



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

LETÍCIA DE SOUZA SCHERRER

**COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E BIODISPONIBILIDADE DE FERRO, IN VITRO E
IN VIVO, DE CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI BIOFORTIFICADAS COM FERRO**

ALEGRE – ES

MAIO – 2023

LETÍCIA DE SOUZA SCHERRER

**COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E BIODISPONIBILIDADE DE FERRO, IN VITRO E
IN VIVO, DE CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI BIOFORTIFICADAS COM FERRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Neuza Maria Brunoro Costa

Coorientadora: Prof^a. Dra. Maria das Graças Vaz Tostes

Coorientadora: Prof^a. Dra. Mariana Grancieri

ALEGRE – ES

MAIO – 2023

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

S326c Scherrer, Leticia de Souza, 1997-
Composição nutricional e biodisponibilidade de ferro, in vitro e in vivo, de cultivares de feijão-caupi biofortificadas com ferro / Leticia de Souza Scherrer. - 2023.
70 f. : il.

Orientadora: Neuza Maria Brunoro Costa.

Coorientadores: Maria das Graças Vaz Tostes, Mariana Grancieri.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Feijão. 2. Ferro - Metabolismo. 3. Antioxidantes. I. Costa, Neuza Maria Brunoro. II. Vaz Tostes, Maria das Graças. III. Grancieri, Mariana. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. V. Título.

CDU: 664

LETÍCIA DE SOUZA SCHERRER

"COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL E BIODISPONIBILIDADE DE FERRO, IN VITRO E IN VIVO, DE CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI BIOFORTIFICADAS COM FERRO"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 30 de maio de 2023.

Prof^ª. Dr^ª. Neuza Maria Brunoro Costa
Universidade Federal do Espírito Santo-UFES
Orientadora

Pós Doutoranda Mariana Grancieri
Universidade Federal do Espírito Santo-UFES
Coorientadora

Pós Doutoranda Cintia Tomaz Sant'Ana
Universidade Federal do Espírito Santo-UFES
Examinadora Interna

Prof^ª. Dr^ª. Desirrê Moraes Dias
Faculdade Dinâmica do Vale do Piranga - FADIP
Examinadora Externa





Folha de Rosto Defesa Dissertação - Leticia de Souza Scherrer.

Data e Hora de Criação: 30/05/2023 às 13:44:39

Documentos que originaram esse envelope:

- Folha de Rosto Defesa Dissertação - Leticia de Souza Scherrer.pdf (Arquivo PDF) - 1 página(s)



Hashs únicas referente à esse envelope de documentos

[SHA256]: e7619628deafbd4b4b58b76bfb0de0e8d337b0b429c90ce54b21892b1174

[SHA512]: 5f5289733cb86372a787eefed8a41f54d30d9a8e5d095785ea3fe271c14b5c707a9133f000d7be3e035a69285a469425a7e8812fbbf76c051817eab0997e

Lista de assinaturas solicitadas e associadas à esse envelope



ASSINADO - Neuza Maria Brunoro Costa (neuza.costa@ufes.br)

Data/Hora: 30/05/2023 - 13:47:37, IP: 200.137.72.202, Geolocalização: [-30.759518, -41.531259]

[SHA256]: a1845a87ab7f26013865854eac8027aa55d06a25ef5a0d5e63dfe778462923



ASSINADO - Mariana Grancieri (marianagrancieri@gmail.com)

Data/Hora: 30/05/2023 - 14:30:59, IP: 200.137.72.202, Geolocalização: [-30.762383, -41.531259]

[SHA256]: 58927c2e80541a81d81bb1a7230d032efb605de1e15491aa09166d248a0288



ASSINADO - Cintia Tomaz Sant'Ana (cintia_santana28@hotmail.com)

Data/Hora: 30/05/2023 - 14:38:00, IP: 179.109.143.5, Geolocalização: [-20.780376, -41.537438]

[SHA256]: 26649611a2189668300c5540aa2968a065b2c2ea003ea82df29ad444843d



ASSINADO - Desirê Moraes Dias (desirremoraes@hotmail.com)

Data/Hora: 30/05/2023 - 16:07:39, IP: 143.202.53.175

[SHA256]: 305111e044f1318e03c1f3b6014e95690e4a558b211ef3c3de4d8706b9fd

Histórico de eventos registrados neste envelope

30/05/2023 16:07:39 - Envelope finalizado por desirremoraes@hotmail.com, IP: 143.202.53.175

30/05/2023 16:07:39 - Assinatura realizada por desirremoraes@hotmail.com, IP: 143.202.53.175

30/05/2023 16:07:21 - Envelope visualizado por desirremoraes@hotmail.com, IP: 143.202.53.175

30/05/2023 14:38:00 - Assinatura realizada por cintia_santana28@hotmail.com, IP: 179.109.143.5

30/05/2023 14:30:59 - Assinatura realizada por marianagrancieri@gmail.com, IP: 200.137.72.202

30/05/2023 14:30:59 - Envelope visualizado por marianagrancieri@gmail.com, IP: 200.137.72.202

30/05/2023 13:47:37 - Assinatura realizada por neuza.costa@ufes.br, IP: 200.137.72.202

30/05/2023 13:47:20 - Envelope visualizado por neuza.costa@ufes.br, IP: 200.137.72.202

30/05/2023 13:46:08 - Envelope registrado na Blockchain por neuza.costa@ufes.br, IP: 200.137.72.202

30/05/2023 13:46:07 - Envelope encaminhado para assinaturas por neuza.costa@ufes.br, IP: 200.137.72.202

30/05/2023 13:44:40 - Envelope criado por neuza.costa@ufes.br, IP: 200.137.72.202

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu bom Pastor, por me conceder graça suficiente para enfrentar todos os desafios desta etapa.

Aos meus pais, Rainério e Vilma, a minha eterna gratidão. Muito obrigada por serem exemplo de determinação e de força, bem como meu abrigo e meu suporte.

À querida Prof^a. Dra. Neuza Maria Brunoro Costa, pela preciosa orientação. Obrigada por tamanha generosidade e paciência. Considero-me privilegiada por ter caminhado ao seu lado nesse período.

À Prof^a. Dra. Mariana Grancieri, muito obrigada. Palavras não são suficientes para expressar minha gratidão ao seu inesgotável apoio. Você é exemplo de competência e de dedicação.

À Prof^a. Dra. Maria das Graças Vaz Tostes, pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho, pelo apoio durante o estágio em docência e pelos ensinamentos.

