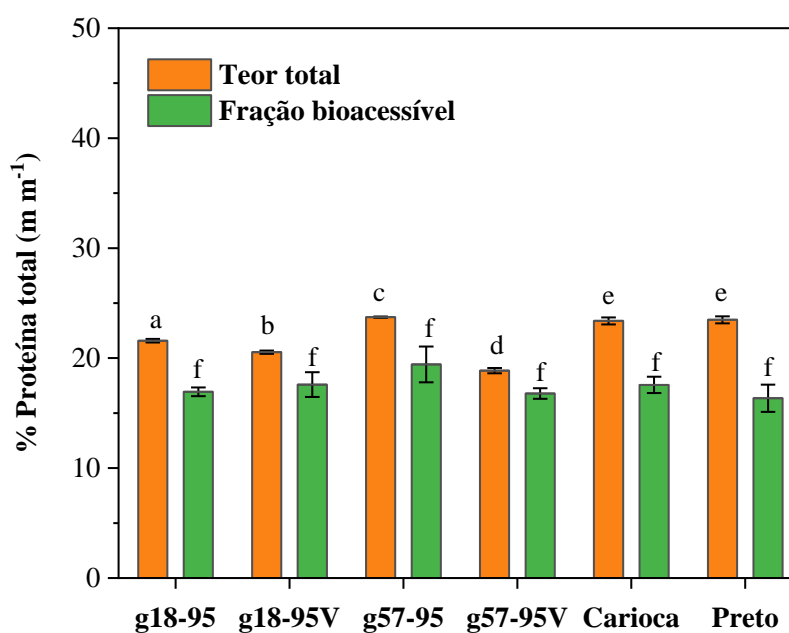


FIGURA 5.6 - Bioacessibilidade de proteína em amostras de feijão cozido. Barras seguidas por letras iguais indicam diferença não significativa baseado em teste T pareado ($p < 0,05$).

Com 95% de confiança, as variedades g18-95 e g57-95, tanto de grãos maduros quanto verdes, apresentaram diferença significativa no teor total de proteína bruta. Dentre os feijões avaliados, as variedades carioca e preto exibem os maiores teores de proteína, sem diferença significativa entre elas. Quanto à fração bioacessível, observou-se que todos os feijões não apresentaram diferença significativa no percentual bioacessível. Esse resultado indica que, apesar das variações na composição total, o percentual bioacessível é, com 95% de confiança, equivalente entre as amostras. O balanço de massas, que variou de 85 a 99%, sugere que não houve erros sistemáticos na quantificação das frações, o que permite concluir que o método analítico utilizado foi confiável para estimar a bioacessibilidade da proteína bruta. Esse conteúdo proteico é comparável ao das leguminosas convencionais amplamente consumidas, como ervilhas, lentilhas, lupinos, grão-de-bico, soja, favas, feijão-mungo, entre outras, que geralmente fornecem de 20% a 40% de proteína dietética com base no peso seco (GU *et al.*, 2023).

A Tabela 5.13 apresenta a composição de aminoácidos na fração bioacessível do feijão guandu.

TABELA 5.13 – Composição de aminoácidos (% m m⁻¹) na fração bioacessível de feijão guandu.

Aminoácido (%)	g18-95V	g57-95
Ácido aspartico	1,2	1,4
Ácido glutâmico	2	2,6
Serina	0,6	0,8
Glicina	0,4	0,6
Histidina	0,4	0,6
Taurina	<0,01*	<0,01*
Arginina	0,8	0,8
Treonina	0,4	0,6
Alanina	0,4	0,6
Prolina	0,6	0,6
Tirosina	0,4	0,4
Valina	0,6	0,6
Metionina	<0,01*	<0,01*
Cistina	<0,01*	<0,01*
Isoleucina	0,6	0,6
Leucina	1	1,2
Fenilalanina	0,8	1,2
Lisina	0,8	1
Hidroxiprolina	<0,01*	<0,01*
Proteína bruta	12,6	15,2
Aminoácido total	11	13,6
Aminoácido total livre	1,6	1,6

*Limite de detecção (LOD)

O experimento foi realizado com o propósito de verificar a pertinencia de se calcular o nitrogenio total na fração bioacessível, sem a etapa de precipitação da proteína e posterior análise no precipitado, com uma etapa experimental a mais e consequente aumento da probabilidade de erros analíticos. É possível observar uma diferença quando comparados os resultados de proteína bruta obtidos a partir da conversão do teor de N total obtido por combustão ($17,6 \pm 1,3$ e $16,8 \pm 0,7\%$) com observado na Tabela 5.13 (12,6 e 15,2 %). No primeiro caso os resultados foram obtidos a partir do fator de conversão utilizado (6,25), que considera o teor medio de proteína nas amostras (aproximadamente 16%), enquanto que no segundo o resultado é expresso a partir da quantificação dos aminoácidos. Considerando os resultados obtidos, assim como o balanço de massa, pode-se dizer que o protocolo seguido é adequado. No entanto, para conclusão mais acertiva seria necessária a comparação entre um maior número de amostras e a realização de experimento

empregando a precipitação.

De forma geral, foram encontradas quantidades $\geq 1\%$ de ácido glutâmico, ácido aspártico e leucina em ambas as amostras. Para o grão maduro, a lisina e a fenilalanina estão presentes em quantidades $\geq 1\%$, em comparação ao grão verde. Por outro lado, no grão maduro, as quantidades de glicina, histidina, treonina, alanina e tirosina foram baixas ($\leq 0,4\%$), e não foram detectadas metionina, cistina e taurina em nenhum dos dois grãos. O conteúdo de aminoácidos contendo enxofre (metionina, cistina e taurina) é, em geral, baixo nas proteínas de origem vegetal, quando comparado a produtos de origem animal (AUER et al., 2024). Os resultados apresentados na Tabela 5.3 indicam que cerca de 90% do teor total de proteína bruta é composto por aminoácidos bioacessíveis. Esse resultado é um indicativo positivo do valor nutricional dos feijões e outras leguminosas semelhantes como complemento na nutrição humana.

5.9 – Aspectos nutricionais: suprimento de proteína e elementos essenciais através do consumo de feijão guandu

Estudos recentes indicam que padrões alimentares ricos em feijão estão associados a uma melhor qualidade da dieta, maior ingestão de nutrientes deficientes e redução da ingestão de açúcares. Com base nisso, recomenda-se o consumo de 100 g de feijão por dia para adultos, como parte de uma dieta equilibrada (MARINANGELI *et al.*, 2017; PAPANIKOLAOU; SLAVIN; FULGONI, 2024). Nesse contexto, foi estimada a contribuição do feijão guandu (verde e maduro) e dos feijões carioca e preto para a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, cálcio, cobre, ferro, magnésio, fósforo e zinco, considerando o consumo de 100 g do alimento cozido. As estimativas foram calculadas com base nos principais grupos de consumidores brasileiros de feijão, abrangendo adultos (homens e mulheres) de 18 a 60 anos, utilizando os valores totais de cada mineral essencial e as necessidades alimentares recomendadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, conforme a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 269, de 22 de setembro de 2005. Os resultados podem ser consultados na Tabela 5.14.