Ao técnico do Laboratório de Nutrição Experimental, Eduardo Lorencetti Fornazier, por toda ajuda e disponibilidade nos experimentos.

Aos demais membros da equipe de pesquisa: Ana Paula, Cíntia, Leon, Thais, Manuella, Maria Fernanda, Milena, Marjorie e Natália; que foram importantes para a realização desse trabalho.

Ao Antonio Raimundo de Paula, secretário do programa de pós-graduação, pelo auxílio com a parte burocrática e documental do mestrado.

A todos os demais professores e técnicos do programa de pós-graduação, muito obrigada por todos os ensinamentos, dentro das salas de aula e dos laboratórios.

Ao meu noivo, Gabriel, por todo incentivo e abnegação. Obrigada por tornar tudo mais leve, por sorrir e por chorar comigo.

Aos meus irmãos, a minha avó e aos meus amigos, por todas as conversas, apoio e amizade.

À professora Hércia Stampini Duarte Martino, por abrir as portas dos laboratórios na Universidade Federal de Viçosa para realização de alguns experimentos. Bem como agradeço à técnica Renata, pelo auxílio na realização dessas análises.

Ao professor Diego Lang Burak, do Departamento de Agronomia (UFES), pela disponibilidade e auxílio em todas as análises de determinação do teor de ferro.

Aos membros da banca de defesa da dissertação, pelas relevantes contribuições ao trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pela parceria e pelo apoio.

A todos que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α – alfa

% - por cento

°C – graus Celsius

ABTS – 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

DcytB – citocromo duodenal B

dL – decilitro

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

g – grama

g – força-g ou força relativa centrífuga (RCF)

h – hora

kcal – quilocaloria

kg – quilograma

M – molar

μg – micrograma

mg – miligrama

mM – milimolar

ml – mililitro

μl – microlitros

μM – micromolar

min – minutos

ng – nanograma

nm – nanômetro

pH – potencial hidrogeniônico

ppm – parte por milhão

VET – valor energético total

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Absorção intestinal do ferro.	12
Figura 2 - Cultivares de feijão-caupi utilizadas no estudo.	14
Figura 3 - Atividade antioxidante total.	29
Figura 4 - Expressão de mRNA de ferritina e transferrina no tecido hepático dos animais, após o período de repleção.	36
Figura 5 - Expressão de mRNA de DMT-1, ferroportina e hefaestina no tecido duodenal dos animais, após o período de repleção.	38
Figura 6 - Concentração de ferro no fígado dos animais eutanasiados, após a fase de repleção.....	39
Figura 7 - Teor de óxido nítrico e capacidade antioxidante total do fígado dos animais, após o período de repleção.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características nutricionais e biodisponibilidade de ferro em cultivares de feijão-caupi biofortificadas com ferro no Brasil.	8
Tabela 2. Características das cultivares de feijão-caupi biofortificadas.	9
Tabela 3. Funções do ferro no organismo humano.	10
Tabela 4. Composição das dietas experimentais durante as fases de depleção e repleção.....	21
Tabela 5. Sequência de primers usada na análise biomolecular.	23
Tabela 6. Composição nutricional dos feijões-caupi convencional e biofortificados em base seca.	25
Tabela 7. Teor de ferro de feijões-caupi convencional e biofortificado, antes e depois da digestão gastrointestinal simulada.	27
Tabela 8. Índice de captação celular de ferro.....	30
Tabela 9. Ganho de peso e consumo alimentar na fase de depleção.....	32
Tabela 10. Ganho de peso, consumo alimentar, coeficiente de eficiência alimentar e consumo de ferro na fase de repleção.	33
Tabela 11. Ganho de hemoglobina, eficiência de regeneração da hemoglobina e valor biológico relativo na fase de repleção.....	33
Tabela 12. Concentração de ferro, ferritina e transferrina no soro dos animais após fase de repleção.....	36

SUMÁRIO

RESUMO.....	XV
ABSTRACT	XVII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo Geral.....	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Feijão-caupi.....	4
3.1.1. Complexantes de minerais	5
3.1.2. Atividade antioxidante	5
3.2. Biofortificação	6
3.3. Fome oculta e deficiência de ferro.....	9
3.4. Efeitos do ferro no organismo.....	10
3.5. Metabolismo e biodisponibilidade de ferro	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1. Matéria-prima	14
4.2. Processamento da matéria-prima.....	14
4.3. Análises físico-químicas	15
4.3.1. Composição centesimal	15
4.3.1.1. Valor energético total	16
4.3.2. Digestão gastrointestinal simulada	16
4.3.3. Determinação do teor de ferro	16
4.3.4. Complexantes de minerais	17
4.3.4.1. Compostos fenólicos totais	17

4.3.4.2.	Determinação de ácido fítico.....	17
4.3.4.3.	Determinação de taninos	17
4.3.4.4.	Razão molar fitato:ferro.....	18
4.3.5.	Atividade antioxidante	18
4.3.5.1.	Extração.....	18
4.3.5.2.	Captura do radical livre ABTS.....	18
4.3.5.3.	Método de redução do ferro (FRAP).....	18
4.4.	Bioacessibilidade de ferro com células Caco-2	19
4.5.	Ensaio Biológico	20
4.5.1.	Questões éticas.....	20
4.5.2.	Protocolo experimental.....	20
4.5.3.	Ganho de peso e consumo alimentar.....	22
4.5.4.	Biomarcadores hematológicos	22
4.5.5.	Expressão gênica de proteínas	23
4.5.6.	Marcadores de estresse oxidativo	24
4.6.	Análises estatísticas	24
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1.	Composição nutricional	25
5.2.	Atividade antioxidante	28
5.3.	Bioacessibilidade de ferro em células Caco-2.....	30
5.4.	Ensaio Biológico em ratos	31
5.4.1.	Ganho de peso e consumo alimentar.....	31
5.4.2.	Biomarcadores hematológicos e biodisponibilidade de ferro.....	33
5.4.3.	Biomarcadores bioquímicos e biomoleculares	35
5.4.4.	Marcadores de estresse oxidativo	39
6.	CONCLUSÃO.....	41
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais.	52

RESUMO

SCHERRER, Leticia de Souza. **Composição nutricional e biodisponibilidade de ferro, in vitro e in vivo, de cultivares de feijão-caupi biofortificadas com ferro.** 2023. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. Orientador: Prof^a. Dra. Neuza Maria Brunoro Costa. Coorientadoras: Prof^a. Dra. Maria das Graças Vaz Tostes e Prof^a. Dra. Mariana Grancieri.

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp) é um alimento nutricionalmente rico e de consumo habitual nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Em razão destas características, ele tem sido explorado como um potencial veículo de ferro para a biofortificação, uma estratégia mundialmente conhecida de combate a carências nutricionais. Contudo, por ser um alimento de origem vegetal, é constituído por componentes que limitam a utilização do ferro não heme, reduzindo a sua biodisponibilidade. O objetivo deste estudo foi avaliar as características nutricionais e a biodisponibilidade de ferro do feijão-caupi biofortificado com ferro e convencional, in vitro e in vivo. Foram utilizadas três cultivares biofortificadas (BRS Aracê, BRS Tumucumaque e BRS Xiquexique) e uma cultivar convencional (BRS Pajeú). Foram realizadas análises físico-químicas para determinação da composição centesimal e nutricional dos feijões, além da digestão gastrointestinal simulada, para avaliação das concentrações de ferro e da atividade antioxidante. A avaliação in vitro da bioacessibilidade de ferro foi realizada em células Caco-2, e a biodisponibilidade in vivo de ferro foi avaliada utilizando o método de depleção/repleção em ratos *Wistar*. Além disso, no ensaio in vivo foram avaliadas as concentrações de ferritina, ferro e transferrina no soro, a expressão gênica de proteínas relativas ao metabolismo do ferro e os níveis de óxido nítrico e a capacidade antioxidante do fígado. Os resultados foram submetidos à análise da variância (ANOVA), seguidos do teste de Tukey ou de Newman-Keuls ($p < 0,05$). Sobre a composição nutricional, destacam-se os altos teores de fibras e de proteínas de todos os feijões. Os feijões apresentaram concentrações de ferro semelhantes, porém o feijão Pajeú, em comparação às cultivares biofortificadas, apresentou maiores teores de complexantes de minerais, como compostos fenólicos, ácido fítico e taninos. O conteúdo de ferro, após digestão simulada, foi maior para cultivares biofortificadas. A razão molar fitato:ferro foi mais alta na cultivar Xiquexique (12,66), seguida pela Pajeú (11,95), Tumucumaque (11,00) e Aracê (8,64). Em células Caco-2, o índice de captação celular de ferro foi maior para o feijão Tumucumaque, similar ao feijão Aracê, e a menor para o feijão convencional Pajeú ($p < 0,05$). Em modelo animal, o ganho de hemoglobina do grupo alimentado com feijão convencional foi o menor. O grupo alimentado com feijão Tumucumaque apresentou a melhor eficiência de regeneração da hemoglobina e valor biológico relativo. A expressão gênica e o valor sérico de ferritina e transferrina indicaram maior transporte de ferro nos animais que consumiram o feijão convencional e uma repleção incipiente dos estoques de ferro em todos os grupos. Os grupos Aracê e Tumucumaque exibiram alta capacidade antioxidante e baixo teor de óxido nítrico, no fígado, diferindo em relação a outros grupos. Portanto, os feijões biofortificados deste estudo exibiram promissora composição nutricional e biodisponibilidade de ferro, sendo vantajosos no contexto

da deficiência de ferro. Apesar do mesmo teor, a bioacessibilidade e biodisponibilidade de ferro foram superiores nos feijões biofortificados, destacando-se o Tumucumaque, possivelmente em razão do menor teor de compostos complexantes de minerais.

Palavras-chave: Biofortificação, Bioacessibilidade de Ferro, Capacidade Antioxidante, Disponibilidade Biológica, Deficiência de Ferro.

ABSTRACT

SCHERRER, Leticia de Souza. **Nutritional composition and iron bioavailability of iron biofortified cowpea cultivars, in vitro and in vivo.** 2023. Dissertation (Master in Food Science and Technology) – Federal University of Espírito Santo, Alegre – ES. Advisor: Dr. Neuza Maria Brunoro Costa. Co-advisors: Dr. Maria das Graças Vaz Tostes and Dr. Mariana Grancieri.

Cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp) is an ordinary and nutritive staple food in the North and Northeast regions of Brazil. Due to these characteristics, it has been used as an iron vehicle for biofortification, a world-renowned strategy to combat nutritional deficiencies. However, for being a plant food, it is rich in compounds that limit the use of non heme iron, reducing its bioavailability. This study aimed to evaluate the nutritional characteristics and iron bioavailability of iron biofortified cowpea and conventional, in vitro and in vivo. Three biofortified cultivars were used (BRS Aracê, BRS Tumucumaque, and BRS Xiquexique) and one conventional cultivar (BRS Pajeú). Physical-chemical analyzes were carried out to determine the centesimal and nutritional composition of the beans, in addition to simulated gastrointestinal digestion, to assess iron levels and antioxidant activity. In vitro assessment of iron bioaccessibility was performed in Caco-2 cells, and in vivo iron bioavailability was assessed using the depletion/repletion methodology in Wistar rats. In the in vivo assay, serum ferritin, iron and transferrin concentrations, gene expression of proteins related to iron metabolism, liver nitric oxide levels and liver antioxidant capacity were examined. The results were analyzed by analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey or Newman-Keuls test ($p < 0.05$). Regarding nutritional composition, the high fiber and protein content of all beans stands out. Cowpea beans had similar iron content, but Pajeú, compared to the biofortified cultivars, had higher levels of mineral complexing compounds, such as phenolic compounds, phytic acid, and tannins. Iron content after simulated digestion was higher in biofortified cultivars. The phytate: the iron molar ratio was higher in Xiquexique (12.66), followed by Pajeú (11.95), Tumucumaque (11.00), and Aracê (8.64). In Caco-2 cells, the cellular uptake iron index was higher for Tumucumaque, which was similar to Aracê, and Pajeú was the lowest ($p < 0.05$). In the animal model, the hemoglobin gain of the group fed with conventional beans was the lowest. Tumucumaque group had the best hemoglobin regeneration efficiency and relative biological value. Gene expression and serum levels of ferritin and transferrin indicated greater iron transport in animals that consumed conventional beans and an incipient repletion of iron stores in all groups. Aracê and Tumucumaque groups exhibit high liver antioxidant capacity and low liver nitric oxide, differing from other groups. Therefore, biofortified beans in this study exhibited promising nutritional composition and iron bioavailability, being advantageous in the iron deficiency context. Although similar mineral concentration between the cultivars, the iron bioaccessibility and bioavailability was higher in the biofortified beans, especially Tumucumaque, possibly due to the low content of mineral complex compounds.