TABELA 5.14 - Contribuição de feijão (porção de 100 g) para a ingestão diária recomendada de elementos essenciais.

Nutriente	Ingestão Diária Recomendada* (mg dia ⁻¹)	Contribuição para a IDR (%)					
		g18-95 ^a	g18-95V ^b	g57-95 ^a	g57-95V ^b	Carioca	Preto
Ca	1000	2,8	0,3	4,3	0,3	5,6	4,4
Cu	900	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
Fe	14	15,0	5,0	14,3	6,4	19,1	20,6
Mg	260	33,1	39,6	42,3	33,5	55,7	55,5
P	700	28,4	46,9	43,3	52,4	74,8	56,1
Zn	7	14,3	31,4	38,6	40,0	43,6	41,6
Proteína	50000	33,8	35,2	38,8	33,6	35,2	32,8

a: grão maduro

b: grão verde

Os dados apresentados na Tabela 5.14 sugerem que o feijão guandu pode ser uma fonte alternativa de elementos essenciais, destacando Mg e P. Além disso, para o guandu, é notável que o grão maduro é superior em relação ao grão verde, devido às características relacionadas ao estágio e processo de maturação comentadas anteriormente (item 5.7). Apesar de uma positiva contribuição do guandu, esta é menor comparado as variedades comerciais de feijão carioca e preto. Com relação a proteínas, todos os feijões estudados apresentam potencialidade para suplementação dessas, variando de 32,8 – 38,8% da IDR, reforçando a importância dessas leguminosas e de outras na nutrição humana.

Os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), apresentados na Tabela 5.13 (item 5.9), estão entre os aminoácidos essenciais mais abundantes e são fundamentais para a saúde humana (SHARMA et al., 2024). Leucina, isoleucina e valina, que possuem cadeias laterais alifáticas, são aminoácidos α essenciais para o equilíbrio de nitrogênio do corpo, o crescimento e o desenvolvimento das células musculares esqueléticas. Além disso, esses aminoácidos estão envolvidos em vários processos metabólicos importantes para as vias celulares e têm um papel central na relação entre dieta, saúde e envelhecimento (GREEN; LAMMING, 2019; VANWEERT et al., 2022). O potencial dos BCAAs como suplementos alimentares para o tratamento de diferentes distúrbios tem sido estudado em modelos humanos e de camundongos,

e foi demonstrado que eles influenciam a atividade metabólica, melhoram a bioenergética mitocondrial, promovem o crescimento muscular e mantêm a saúde mitocondrial (HOLECEK, 2018; RUOCCO et al., 2021).

De acordo com as recomendações para a ingestão de proteínas para adultos (WHO, 2007), os grãos avaliados (g18-95V e g57-95) não atendem aos requisitos para valina, leucina e isoleucina. Considerando o percentual desses aminoácidos presente nos grãos (Tabela 5.3), uma suplementação de 100 g de feijão forneceria aproximadamente 6 mg de valina/g de proteína (recomendado de 39 mg/g de proteína), 10 mg de leucina/g de proteína (recomendado de 59 mg/g de proteína) e 6 mg de isoleucina/g de proteína (recomendado de 30 mg/g de proteína) em ambos os grãos avaliados. No entanto, essas limitações podem ser superadas por meio de uma dieta equilibrada, complementada com outros alimentos tanto de origem vegetal quanto animal.

Apesar da menor contribuição mineral em relação ao feijão carioca e preto, o feijão guandu situa-se entre as mais importantes culturas de leguminosas, pois é capaz de produzir colheitas de excelente teor nutricional, mesmo em solos de baixa fertilidade, e adaptação a altas temperaturas e condições de seca (GODOY; SOUZA, 2004; SHERASIA; GARG; BHANDERI, 2018), tornando-a um atrativo para pequenos produtores com escassez de recursos ou em regiões semi-áridas.

CONCLUSÕES

6 – CONCLUSÕES

O teor total e a fração bioacessível de proteína bruta apresentaram resultados de balanço de massa no intervalo de 85-99%. Além disso, o perfil de aminoácidos bioacessível sugere o feijão guandu como alternativa para ser utilizado na suplementação nutricional. Considerando os principais aminoácidos relacionados à estrutura muscular (leucina, isoleucina e valina), os teores bioacessíveis nas amostras estudadas estão abaixo da ingestão recomendada. Porém, o consumo dos mesmos em uma dieta equilibrada, complementada com outros alimentos (como carnes, por exemplo), pode levar à níveis satisfatórios desses aminoácidos ingeridos.

O teor total e a fração bioacessível de Ca, Cu, Fe, Mg, P e Zn em feijão guandu foram determinados por ICP OES com visão dupla vertical síncrona (SVDV) após digestão assistida por radiação micro-ondas. Os resultados da etapa de validação confirmaram a adequação do método tanto para a determinação total quanto da bioacessibilidade *in vitro* para a aplicação proposta. A abordagem SVDV foi eficaz na determinação simultânea de macro e microelementos em amostras de feijão em uma única análise instrumental, o que resultou na redução do tempo de análise e no menor consumo de argônio em comparação ao ICP OES convencional com sistema de visão dupla. De maneira geral, o teor total de elementos essenciais não foi significativamente afetado pelo método de cocção avaliado, evidenciando a importância da aplicação dos fatores de rendimento de peso para corrigir os resultados. Apenas o teor total de fósforo em uma amostra (g57-95V) foi substancialmente alterado após a cocção.

O estudo de bioacessibilidade *in vitro* indicou que cálcio nas amostras de feijão guandu maduro apresentou baixa bioacessibilidade após a digestão gastrointestinal. Além disso, observou-se, com exceção de cobre, que o estágio de maturação do grão afeta a solubilização dos analitos. Os resultados sugerem que a maturação do grão impacta negativamente na bioacessibilidade, embora os teores totais dos elementos aumentem à medida que o grão se desenvolve. De acordo com os valores estimados de RDA, o feijão guandu pode ser considerado uma fonte boa ou razoável de elementos como Mg, P e Zn para a dieta humana, embora ainda não supere as variedades de feijão comum já consolidadas na alimentação cotidiana brasileira. Este estudo tem significativa relevância nutricional, apresentando dados inéditos sobre os aspectos nutritivos de duas variedades de feijão guandu

desenvolvidas no país, incluindo a bioacessibilidade de elementos essenciais, o que torna essa variedade uma possível alternativa de consumo.

Um modelo intestinal humano baseado em células Caco-2 foi estudado para estimar a biodisponibilidade *in vitro* de elementos essenciais nas amostras. Apesar da complexidade da solução basal proveniente dos bioensaios com células Caco-2, a aplicação de estratégias analíticas instrumentais e célula de colisão, associada ao uso de compatibilização de matriz como método de calibração, possibilitou a quantificação da fração biodisponível dos elementos por ICP OES e ICP-MS. Nesse contexto, a avaliação cuidadosa das condições instrumentais e a validação dos métodos para análise das soluções basal e apical foram essenciais para obter resultados com a confiabilidade necessária. Por outro lado, os resultados mostraram que devido à instabilidade da monocamada celular observada, não foi possível estimar a biodisponibilidade dos elementos.

Como conclusão final, este estudo oferece uma avaliação nutricional valiosa, considerando o guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) como uma alternativa viável de consumo, além de apresentar dados inéditos sobre a influência do estágio de maturação na bioacessibilidade de elementos essenciais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEBE, B. The dietary use of pigeon pea for human and animal diets. *Scientific World Journal*, v. 2022, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/4873008>.

ADENEKAN, M. K.; FADIMU, G. J.; ODUNMBAKU, L. A.; OKE, E. K. Effect of isolation techniques on the characteristics of pigeon pea (*Cajanus cajan*) protein isolates. *Food science & nutrition*, United States, v. 6, n. 1, p. 146–152, 2018. <https://doi.org/10.1002/fsn3.539>.

AGILENT TECHNOLOGIES. High Matrix Introduction Agilent ICP-MS technology brief. p. 1–2, 2020. Disponível em: https://hpst.cz/sites/default/files/download/2021/02/hmi_icp-ms-5994-1170en-us-agilent.pdf. Acesso em: 26/04/2024.

AGILENT TECHNOLOGIES. Synchronous Vertical Dual View (SVDV) for superior speed and performance. p. 1-4, 2016. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5991-4853EN.pdf>. Acesso em: 28/01/2025.

ANDERSON, J. W.; BAIRD, P.; DAVIS, R. H.; FERREI, S.; KNUDTSON, M.; KORAYM, A.; WATERS, V.; WILLIAMS, C. L. Health benefits of dietary fiber, *Nutrition Reviews*, v. 67, n. 4, p. 188-205, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00189.x>.

ANDERSON, J. W.; RANGLES, K. M.; KENDALL, C. W. C.; JENKINS, D. J. A. Carbohydrate and fiber recommendations for individuals with diabetes: a quantitative assessment and meta-analysis of the evidence. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 23, p. 5-17, 2004. <https://doi.org/10.1080/07315724.2004.10719338>

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 749, de 5 de Setembro de 2022.

AOAC, 1990. Official methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. USA, AOAC. Disponível em: <https://law.resource.org/pub/us/cfr/ibr/002/aoac.methods.1.1990.pdf>. Acesso em: 18/09/2024.

ARAÚJO, G. C. L.; GONZALEZ, M. H.; FERREIRA, A. G.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, v. 57, n. 12, p. 2121–2132, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(02\)00164-7](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(02)00164-7).

AUER, J.; ALMINGER, M.; MARINEA, M.; JOHANSSON, M.; ZAMARATSKAIA, G.; HÖGBERG, A.; LANGTON, M. Assessing the digestibility and estimated bioavailability/bioaccessibility of plant-based proteins and minerals from soy, pea and faba bean ingredients. *LWT - Food Science and Technology*, v. 197, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.115893>.

BARROS, A. I.; PINHEIRO, F. C.; AMARAL, C. D. B.; LORENÇATTO, R.; NÓBREGA, J. A. Aerosol dilution as a simple strategy for analysis of complex samples by ICP-MS. *Talanta*, v. 178, n. October 2017, p. 805–810, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.10.024>.

BASU, P. S.; SINGH, U.; KUMAR, A.; PRAHARAJ, C. S.; SHIVRAN, R. K. Climate change and its mitigation strategies in pulses production. *Indian Journal of Agronomy*, v. 61, p. 71–82, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/311717987>. Acesso em: 07/03/2024.

BEISEIGEL, J. M.; HUNT, J. R.; GLAHN, R. P.; WELCH, R. M.; MENKIR, A.; MAZIYA-DIXON, B. B. Iron bioavailability from maize and beans: a comparison of human measurements with Caco-2 cell and algorithm predictions. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 86, n. 2, p. 388–396, 2007. <https://doi.org/10.1093/ajcn/86.2.388>.

BENEVIDES, C. M. J.; SOUZA, M. V.; SOUZA, R. D. B.; LOPES, M. V. Fatores antinutricionais em alimentos : revisão. *Segurança Alimentar e Nutricional*, v. 18, n. 71, p. 67–79, 2011. <https://doi.org/10.20396/san.v18i2.8634679>.

BIRKETVEDT, G. S.; SHIMSHI, M.; ERLING, T.; FLORHOLMEN, J. Experiences with three different fiber supplements in weight reduction. *Medical Science Monitor*, v. 11, p. 15–18, 2005.

BOYD, B. J. *et al.* Successful oral delivery of poorly water-soluble drugs both depends on the intraluminal behavior of drugs and of appropriate advanced drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 137, p. 104967, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.104967>.

BRIGIDE, P.; DE TOLEDO, N. M. V.; LÓPEZ-NICOLÁS, R.; ROS, G.; FRONTELA SASETA, C.; DE CARVALHO, R. V. Fe and Zn: *In vitro* bioavailability in relation to antinutritional factors in biofortified beans subjected to different processes. *Food and Function*, v. 10, n. 8, p. 4802–4810, 2019. <https://doi.org/10.1039/c9fo00199a>.

BRODKORB, A.; EGGER, L.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; ASSUNÇÃO, R.; BALLANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIEU-LACANAL, C.; BOUTROU, R.; CARRIÈRE, F.; CLEMENTE, A.; CORREDIG, M.; DUPONT, D.; DUFOUR, C.; EDWARDS, C.; GOLDING, M.; KARAKAYA, S.; KIRKHUS, B.; LE FEUNTEUN, S.; LESMES, U.; MACIERZANKA, A.; MACKIE, A. R.; MARTINS, C.; MARZE, S.; McCLEMENTS, D. J.; MÉNARD, O.; MINEKUS, M.; PORTMAN, R.; SANTOS, C. N.; SOUCHON, I.; SINGH, R. P.; VEGARUD, G. E.; WICKHAM, M. S. J.; WEITSCHIES, W.; RECIO, I. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>.

BROWN, L.; ROSNER, B.; WILLET, W. W.; SACKS, F. M. Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 69, n. 1, p. 30–42, 1999. <https://doi.org/10.1093/ajcn/69.1.30>.