Keywords: Biofortification, Iron Bioaccessibility, Antioxidant Capacity, Biological Availability, Iron Deficiencies.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, somente duas espécies são consideradas feijão: o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp) (BRASIL, 2008). Os dados sobre o feijão-caupi apontam que a produção brasileira foi de cerca de 629,3 mil toneladas em 2022, sendo a projeção para 2022-2023 ainda maior. Destaca-se que seu consumo e produção são, em suma, nas regiões Norte e Nordeste, com cerca de 75% da produção nacional. Além disso, há expansão da cultura para outras regiões do país, como o Centro-Oeste (CHEMIM, 2022).

Como um componente básico da alimentação nestas regiões, o feijão-caupi fornece proteínas, fibras, minerais, carboidratos e vitaminas. O conteúdo de lipídios é relativamente baixo e exibe baixa densidade energética e alta densidade nutricional (AWIKA; DUODU, 2017; BASTOS, 2016; JAYATHILAKE et al., 2018; SANT'ANA, 2018). A respeito do conteúdo de ferro do feijão-caupi, nas cultivares convencionais, a concentração é de cerca de 55 mg/kg, sendo que este alimento é uma das principais fontes deste mineral para grupos populacionais com menor poder aquisitivo (BIGONHA, 2013).

Uma estratégia que tem sido utilizada para elevar o teor de ferro dos feijões é a biofortificação, visando à redução das carências nutricionais. Os micronutrientes-alvo mais comumente biofortificados são ferro, zinco e vitamina A (DIAS et al., 2018). Além da biofortificação, a suplementação, a fortificação de alimentos e a diversificação alimentar são estratégias também utilizadas no enfrentamento à fome oculta, em todo o mundo (RUEL; ALDERMAN; MATERNAL AND CHILD NUTRITION STUDY GROUP, 2013). No caso do feijão-caupi do Brasil, este tem sido biofortificado de modo convencional com ferro, ou seja, a partir do cruzamento de espécies com características de interesse (SANT'ANA et al., 2019; LIBERAL et al., 2020).

Todavia, uma questão que deve ser avaliada na biofortificação do feijão-caupi é a biodisponibilidade do ferro, visto que a matriz alimentar dos feijões é rica em complexantes de minerais, como o ácido fítico e taninos, os quais podem limitar a utilização deste mineral (SANT'ANA, 2018). Apesar disso, estes compostos podem apresentar propriedades biológicas ativas, potencialmente benéficas (PARMAR et

al., 2017). Também, fatores fisiológicos e fisiopatológicos dos seres humanos são capazes de influenciar na biodisponibilidade do ferro, incluindo trânsito intestinal acelerado, acloridria e anomalias na mucosa intestinal, dentre outros (COSTA; PELUZIO, 2021).

Por conceito, biodisponibilidade diz respeito à fração do nutriente que está apta a ser usada pelo organismo e/ou armazenada nos estoques corporais. Diferente de bioacessibilidade, que consiste na parte do nutriente que está acessível para o processo absorptivo no trato gastrointestinal (LA FRANO et al., 2014). Para a medida da biodisponibilidade dos nutrientes são possíveis estudos com humanos e animais (LA FRANO et al., 2014), enquanto para a bioacessibilidade também são possíveis ensaios in vitro, os quais utilizam células Caco-2 (TORRES, 2018).

Os diferentes tipos de estudo sobre a utilização e biodisponibilidade do ferro têm vantagens e limitações. Segundo Dias et al. (2018) os métodos com células Caco-2, apesar de não simularem as conexões dos sistemas do corpo humano, são vantajosos para comparar diferentes cultivares em um mesmo experimento, com um trabalho mais rápido e barato, permitindo uma triagem das cultivares mais promissoras para posteriores estudos in vivo.

No modelo animal é possível avaliar marcadores genéticos de biodisponibilidade e diferentes tecidos, fornecendo uma visão mais ampla da utilização de ferro. Contudo, os animais não simulam com exatidão a fisiologia humana. Por isso, os resultados mais aplicáveis de biodisponibilidade advêm de estudos em humanos, os quais fornecem a verdadeira absorção dos nutrientes. Ainda assim, são estudos custosos e de difícil execução pelos aspectos éticos e sociais (DIAS et al., 2018).

Considerando o exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar as características nutricionais de cultivares de feijão-caupi biofortificadas com ferro e a biodisponibilidade e bioacessibilidade desse mineral. Espera-se que os feijões biofortificados contenham ferro mais biodisponível e, assim, contribuam com os estudos sobre essa estratégia de combate à fome oculta.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar as características nutricionais e a biodisponibilidade de ferro do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp) biofortificado com ferro e convencional, in vitro e in vivo.

2.2. Objetivos Específicos

- I. Determinar a composição centesimal dos feijões-caupi biofortificados com ferro e convencional.
- II. Analisar o teor de ácido fítico, fenólicos totais, ferro, taninos e capacidade antioxidante dos feijões-caupi.
- III. Determinar o percentual de ferro digerível do feijão-caupi biofortificado com ferro.
- IV. Avaliar a bioacessibilidade de ferro do feijão-caupi biofortificado in vitro.
- V. Avaliar a biodisponibilidade de ferro do feijão-caupi biofortificado em ratos Wistar.
- VI. Avaliar a expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo do ferro in vivo.
- VII. Avaliar marcadores de estresse oxidativo de ratos alimentados com feijões biofortificado com ferro e convencional.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Feijão-caupi

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp) é uma leguminosa importante para culinária e para nutrição brasileira, principalmente das regiões Norte e Nordeste, com destaque para os estados do Ceará, Bahia e Piauí (HONAISSER, 2022; SANT'ANA et al., 2019). Este alimento foi introduzido no país na segunda metade do século XVI pelos colonizadores portugueses. Sua origem é africana e, por ser uma planta herbácea, é adequado ao clima quente com chuvas regulares; comum ao Sudeste Asiático, África e América Latina (JAYATHILAKE et al., 2018). Há, no Brasil, uma variedade de nomes populares para o feijão-caupi, tais como: feijão-macassa, feijão-de-corda, feijão-de-praia, feijão-da-colônia, feijão-de-estrada e feijão-miúdo; demonstrando sua difusão por todo território brasileiro (FREIRE FILHO et al., 2011).

No aspecto nutricional, o feijão-caupi destaca-se pelo alto conteúdo proteico e de carboidratos, associado ao baixo conteúdo de lipídeos, importantes no contexto da alimentação saudável, incluindo àquela a base de plantas (*plant-based diet*). Os aminoácidos indispensáveis presentes, principalmente lisina e triptofano, são complementares aos aminoácidos indispensáveis dos cereais, sendo que a associação de ambos fornece uma fonte de proteínas de elevado valor nutricional. Outros componentes do feijão-caupi são relevantes para nutrição, como seu conteúdo de fibras totais, ácidos fenólicos, minerais (cálcio, fósforo e ferro) e vitaminas (pró-vitamina A, folato, tiamina, riboflavina e vitamina C) (AWIKA; DUODU, 2017; KHAN et al., 2007; JAYATHILAKE et al., 2018; MOLOTO et al., 2020).