CAI, X.; CHEN, X.; YIN, N.; DU, H.; SUN, G.; WANG, L.; XU, Y.; CHEN, Y.; CUI, Y. Estimation of the bioaccessibility and bioavailability of Fe, Mn, Cu, and Zn in Chinese vegetables using the *in vitro* digestion Caco-2 cell model: the influence of gut microbiota. *Food and Function*, v. 8, n. 12, p. 4592–4600, 2017. <https://doi.org/10.1039/C7FO01348E>.

CAÑABATE, Á.; GARCÍA-RUIZ, E.; RESANO, M.; TODOLÍ, J. L. Analysis of whole blood by ICP-MS equipped with a high temperature total sample consumption system. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 32, n. 1, p. 78–87, 2017. <https://doi.org/10.1039/c6ja00374e>.

CARDOSO, C.; AFONSO, C.; LOURENÇO, H.; COSTA, S.; NUNES, M. L. Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk-benefit evaluation of food. *Trends in Food Science and Technology*, v. 41, n. 1, p. 5–23, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.08.008>.

CARREIRA, R. L.; ORNELLAS, C. B. D.; MORAIS, H. A.; MOTTA, S.; SILVESTRE, M. P. C. Efeito da precipitação pelo ácido tricloroacético (TCA) e da ultrafiltração sobre o perfil peptídico de hidrolisados de caseína. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 2, 2003. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542003000200023>.

CHEN, P. X.; BOZZO, G. G.; FREIXAS-COUTIN, J. A.; MARCONE, M. F.; PAULS, P. K.; TANG, Y.; ZHANG, B.; LIU, R.; TSAO, R. Free and conjugated phenolic compounds and their antioxidant activities in regular and non-darkening cranberry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed coats. *Journal of Functional Foods*, v. 18, p. 1047–1056, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.032>.

CHEN, X.; SINGH, A.; KITTS, D. D. *In-vitro* bioaccessibility and bioavailability of heavy metals in mineral clay complex used in natural health products. *Scientific Reports*, v. 10, n. 8823, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65449-4>.

CHOLEVA, T. G.; TZIASIOU, C.; GOUMA, V.; VLESSIDIS, A. G.; GIOKAS, D. L. *In vitro* assessment of the physiologically relevant oral bioaccessibility of metallic elements in edible herbs using the unified bioaccessibility protocol. *Molecules*, v. 28, n. 14, 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28145396>.

CLASEN, C. D.; SILVA, S. A.; RIBEIRO, K. Q.; RIBEIRO, A. S.; VIEIRA, M. A. Evaluation of total concentrations and bioaccessible fractions of essential and toxic elements in amaranth, quinoa and chia by MIP OES. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, p. 1–15, 2023. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20230176>.

DADLANI, M.; YADAVA, D. K. *Seed Science and Technology: Biology, Production, Quality*. <https://doi.org/10.1007/978-981-19-5888-5>.

DELAQUA, D.; CARNIER, R.; CADORE, S.; SANCHES, V. L.; BERTON, R. S.; CORBI, F. C. A.; COSCIONE, A. R. *In vitro* bioaccessibility and bioavailability of selenium in agronomic biofortified wheat. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 105, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104253>.

DONATI, G. L.; AMAIS, R. S.; WILLIAMS, C. B. Recent advances in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 32, n. 7, p. 1283–1296, 2017. <https://doi.org/10.1039/c7ja00103g>.

FAO, 2003. Food energy – methods of analysis and conversion factors. Rome, FAO. Disponível em: https://www.fao.org/uploads/media/FAO_2003_Food_Energy_02.pdf. Acesso em: 18/09/2024.

FAO, 2011. Quality assurance for animal feed analysis laboratories. Rome, FAO. Disponível em: <https://www.fao.org/4/i2441e/i2441e00.htm>. Acesso em: 18/09/2024.

FAO, 2019. The state of food and agriculture: Moving forward on food loss and waste reduction. Rome, FAO. Disponível em: <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/ca6030en>. Acesso em: 16/03/2024.

FARIA, M. A.; ARAÚJO, A.; PINTO, E.; OLIVEIRA, C.; OLIVA-TELES, M. T.; ALMEIDA, A.; DELERUE-MATOS, C.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Bioaccessibility and intestinal uptake of minerals from different types of home-cooked and ready-to-eat beans. *Journal of Functional Foods*, v. 50, p. 201–209, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.001>.

FEITOSA, S.; GREINER, R.; MEINHARDT, A.-K.; MÜLLER, A.; ALMEIDA, D. T.; POSTEN, C. Effect of traditional household processes on iron, zinc and copper bioaccessibility in black bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Foods* (Basel, Switzerland), Switzerland, v. 7, n. 8, 2018. <https://doi.org/10.3390/foods7080123>.

FELIX, K.; TOBIAS, S.; JAN, H.; NICOLAS, S.; MICHAEL, M. Measurements of transepithelial electrical resistance (TEER) are affected by junctional length in immature epithelial monolayers. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 156, n. 6, p. 609–616, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00418-021-02026-4>.

FERNANDES, A. C.; NISHIDA, W.; DA COSTA PROENÇA, R. P. Influence of soaking on the nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cooked with or without the soaking water: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 45, n. 11, p. 2209–2218, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02395.x>.

FERREIRA, A. S. T.; NAOZUKA, J.; KELMER, G. A. R.; OLIVEIRA, P. V. Effects of the domestic cooking on elemental chemical composition of beans species (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Processing*, v. 2014, p. 1–6, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/972508>.

FERREIRA, B. A.; SILVA, A. R. A.; FILBIDO, G. S.; NARITA, I. M. P.; PINHEIRO, A. P. O.; SILVA, D. C.; NASCIMENTO, E.; VILLA, R. D.; OLIVEIRA, A. P. *In-vitro* bioaccessibility of the bioactive compounds and minerals in the pulp and peel of *Buchenavia tomentosa* Eichler fruits and their antioxidant capacities. *Measurement: Food*, v. 8, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.meaf00.2022.100064>.

FU, J.; CUI, Y. *In vitro* digestion Caco-2 cell model to estimate cadmium and lead bioaccessibility/bioavailability in two vegetables: The influence of cooking and additives. *Food and Chemical Toxicology*, v. 59, p. 215–221, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.014>.

FULLER, D.; MURPHY, C.; KINGWELL-BANHAM, E.; CASTILLO, C.; NAIK, S. *Cajanus cajan* (L.) Millsp. origins and domestication: The South and Southeast Asian archaeobotanical evidence. *Genetic Resources and Crop Evolution*, v. 66, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10722-019-00774-w>.

GABAZA, M.; SHUMOY, H.; LOUWAGIE, L.; MUCHUWETI, M.; VANDAMME, P.; DU LAING, G.; RAES, K. Traditional fermentation and cooking of finger millet: Implications on mineral binders and subsequent bioaccessibility. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 68, p. 87–94, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.05.011>.

GAMA, M. R.; MELCHERT, W. R.; PAIXÃO, T. R. L. C.; ROCHA, F. R. P. An overview of the Brazilian contributions to Green Analytical Chemistry. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 91, 2019. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180294>.

GARANIYA, N. H.; BAMBHANEYYA, S. M.; PATEL, S. G.; BAMBHAROLIA, R. P. Comparing anti-nutritional factors in pigeon pea: seeds vs. Seed coats. *Anais do Plant and Soil Research*, v. 25, n. 4, p. 614–619, 2023. Disponível em: <https://gkvsociety.com/control/uploads/7873412.pdf>. Acesso em: 04/05/2024.

GEDIK, K. Bioaccessibility of heavy metals in rapa whelk *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846): Assessing human health risk using an *in vitro* digestion model. *Human and Ecological Risk Assessment*, v. 24, n. 1, p. 202–213, 2018. <https://doi.org/10.1080/10807039.2017.1373329>.

GŁUCHOWSKI, A.; CZARNIECKA-SKUBINA, E.; KOSTYRA, E.; WASIAK-ZYS, G.; BYLINKA, K. Sensory features, liking and emotions of consumers towards classical, molecular and note by note foods. *Foods* (Basel, Switzerland), Switzerland, v. 10, n. 1, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10010133>.

GODOY, R.; SOUZA, F. H. D. de. Dormência em sementes de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 33, n. 6 suppl 3, p. 2201–2205, 2004. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982004000900004>.

GREEN, C. L.; LAMMING, D. W. Regulation of metabolic health by essential dietary amino acids. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 177, p. 186-200, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2018.07.004>.

GU, J.; BK, A.; WU, H.; LU, P.; NAWAZ, M.A.; BARROW, C.J.; DUNSHEA, F.R.; SULERIA, H.A.R. Impact of processing and storage on protein digestibility and bioavailability of legumes. *Food Reviews International*, v. 39, p. 4697 - 4724, 2023.

GUTKOSKI, L. C.; DURIGON, A.; MAZZUTTI, S.; SILVA, A. C. T. da; ELIAS, M. C. Efeito do período de maturação de grãos nas propriedades físicas e reológicas de trigo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n. 4, p. 888–894, 2008. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612008000400019>.

GWALA, S.; KYOMUGASHO, C.; WAINAINA, I.; ROUSSEAU, S.; HENDRICKX, M.; GRAUWET, T. Ageing, dehulling and cooking of Bambara groundnuts: Consequences for mineral retention and: *In vitro* bioaccessibility. *Food and Function*, v. 11, n. 3, p. 2509–2521, 2020. <https://doi.org/10.1039/c9fo01731c>.

HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. *Journal of the Association of the Official Analytical Chemists*, v. 72, p. 912-916, 1989.

HAN, O.; FAILLA, M. L.; HILL, A. D.; MORRIS, E. R.; SMITH, J. C. Inositol phosphates inhibit uptake and transport of iron and zinc by a human intestinal cell line. *The Journal of Nutrition*, v. 124, n. 4, p. 580–587, 1994. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jn/124.4.580>.

HERREMAN, L.; NOMMENSEN, P.; PENNING, B.; LAUS, M. C. Comprehensive overview of the quality of plant - and animal - sourced proteins based on the digestible indispensable amino acid score. *Food Science & Nutrition*, v. 8, n.10, p. 5379-5391, 2020. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1809>.

HOLECEK, M. Branched-chain amino acids in health and disease: Metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutrition & Metabolism*, v. 15, n.33, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0271-1>.

HOWARD, L. R.; WHITE, B. L.; UEBERSAX, M. A.; SIDDIQ, M. Dry beans processing, quality evaluation, and nutrition. *Handbook of Vegetables and Vegetable Processing*, v. II, p. 559–587, 2018. <https://doi.org/10.1002/9781119098935.ch24>.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos: Documento de caráter orientativo (DOQ-CGCRE-008). Coordenação Geral de Acreditação, p. 30, 2020.

HUBATSC, I.; RAGNARSSON, E. G. E.; ARTURSSON, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat. Protoc.* v. 2, p. 2111–2119, 2007. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.303>.

KEN NEUBAUER, A.; FURUKAWA, M. Measurement of Cesium, Lithium, and Rubidium in Desalination Discharge Brines with the Avio 220 Max ICP OES. p. 1–6. Disponível em: <https://resources.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/app-measurement-of-cesium-lithium-and-rubidium-in-desalination-discharge-brines.pdf>. Acesso em: 18/05/2024.

KHATTAB, R. Y.; ARNTFIELD, S. D. Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments: Antinutritional factors. *LWT - Food Science and Technology*, v. 42, n. 6, p. 1113–1118, 2009. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.02.004>.

KINYANJUI, P. K.; NJOROGE, D. M.; MAKOKHA, A. O.; CHRISTIAENS, S.; NDAKA, D. S.; HENDRICKX, M. Hydration properties and texture fingerprints of easy- and hard-to-cook bean varieties. *Food science & nutrition, United States*, v. 3, n. 1, p. 39–47, 2015. <https://doi.org/10.1002/fsn3.188>.

THOMAS, R. *Practical Guide to ICP-MS* (2004). New York, Marcel Dekker.

KUMAR, R.; CHAMBERS, E.; CHAMBERS, D. H.; LEE, J. Generating new snack food texture ideas using sensory and consumer research tools: A case study of the Japanese and South Korean snack food markets. *Foods*, v. 10, n. 2, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10020474>.

KUMAR, S.; SAXENA, R. K.; SAMEERKUMAR, C. V. Pigeonpea for enhancing crop productivity. *Agricultural and Food Sciences*, v. 2, p. 8–10, 2017.

LAPARRA, J. M.; VÉLEZ, D.; MONTORO, R.; BARBERA, R.; FARRÉ, R. Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an *in vitro* digestion method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 20, p. 6080–6085, 2003. <https://doi.org/10.1021/jf034537i>.

LECLERCQ, A.; NONELL, A.; TODOLÍ TORRÓ, J. L.; BRESSON, C.; VIO, L.; VERCOUTER, T.; CHARTIER, F. Introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: A tutorial review. Part I. Theoretical considerations. *Analytica Chimica Acta*, v. 885, p. 33–56, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.03.049>.

LEE, S. G.; KIM, J.; PARK, H.; HOLZAPFEL, W.; LEE, K. W. Assessment of the effect of cooking on speciation and bioaccessibility/cellular uptake of arsenic in rice, using *in vitro* digestion and Caco-2 and PSI cells as model. *Food and Chemical Toxicology*, v. 111, p. 597–604, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.11.052>.