Esta composição nutricional é relacionada à proteção contra o desenvolvimento de doenças crônicas, como, por exemplo, doenças cardiovasculares, obesidade e diabetes (JAYATHILAKE et al., 2018). A presença de compostos fenólicos e inibidores de enzimas também é notória no feijão. Estes compostos, apesar de serem relacionados à redução da biodisponibilidade de proteínas e de minerais, também são estudados por seus efeitos antioxidantes em experimentos *in vitro* e *in vivo* (ADJEI-FREMAH; JACKAI; WORKU, 2015; AWIKA; DUODU, 2017; JAYATHILAKE et al., 2018; KAPRAVELOU et al., 2015; ZIA-UL-HAQ et al., 2013).

3.1.1. Complexantes de minerais

O feijão-caupi, embora rico em nutrientes, contém em sua matriz alimentar complexantes de minerais, os quais limitam a biodisponibilidade de alguns desses nutrientes relevantes à saúde humana. É possível mencionar como exemplo, os inibidores de tripsina, os fenóis, os taninos, o ácido fítico e o ácido oxálico (SANT'ANA et al., 2019; SHAHEEN et al., 2019). Apesar de serem considerados complexantes de minerais, alguns destes exemplos também apresentam propriedades biológicas ativas, potencialmente benéficas, como atividade antioxidante (PARMAR et al., 2017).

O ferro encontrado nos feijões está na forma não heme, permitindo interações com complexantes de minerais, as quais impactam negativamente sua biodisponibilidade pela capacidade de formar precipitados, quelatos insolúveis ou macromoléculas de baixa biodisponibilidade. O ácido oxálico, por exemplo, é capaz de formar sais insolúveis ao se ligar com os minerais (GERMANO, 2002; PISKIN et al., 2022). Os fitatos, por sua vez, atuam na formação de quelatos resistentes a ação do trato gastrointestinal. Estes compreendem um grupo de compostos - derivados do ácido fítico ou ácido hexafosfórico mioinositol - responsáveis pelo estoque de fósforo nas plantas (AKOND et al., 2011; BENEVIDES et al., 2011).

Sobre alguns polifenóis, como os taninos, acredita-se que eles formam complexos não absorvíveis com os minerais (DELIMONT; HAUB; LINDSHIELD, 2017). Especificamente sobre os taninos, estes são encontrados, em suma, no tegumento das sementes de feijão, determinando a cor desta leguminosa juntamente com as antocianinas. Sendo assim, variedades escuras de feijão possuem quantidades maiores de taninos (PINTO, 2016; SANT'ANA et al., 2019). Outros polifenóis, no entanto, são estudados como promotores de absorção do ferro. São exemplos as catequinas, epicatequinas e kampferol (COSTA; PELUZIO, 2021).

3.1.2. Atividade antioxidante

Uma das principais causas de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no organismo humano é a presença desbalanceada de radicais livres, responsáveis pelo estresse oxidativo. Na contramão deste processo, há na natureza alimentos com propriedades antioxidantes naturais, além dos antioxidantes que podem ser sintéticos. Tal capacidade antioxidante é determinada pela doação de hidrogênio e

elétrons, quelar íons metálicos e eliminar radicais (MATEMU; NAKAMURA; KATAYAMA, 2021; XIONG; YAO; LI, 2013). De modo geral, é descrito na literatura que o consumo de leguminosas pode ser capaz de reduzir o risco das DCNT, relacionadas ao estresse oxidativo (KHANG et al., 2016).

Igualmente, as cultivares de feijão-caupi são conhecidas pelas suas propriedades antioxidantes, ou seja, a sua capacidade de neutralizar os radicais livres e reduzir o estresse oxidativo. Peptídeos biologicamente ativos, ácidos fenólicos, taninos e outros polifenóis presentes nos feijões são exemplos de compostos que exprimem esta característica (JAYATHILAKE et al., 2018). Por esta razão, o feijão-caupi tem sido associado com a redução do risco de DCNT, como as doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e redução dos níveis de colesterol (MATEMU; NAKAMURA; KATAYAMA, 2021).

Os polifenóis são um grupo relevante de compostos antioxidantes do feijão-caupi, localizados no revestimento das sementes. Os grupos mais comuns de polifenóis encontrados no feijão-caupi são os derivados de ácidos fenólicos e os flavonoides, com concentrações variáveis de acordo com o fenótipo de cada cultivar (AWIKA; DUODU, 2017).

Outro grupo de destaque são os peptídeos bioativos que consistem de fragmentos de proteínas, com 2 a 20 aminoácidos, lançados no organismo a partir da digestão gastrointestinal, os quais também exibem propriedades antioxidantes. Estima-se que quanto mais hidrofóbicos e aromáticos forem os aminoácidos liberados, maior será a atividade antioxidante, pela capacidade de se combinar primeiro com os radicais livres (GARCIA; BARROS; ROCHA, 2020).

3.2. Biofortificação

A biofortificação é uma das estratégias de enfrentamento à fome oculta, usada em associação a outras estratégias, dentre elas, a suplementação, a fortificação e a diversificação alimentar (RUEL; ALDERMAN; MATERNAL AND CHILD NUTRITION STUDY GROUP, 2013). Ela consiste em um processo para elevar o conteúdo de vitaminas e de minerais das plantas utilizadas na alimentação humana. A prioridade dessa estratégia são os alimentos habituais e, assim, ela torna possível reduzir a desnutrição nas camadas mais pobres da sociedade de modo

economicamente viável e sensorialmente aceito (NUTTI, 2021; TALSMA; MELSE-BOONSTRA; BROUWER, 2017).

Liberal et al. (2020) descreveram três abordagens de biofortificação: convencional, agronômica e transgênica. A biofortificação convencional ocorre a partir do cruzamento de espécies com características de interesse. Na técnica agronômica, micronutrientes de interesse são absorvidos do solo e vão para as partes comestíveis da cultivar. Por fim, a biofortificação transgênica visa melhorar a biodisponibilidade de micronutrientes da cultivar, o qual será considerado um organismo geneticamente modificado.

Internacionalmente, o programa HarvestPlus, integração administrada pela *International Center for Tropical Agriculture* e pela *International Food Policy Research Institute*, é referência na temática da biofortificação. Seu início foi em 2003, com objetivo de aumentar os teores de ferro, zinco e vitamina A de alimentos convencionais e fornecê-los na África e na Ásia. Até 2016, com o avanço do programa, os alimentos biofortificados tinham sido consumidos por aproximadamente 20 milhões de pessoas (BOUIS; SALTZMAN, 2017; JHA; WARKENTIN, 2020).

No Brasil, a Rede de Biofortificação, coordenada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), têm como principais áreas de disseminação dos alimentos biofortificados a região Nordeste e o Vale do Jequitinhonha. As culturas em desenvolvimento são parte do hábito alimentar da população, entre eles: a mandioca, a batata doce e a abóbora com elevação no conteúdo de carotenoides; milho com mais lisina, triptofano e pró-vitamina A; o arroz, o feijão, o trigo e o feijão-caupi com teores mais elevados de ferro e de zinco (NUTTI, 2010). Na Tabela 1, estão expostos alguns estudos realizados com cultivares de feijão-caupi biofortificado com ferro, desenvolvidas no Brasil.

Tabela 1. Características nutricionais e biodisponibilidade de ferro em cultivares de feijão-caupi biofortificadas com ferro no Brasil.

Referência bibliográfica	Nome da cultivar biofortificada	Teor de ferro	Complexantes de minerais	Bioacessibilidade de Fe in vitro	Biodisp. de Fe in vivo ⁺
Garcia (2018)	BRS Xiquexique	57,1 mg/kg	Fibras totais (%): 15,55 Fitatos (%): 6,17	0,101 mg/kg [#]	n.d.
Garcia (2018)	BRS Aracê	53,5 mg/kg	Fibras totais (%): 12,63 Fitatos (%): 7,55	0,132 mg/kg [#]	n.d.
Garcia (2018)	BRS Tumucumaque	49 mg/kg	Fibras totais (%): 14,12 Fitatos (%): n.d.	0,106 mg/kg [#]	n.d.
Corrêa et al. (2020)	BRS Xiquexique	6,69 ± 0,01 mg/100g	Fibras totais (%): 25,69 Ácido fítico (%): 1,75±0,02	6,53±1,08 ng/mg [*]	1,69 ± 0,93 g/dL
Corrêa et al. (2020)	BRS Aracê	5,78 ± 0,23 mg/100g	Fibras totais (%): 23,36 Ácido fítico (%): 1,79±0,05	5,0±0,31 ng/mg [*]	1,52 ± 1,28 g/dL
Corrêa et al. (2020)	BRS Tumucumaque	6,35 ± 0,04 mg/100g	Fibras totais (%): 43,05 Ácido fítico (%): 1,8±0,03	5,73±0,75 ng/mg [*]	1,71 ± 0,91 g/dL
Antunes et al. (2019)	BRS Aracê	52,41 mg/kg	Fibras totais (%): 25,34 Ácido fítico (%): 0,29±0,13	n.d.	1,83 ± 1,14 g/dL
Sant'Ana et al. (2019)	BRS Tumucumaque	69,42 ± 1,94 mg/kg	Fibras totais (g/kg): 17,14 Ácido fítico (g/kg): 0,28±0,09	12,72 ±0,42 mg/kg [#]	1,60 ± 0,86 g/dL

Biodisp.: Biodisponibilidade. n.d.: Não determinado. *: Metodologia com uso de células Caco-2. #: Metodologia com digestão gastrointestinal simulada. +: Avaliação do ganho de hemoglobina.

Sobre a biofortificação convencional de feijão-caupi no território brasileiro, a Embrapa desenvolveu três cultivares de feijão-caupi biofortificadas com ferro: BRS Aracê, BRS Xiquexique e BRS Tumucumaque (ROCHA et al., 2014) (Tabela 2). Na literatura, é descrito que o valor mínimo para a alegação da biofortificação é uma concentração de ferro 50% maior que a concentração média de ferro das cultivares convencionais (em torno de 55 mg/kg) (BIGONHA, 2013). Ressalta-se que suas

características relacionadas à qualidade e à concentração de nutrientes também são influenciadas por fatores ambientais, pré e pós-colheita (BURATTO, 2012).

Tabela 2. Características das cultivares de feijão-caupi biofortificadas.

Características	Cultivares biofortificadas		
	BRS Aracê	BRS Xiquexique	BRS Tumucumaque
Cor	Verde-oliva	Branca	Branca
Formato	Arredondado	Arredondado	Reniforme
Teor de ferro	60 mg/kg	70 mg/kg	60 mg/kg
Produtividade	1100 - 1800 kg ha ⁻¹	1000 - 1254 kg ha ⁻¹	Próximo a 1100 kg ha ⁻¹

Fonte: Rocha et al. (2014).

3.3. Fome oculta e deficiência de ferro

Diferente da fome descrita pela FAO et al. (2020) como uma sensação física desconfortável, advinda do consumo alimentar insuficiente para suprir as demandas energéticas, a fome oculta trata-se da deficiência de vitaminas e minerais. Estes nutrientes são requeridos em pequenas quantidades pelo organismo, porém sua deficiência provoca malefícios generalizados na saúde, na produtividade e no desenvolvimento mental (MUTHAYYA et al., 2013).

Em todo mundo, as inadequações de micronutrientes são, principalmente, relacionadas à vitamina A, ao iodo e ao ferro; mais comum em países em desenvolvimento e com renda baixa (WHO, 2021a). Cerca de 1,8 bilhão de pessoas não ingerem iodo em quantidades suficientes. Nesse sentido, a fortificação do sal de cozinha com iodo tem sido empregada para combater os efeitos adversos da carência (ANDERSSON; KARUMBUNATHAN; ZIMMERMANN, 2012). Zinco e ácido fólico também são outros nutrientes com deficiências proeminentes (BAILEY; WEST JR; BLACK, 2015).

Especificamente quanto à deficiência de ferro, pondera-se que os casos com anemia atingem 1,2 bilhões de pessoas no mundo e os casos sem anemia são ainda mais comuns, cerca de duas vezes (AL-NASEEM et al., 2021). Estimativas de 2019 da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2021b) demonstram que a prevalência de anemia em mulheres foi de 29,9%. Em crianças, os números são mais alarmantes e atingiram 39,8%; sendo que no território africano essa prevalência pôde alcançar o percentual de 60,2%.