LEME, A. B. P. Avaliação da fração bioacessível e biodisponível de nutrientes e contaminantes em cortes de carne bovina. Campinas, Instituto de Química, UNICAMP, 2015. Tese de doutorado, 95p.

LI, C.; YU, W.; WU, P.; CHEN, X. D. Current *in vitro* digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends in Food Science and Technology*, v. 96, n. December 2019, p. 114–126, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.015>.

LIAO, W.; WANG, G.; LI, K.; ZHAO, W. Change of arsenic speciation in shellfish after cooking and gastrointestinal digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, n. 29, p. 7805–7814, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02441>.

LORENÇATTO, R.; ARANTES DE CARVALHO, G. G.; OLIVEIRA, P. V. Direct analysis of liquid drugs by inductively coupled plasma mass spectrometry using aerosol dilution. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 35, n. 10, p. 2179–2190, 2020. <https://doi.org/10.1039/d0ja00083c>.

SANTOS, H. M.; NICIURA, S. C. M.; NOGUEIRA, A. R. A. Analytical strategies and method validation to access the bioavailability of essential elements and arsenic from raw and cooked fish and shrimp. *ACS Food Science and Technology*, v. 3, n. 7, p. 1229–1237, 2023. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.3c00132>.

MALLILLIN, A. C.; TRINIDAD, T. P.; RATERTA, R.; DAGBAY, K.; LOYOLA, A. S. Dietary fibre and fermentability characteristics of root crops and legumes. *British Journal of Nutrition*, v. 100, n. 3, p. 485–488, 2008. <https://doi.org/10.1017/S000711450891151X>.

MAMBRIN, R. B.; SAUSEN, D.; MOURA, D.; CARVALHO, I. R.; SZARESKEI, V. J.; CONTE, G. G. Phosphorus partition, phytic acid concentration and grains productivity of beans cultivars as a response to phosphate nutrition. *Communications in Plant Sciences*, v. 11, n. 2021, p. 46–56, 2021. <https://doi.org/10.26814/cps2021006>.

MARCANO, J.; HERNANDO, I.; FISZMAN, S. *In vitro* measurements of intragastric rheological properties and their relationships with the potential satiating capacity of cheese pies with konjac glucomannan. *Food Hydrocolloids*, v. 51, p. 16–22, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.028>.

MARINANGELI, C. P. F.; CURRAN, J.; BARR, S. I.; SLAVIN, J.; PURI, S.; SWAMINATHAN, S.; TAPSELL, L.; PATTERSON, C. A. Enhancing nutrition with pulses: defining a recommended serving size for adults. *Nutrition Reviews*, v. 75, n. 12, p. 990–1006, 2017. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nux058>.

MENEZES, E. A.; OLIVEIRA, A. F.; FRANÇA, C. J.; SOUZA, G. B.; NOGUEIRA, A. R. A. Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Zn, and crude protein in beef, pork and chicken after thermal processing. *Food Chemistry*, v. 240, n. June 2017, p. 75–83, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.090>.

MIANO, A. C.; CARVALHO, G. R. de; SABADOTI, V. D.; ANJOS, C. B. P. dos; GODOY, R.; AUGUSTO, P. E. D. Evaluating new lines of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) as a human food source. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 44, n. 7, p. 1–9, 2020. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14517>.

MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALLANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIEU, C.; CARRIÈRE, F.; BOUTROU, R.; CORREDIG, M.; DUPONT, D.; DUFOUR, C.; EGGER, L.; GOLDING, M.; KARAKAYA, S.; KIRKHUS, B.; LE FEUNTEUNM S.; LESMES, U.; MACIERZANKA, A.; MACKIE, A.; MARZE, S.; McCLEMENTS, D. J.; MÉNARD, O.; RECIO, I.; SANTOS, C. N.; SINGH, R. P.; VEGARUD, G. E.; WICKHAM, M. S. J.; WEITSCHIES, W.; BRODKORB, A. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function*, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55–63, 1983. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

MUNDSTOCK, C. M.; THOMAS, A. L. Soja: fatores que afetam o crescimento e o rendimento de grãos. *Biblioteca Setorial da Faculdade de Agronomia da UFRGS*, p. 31, 2005. Disponível em: https://www.ufrgs.br/fagro/plantas/destaques/livro_soja.php. Acesso em: 09/08/2024.

NARDI, E. P.; EVANGELISTA, F. S.; TORMEN, L.; SAINTPIERRE, T. D.; CURTIUS, A. J.; SOUZA, S. S. d.; BARBOSA, F. The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. *Food Chemistry*, v. 112, n. 3, p. 727–732, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.010>.

OLESZCZUK, N.; CASTRO, J. T.; DA SILVA, M. M.; KORN, M. G. A.; WELZ, B.; VALE, M. G. R. Method development for the determination of manganese, cobalt and copper in green coffee comparing direct solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta*, v. 73, n. 5, p. 862–869, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.05.005>.

OLIVEIRA, A. P. de; MATEÓ, B. dos S. O.; FIOROTO, A. M.; OLIVEIRA, P. V. de; NAOZUKA, J. Effect of cooking on the bioaccessibility of essential elements in different varieties of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 67, p. 135–140, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.01.012>.

OZOLINA, K.; SARENKOVA, I.; MUIZNIECE-BRASAVA, S. The anti-nutritional factors of legumes and their treatment possibilities: A review. *Research for Rural Development*, v. 38, p. 68–76, 2023. <https://doi.org/10.22616/RRD.29.2023.010>.

PAPANIKOLAOU, Y.; SLAVIN, J.; FULGONI, V. L. Adult dietary patterns with increased bean consumption are associated with greater overall shortfall nutrient intakes, lower added sugar, improved weight-related outcomes and better diet quality. *Nutrition Journal*, v. 23, n. 1, p. 1–11, 2024. <https://doi.org/10.1186/s12937-024-00937-1>.

PEREIRA, A. M.; BONEMANN, D. H.; SCHERDIEN, S. H.; ÁVILA, B. P.; ANTUNES, I. F.; RIBEIRO, A. S.; GULARTE, M. A. Evaluation of total and bioaccessible concentration of minerals in creole beans. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 94, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103622>.

PEREZ-MORAL, N.; SAHA, S.; PINTO, A. M.; BAJKA, B. H.; EDWARDS, C. H. *In vitro* protein bioaccessibility and human serum amino acid responses to white bread enriched with intact plant cells. *Food Chemistry*, v. 404, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134538>.

PINHEIRO, F. C.; BABOS, D. V.; BARROS, A. I.; PEREIRA-FILHO, E. R.; NÓBREGA, J. A. Microwave-assisted digestion using dilute nitric acid solution and investigation of calibration strategies for determination of As, Cd, Hg and Pb in dietary supplements using ICP-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 174, p. 471–478, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.06.018>.