No Brasil, uma revisão sistemática e meta-análise recente com 134 estudos mostraram que em todo país a anemia por falta de ferro atinge 33% das crianças (NOGUEIRA-DE-ALMEIDA et al., 2021). Sobre mulheres em idade reprodutiva não grávidas, a Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher apontou prevalência de anemia nacional de 29,4%, sendo esta prevalência maior na região Nordeste (39,1%) (BRASIL, 2009). Ainda, é válido ressaltar que esses dados podem ser subnotificados e que a deficiência pode ser ainda maior.

A anemia é o último estágio da deficiência de ferro (estágio 3) e seu ponto de corte de acordo com a OMS é mensurado pela redução na concentração de hemoglobina (<13 mg/dL em homens, <12 mg/dL em mulheres e <11 mg/dL em gestantes) (CAMASCHELLA, 2019). É importante mencionar sobre a existência de deficiência de ferro na ausência de anemia, que são os estágios 1 e 2. Nestes estágios é comum encontrar depleção das reservas de ferro e deficiência de ferro eritropoético, respectivamente (COSTA; PELUZIO, 2021).

3.4. Efeitos do ferro no organismo

As múltiplas ações do ferro no organismo humano são justificadas pela sua capacidade de participar das reações de oxidação e de redução, devido às suas propriedades físico-químicas (Tabela 3) (COSTA; PELUZIO, 2021). Nesse sentido, o consumo de ferro deve ser suficiente para garantir sua atuação adequada, porém não em excesso, de modo a gerar espécies reativas de oxigênio, as quais produzem dano celular (GUIMARÃES, 2015).

Tabela 3. Funções do ferro no organismo humano.

Alvo da ação do ferro	Função do ferro
Sistema circulatório	Formação de glóbulos vermelhos; Transporte de dióxido de carbono (CO ₂).
Metabolismo geral	Transferência de elétrons; Reações de oxidação-redução; Produção de energia celular; Conversão de betacaroteno em vitamina A.
Sistema imunológico	Produção de anticorpos; Proteção ao sistema imunológico.

Fonte: Costa e Peluzio (2021).

Na ausência de ferro, devido as suas múltiplas funções, as consequências funcionais podem ser danosas, com prejuízos ao desenvolvimento cognitivo e motor de crianças e à capacidade física em adultos, além de desfechos reprodutivos adversos (CAMASCHELLA, 2019). Em mulheres com fluxo menstrual intenso, a anemia severa pode levar à hospitalização e, em mulheres grávidas, a doença está associada ao risco de parto prematuro e complicações perinatais (CAPPELLINI; MUSALLAM; TAHER, 2020).

As implicações clínicas da anemia por deficiência de ferro podem atingir outros sistemas do organismo, como, por exemplo, levando à intensificação de doenças inflamatórias crônicas já existentes. Nos casos de doença renal crônica, a anemia é associada à diminuição da qualidade de vida. Na pele, as implicações da anemia podem ser palidez, alopecia, secura, além de promover anormalidades nas unhas. Também são descritas consequências relacionadas à instabilidade hemodinâmica e à diminuição da resposta imune (CAPPELLINI; MUSALLAM; TAHER, 2020).

Nos estudos com alimentos biofortificados, já são explorados os efeitos funcionais da biofortificação, considerando a ampla faixa de atuação do ferro no organismo. Murray-Kolb et al. (2017) avaliaram a performance cognitiva de voluntários com o consumo de feijão mais rico em ferro, sendo que este acréscimo nutricional foi positivo ao desempenho cognitivo avaliado. Na literatura, os desfechos sobre o metabolismo do ferro são mais comumente estudados, sendo frequentes as implicações positivas do consumo de alimentos biofortificados (LUNA et al., 2020; MEHTA et al., 2022).

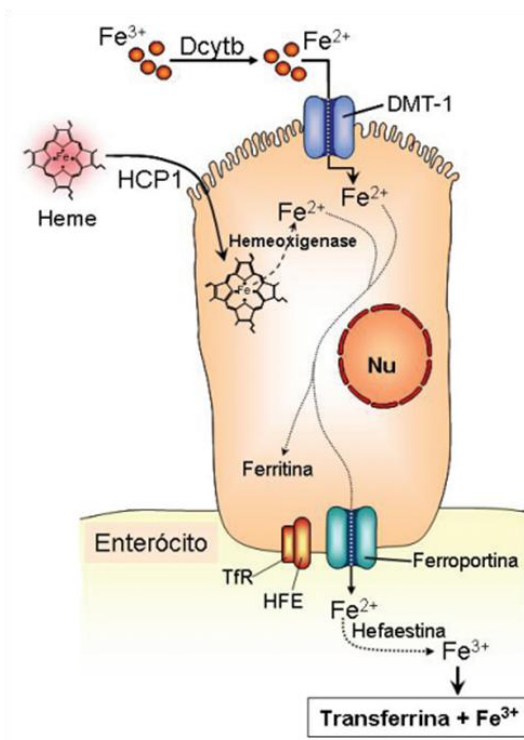
3.5. Metabolismo e biodisponibilidade de ferro

A fim de satisfazer as necessidades nutricionais, o ferro pode ser obtido de duas fontes principais: a alimentação e/ou a reciclagem de hemácias envelhecidas. Apesar das necessidades dietéticas de ferro serem, em suma, em torno de 10 mg ao dia, o teor de ferro absorvido no epitélio duodenal é baixo, em torno de 1 mg a 2 mg ao dia (COSTA; PELUZIO, 2021; GROTTTO, 2008).

A biodisponibilidade do ferro está associada ao processo de absorção a partir do intestino até o tecido alvo, ou seja, à eficiência em que o nutriente será utilizado (SANT'ANA et al., 2019). No que concerne ao ferro inorgânico (Fe^{3+}), presente em

alimentos de origem vegetal, ele inicialmente será reduzido à forma ferrosa (Fe^{2+}), processo mediado pela citocromo b duodenal (DcytB). A partir de então, o ferro ferroso será absorvido pela proteína transportadora de metal divalente (DMT-1), a qual não é exclusiva do ferro, capaz de agir sobre outros minerais, como cálcio, limitando a biodisponibilidade (GROTTO, 2008; GULEC; ANDERSON; COLLINS, 2014) (Figura 1).

Figura 1 - Absorção intestinal do ferro.



DcytB: citocromo duodenal B. DMT-1: transportador de metal divalente 1. TfR: receptor da transferrina. HCP-1: proteína transportadora do heme-1. HFE: proteína de hemocromatose. Fonte: Grotto (2008).