RAMAKRISHNA, V.; RANI, P. J.; RAO, P. R. anti-nutritional factors during germination in indian bean (*Dolichos lablab* L.) seeds. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, v. 1, n. 1, p. 6–11, 2006.

PISKIN, E.; CIANCIOSI, D.; GULEC, S.; TOMAS, M.; CAPANOGLU, E. Iron absorption: Factors, limitations, and improvement methods. *ACS Omega*, v. 7, n. 24, p. 20441-20456, 2022. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c01833>.

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. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n. 1, p. 200–213, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000100029>.

RASHA, M. K.; ABOU-ARAB, E. A.; GIBRIEL, A. Y.; RASMY, N. M. H.; ABU-SALEM, F. M. Influence of legume processing treatments individually or in combination on their trypsin inhibitor and total phenolic contents. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, v. 2, n. 2, p. 1310–1322, 2011.

RAWAL, V.; NAVARRO, D.; BANSAL, P.; BANSAL, V.; PAIS, J.; SARMA, M. *The Global Economy of Pulses*. Rome, FAO. <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/i7108en>.

REBELLATO, A. P.; GRAZIELLE SIQUEIRA SILVA, J.; PROBIO DE MORAES, P.; TRAJANO, B.; AZEVEDO LIMA PALLONE, J. Static *in vitro* digestion methods for assessing essential minerals in processed meat products. *Food Research International*, v. 155, p. 111121, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111121>.

ROCHA, F. R. P.; NÓBREGA, J. A.; KAMOGAWA, M. Y. Fundamentos do preparo de amostra. Em: *Métodos de preparo de amostras para análise elementar*. Sociedade Brasileira de Química, 2016.

ROSSINI, K.; ANZANELLO, M. J.; FOGLIATTO, F. S. Attribute selection in descriptive sensory analysis. *Produção*, v. 22, n. 3, p. 380–390, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0103-65132012005000032>.

RUIZ-CAPILLAS, C.; HERRERO, A. M. Sensory analysis and consumer research in new product development. *Foods*, v. 10, n. 3, p. 2–5, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10030582>.

RUOCCO, C.; SEGALA, A.; VALERIO, A.; NISOLI, E. Essential amino acid formulations to prevent mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, v. 24, n. 1, p. 88- 95, 2021. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000704>.

SALMAN, A. K. D.; FERREIRA, A. C. D.; SOARES, J. P. G.; SOUZA, J. P. *Metodologias para avaliação de alimentos para ruminantes domésticos*. Porto Velho: Embrapa Rondônia. p. 21, 2010.

SAMTIYA, M.; ALUKO, R. E.; DHEWA, T. Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview. *Food Production, Processing and Nutrition*, v. 2, n. 1, p. 1–14, 2020. <https://doi.org/10.1186/s43014-020-0020-5>.

SANDBERG, A.-S. Bioavailability of minerals in legumes. *British Journal of Nutrition*, v. 88, n. S3, p. 281–285, 2002. <https://doi.org/10.1079/BJN/2002718>.

SANTOS, G. A.; CARVALHO, A. A. C.; OLIVEIRA, A. P.; NAOZUKA, J.; MATTA, F. V.; FELIPE-SOTELO, M.; WARD, N. I.; CORRÊA, N. C. F.; NOMURA, C. S. Bioaccessibility of essential elements in açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp. *ACS Food Science and Technology*, v. 1, n. 5, p. 874–883, 2021. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.1c00070>.

SANTOS, H. M.; DE HIGUERA, J. M.; NOGUEIRA, A. R. de A. *In vitro* bioaccessibility of essential minerals from raw and cooked Tilapia fillet: Method validation and analysis by synchronous vertical dual view ICP OES. *Food Chemistry Advances*, v. 1, p. 100080, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100080>.

SARKAR, S.; PANDA, S.; YADAV, K. K.; KANDASAMY, P. Pigeon pea (*Cajanus cajan*) an important food legume in indian scenario – a review. *Legume Research*, v. 43, n. 5, p. 601–610, 2020. <https://doi.org/10.18805/LR-4021>.

SAXENA, K. B.; KUMAR, R. V.; SULTANA, R. Quality nutrition through pigeonpea—a review. *Health*, v. 02, n. 11, p. 1335–1344, 2010. <https://doi.org/10.4236/health.2010.211199>.

SEMEDO TAVARES, W. P.; DONG, P.; JIN, W.; YANG, Y.; HAN, K.; ZHA, F.; ZHAO, Y.; ZENG, M. Effect of different cooking conditions on the profiles of Maillard reaction products and nutrient composition of hairtail (*Thichiurus lepturus*) fillets, *Food Research International*, v. 103, p. 390-397, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.063>.

SERRANO, R.; GRINDLAY, G.; GRAS, L.; MORA, J. Insight into the origin of carbon matrix effects on the emission signal of atomic lines in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, v. 177, p. 106070, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2021.106070>.

SHARMA, S. B.; SAYYED, R. Z.; TRIVEDI, M. H.; GOBI, T. A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, Switzerland, v. 2, p. 587, 2013. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>.

SHARMA, S.; TRIPATHI, P.; SHARMA, J.; DIXIT, A. Flavonoids modulate tight junction barrier functions in hyperglycemic human intestinal Caco-2 cells. *Nutrition*, v. 78, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110792>.

SHARMA, S.; ZHANG, X.; AZHAR, G.; PATYAL, P.; VERMA, A.; KC, G.; WEI, J. Y. Valine improves mitochondrial function and protects against oxidative stress. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 88, n. 2, p. 168-176, 2024. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbad169>.

SHAUGHNESSEY, E. M.; KANN, S. H.; AZIZGOLSHANI, H.; BLACK, L. D.; CHAREST, J. L.; VEDULA, E. M. Evaluation of rapid transepithelial electrical resistance (TEER) measurement as a metric of kidney toxicity in a high-throughput microfluidic culture system. *Scientific reports*, v. 12, n. 1, p. 13182, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16590-9>.

SHERASIA, P. L.; GARG, M. R.; BHANDERI, B. M. Pulses and their By-Products as Animal Feed. *FAO*, p. 153–162, 2018. <https://doi.org/10.18356/96b9b464-en>.

SILVA, K. F.; FRANCISCO, V. C.; OKUMURA, F.; GODOY, R.; NASSU, R. T. Aceitação sensorial de feijão guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) destinado à alimentação humana. Anais da 12ª Jornada Científica - Embrapa São Carlos. São Carlos - SP, 2020. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1131316>. Acesso em: 09/05/2024.

SILVA, K. F.; FRANCISCO, V. C.; OKUMURA, F.; GODOY, R.; NASSU, R. T. Teste de cocção de linhagens de feijão guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) para consumo humano. Anais do 28º Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos (CBCTA 2022). 2022. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1150858>. Acesso em: 09/05/2024.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. da. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. Revista de Nutrição, v. 12, n. 1, p. 21–32, 1999. <https://doi.org/10.1590/s1415-52731999000100002>.

SINDIRAÇÕES Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal. Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal. Sindirações. São Paulo. 2023.

SINGH, Y. P.; SINGH, S.; NANDA, P.; SINGH, A. K. Impact of establishment techniques and maturity duration of pigeon pea cultivars on yield, water productivity and properties of soil. Agricultural Research, v. 7, n. 3, p. 271–279, 2018. <https://doi.org/10.1007/s40003-018-0309-7>.

VAN SOEST, P. J. Nutritional ecology of the ruminant. ed. 2, New York: Cornell University. 2018.

SOUSA, A. L. B.; ROCHA, R. B.; TADEU, H. C.; LOPES, M. T. G.; ESPINDULA, M. C.; SILVA, R. C. Ciclo de maturação e relações entre grãos processados e frutos de café robustas amazônicos. Revista Caatinga. v. 2125, p. 1–11, 2025.

SOUZA, G. B.; NOGUEIRA, A. R. A.; SUMI, L. M. BATISTA, L. A. R. Método alternativo para a determinação de fibra em detergente neutro e detergente ácido. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste. p. 21, 1999. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/46109>. Acesso em: 14/10/2024.

SRINIVASAN, B.; KOLLI, A. R.; ESCH, M. B.; ABACI, H. E.; SHULER, M. L.; HICKMAN, J. J. TEER measurement techniques for *in vitro* barrier model systems. Journal of Laboratory Automation, v. 20, n. 2, p. 107–126, 2015. <https://doi.org/10.1177/2211068214561025>.

SUN, X.; OHANENYE, I. C.; AHMED, T.; UDENIGWE, C. C. Microwave treatment increased protein digestibility of pigeon pea (*Cajanus cajan*) flour: Elucidation of underlying mechanisms. Food Chemistry, v. 329, p. 127196, 2020. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127196>.

ŚWIĄDER, K.; FLOROWSKA, A.; KONISIEWICZ, Z.; CHEN, Y.-P. Functional tea-infused set yoghurt development by evaluation of sensory quality and textural properties. *Foods*, v. 9, n. 12, 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9121848>.

TAPAL, A.; VEGARUD, G. E.; SREEDHARA, A.; KAUL TIKU, P. Nutraceutical protein isolate from pigeon pea (*Cajanus cajan*) milling waste by-product: functional aspects and digestibility. *Food Funct.*, v. 10, n. 5, p. 2710–2719, 2019. <https://doi.org/10.1039/C8FO01933A>.

TEIXEIRA, J. L. da P.; PALLONE, J. A. L.; ANDRADE, C. D.; MESÍAS, M.; SEIQUER, I. Bioavailability evaluation of calcium, magnesium and zinc in Brazilian cheese through a combined model of *in vitro* digestion and Caco-2 cells. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 107, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104365>.

THOMSEN, V.; ROBERTS, G.; BURGESS, K. The concept of background equivalent concentration in spectrochemistry. *Spectroscopy (Santa Monica)*, v. 15, p. 33–36, 2000.

VAN BREEMEN, R. B.; LI, Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, v. 1, n. 2, p. 175–185, 2005. [10.1517/17425255.1.2.175](https://doi.org/10.1517/17425255.1.2.175).

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).

VANWEERT, F.; SCHRAUWEN, P.; PHIELIX, E. Role of branched-chain amino acids metabolism in the pathogenesis of obesity and type 2 diabetes - related metabolic disturbances BCAA metabolism in type 2 diabetes. *Nutrition & Diabetes*, v. 12, n. 35, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41387-022-00213-3>.

VARSHNEY, R. K. *et al.* Pigeonpea genomics initiative (PGI): An international effort to improve crop productivity of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Molecular Breeding*, v. 26, n. 3, p. 393–408, 2010. <https://doi.org/10.1007/s11032-009-9327-2>.

VASANTHAKAALAM, H.; KARAYIRE, A.; NYAGAHUNGU, I. Hydration and culinary profile of improved common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *Rwanda Journal of Agricultural Sciences*, v. 2, n. 1, p. 68–75, 2020.

VERHOECKX, K.; COTTER, P.; LÓPEZ-EXPÓSITO, I.; KLEIVELAND, C.; LEA, T.; MACKIE, A.; REQUENA, T.; SWIATECKA, D.; WICHERS, H. The impact of food bioactives on health: *In vitro* and *ex vivo* models. *The Impact of Food Bioactives on Health: In vitro and Ex Vivo Models*, p. 1–327, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4>.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *Journal of Automatic Chemistry*, v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986. <https://doi.org/10.1155/S1463924686000330>.

WHO, 2007. Protein and amino acid requirements in human nutrition: Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. Geneva, WHO. Disponível em: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/43411/WHO_TRS_935_eng.pdf. Acesso em: 18/09/2024.

WOOD, J. A. Evaluation of cooking time in pulses: A review. *Cereal Chemistry*, v. 94, n. 1, p. 32–48, 2017. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-05-16-0127-FI>.

WU, J.; ZHOU, Q.; ZHOU, C.; CHENG, K. W.; WANG, M. Strategies to promote the dietary use of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) for human nutrition and health. *Food Frontiers*, v. 5, n. 3, p. 1014–1030, 2024. <https://doi.org/10.1002/fft2.381>.

XU, B.; CHANG, S. K. C. Antioxidant capacity of seed coat, dehulled bean, and whole black soybeans in relation to their distributions of total phenolics, phenolic acids, anthocyanins, and isoflavones. *Journal of agricultural and food chemistry, United States*, v. 56, n. 18, p. 8365–8373, 2008. <https://doi.org/10.1021/jf801196d>.

XU, Y.; SHRESTHA, N.; PRÉAT, V.; BELOQUI, A. An overview of *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* models for studying the transport of drugs across intestinal barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 175, p. 113795, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.05.005>.

YIN, N.; CAI, X.; CHEN, X.; DU, H.; XU, J.; WANG, L.; SUN, G.; CUI, Y. Investigation of bioaccessibility of Cu, Fe, Mn, and Zn in market vegetables in the colon using PBET combined with SHIME. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17901-1>.

YOUHANNA, S.; LAUSCHKE, V. M. The past, present and future of intestinal *in vitro* cell systems for drug absorption studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 110, n. 1, p. 50–65, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.07.001>.

ZHOU, J. R.; FORDYCE, E. J.; RABOY, V.; DICKINSON, D. B.; WONG, M. S.; BURNS, R. A.; ERDMAN, J. W. J. Reduction of phytic acid in soybean products improves zinc bioavailability in rats. *The Journal of nutrition, United States*, v. 122, n. 12, p. 2466–2473, 1992. <https://doi.org/10.1093/jn/122.12.2466>.