A absorção pode variar de acordo com a necessidade do organismo, ou seja, quanto maior a demanda maior a absorção (GROTTO, 2008). Também os componentes presentes nos alimentos têm a capacidade de impactar a utilização do ferro. Proteínas e aminoácidos, por exemplo, melhoram a absorção deste mineral, principalmente do Fe^{3+} , bem como os ácidos orgânicos, como ácidos cítrico, málico, tartárico e ascórbico, advindos de uma dieta com baixo pH e presentes em acidulantes de alimentos. De modo contrário, os fosfatos de cálcio, os taninos, o

ácido fítico e os polifenóis reduzem a absorção e utilização do ferro (PLATEL; SRINIVASAN, 2015; ROUSSEAU et al., 2020).

Após sua entrada no enterócito, o ferro pode seguir diferentes caminhos de acordo com a sua demanda. Nos casos de baixa demanda, o ferro permanecerá junto à ferritina e, posteriormente, será eliminado pela descamação do epitélio. Em alta demanda, o ferro seguirá para fora da célula, será oxidado pela hefaestina e transportado pela transferrina dentro do corpo humano para as células-alvo (GROTTO, 2010).

A regulação sistêmica do ferro é resultado da ação da hepcidina, um hormônio peptídeo circulante, a qual inibe a absorção de ferro no intestino (GULEC et al., 2014). Ela é capaz de se ligar à ferroportina, principal exportador de ferro, promovendo sua degradação, além de inibir a transcrição da DMT-1. Em ocasiões de inflamação, há um aumento da expressão deste hormônio. Por outro lado, na anemia e na hipóxia haverá uma inibição da sua expressão (GROTTO, 2008).

Portanto, o feijão-caupi é um alimento nutritivo e habitual no Brasil, sendo um promissor veículo de ferro para a estratégia da biofortificação. Esta estratégia que, em conjunto com as demais, visa à redução da deficiência de ferro, prevalente em todo o mundo e com prejuízos severos a saúde humana; sendo à baixa biodisponibilidade de ferro nos alimentos uma das causas dessa deficiência.

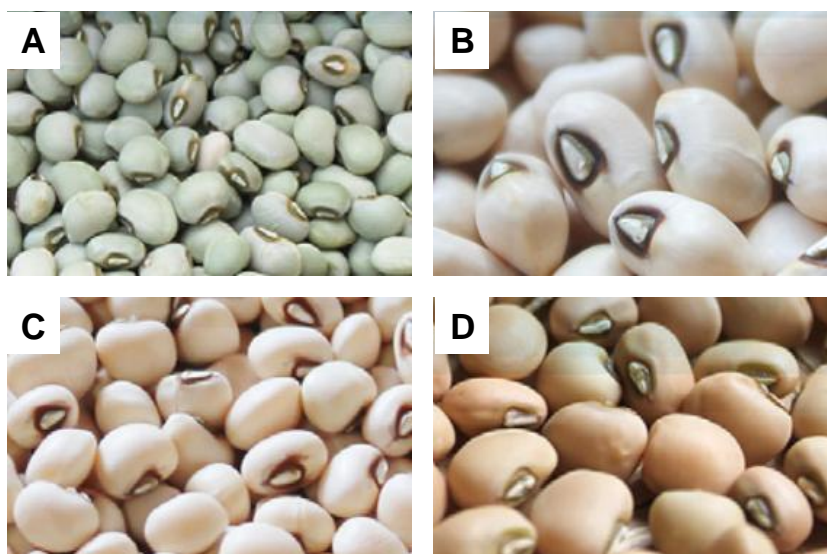
4. MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi desenvolvido nos laboratórios do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCAEE) e no Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde (CCENS) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), localizados no município de Alegre, região sul do Espírito Santo. Além disso, foram realizadas análises no laboratório de Nutrição Experimental, da Universidade Federal de Viçosa (Minas Gerais), e na Cornell University (New York, USA).

4.1. Matéria-prima

As matérias-primas utilizadas nesse trabalho foram três cultivares de feijão-caupi biofortificadas com ferro: BRS Aracê, BRS Tumucumaque e BRS Xiquexique; e uma cultivar de feijão-caupi convencional: BRS Pajeú (Figura 2). Todas as cultivares foram fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Meio-Norte, localizada no estado do Piauí, Brasil.

Figura 2 - Cultivares de feijão-caupi utilizadas no estudo.



A: Cultivar Aracê. B: Cultivar Tumucumaque. C: Cultivar Xiquexique. D: Cultivar Pajeú. Fonte: Embrapa (2022).

4.2. Processamento da matéria-prima

Os grãos de feijão-caupi foram previamente selecionados para o descarte de sujidades. Pesou-se 250 g do material cru, o qual foi lavado e cozido em água deionizada, em panela de pressão elétrica doméstica (Mondial®), até atingir a

consistência macia. A proporção de água utilizada foi de uma parte de feijão para duas partes de água deionizada (1:2 m/v). Após o cozimento, os grãos e o conteúdo líquido residual foram resfriados e posteriormente congelados em freezer -80°C por 24 horas e liofilizados (JJ Científica®, modelo LJW). Em seguida, o conteúdo final foi triturado em liquidificador convencional para obtenção de um pó fino. O acondicionamento foi feito em recipientes laminados adequadamente identificados, sob a temperatura de -80° C, protegidos da luz.

4.3. Análises físico-químicas

4.3.1. Composição centesimal

As análises de proteínas, cinzas e umidade da farinha dos feijões seguiram o protocolo metodológico da AOAC (2019). Desta forma, a análise do teor de umidade foi realizada por meio da secagem em estufa (BIOPAR®) até peso constante, na temperatura de 105°C. O resíduo mineral fixo, referente ao teor de cinzas, foi obtido após incineração em forno mufla (STECNO®) a 550°C, durante 6 horas.

O conteúdo de proteínas da amostra foi quantificado com base no valor total de nitrogênio, mensurado pelo método de Kjeldahl. A partir deste valor de nitrogênio foi possível determinar o conteúdo de proteínas, multiplicando o resultado encontrado pelo fator 6,25.

Para a determinação do teor de lipídios, foi utilizado o extrator de gordura automático modelo XT15 (ANKOM Technology®), utilizando éter de petróleo como extrator. A diferença entre a massa da amostra antes e depois de passar pelo equipamento foi considerada como o conteúdo de lipídeos.

A medida do conteúdo de fibras solúveis e insolúveis foi feita pelo método enzimático-gravimétrico, utilizando kit comercial (*Total Dietary Fiber Kit*, Megazyme®) com as enzimas α -amilase termorresistente, protease e amiloglucosidade. Quantificou-se o conteúdo total de fibras pelo somatório do conteúdo de fibras solúveis e insolúveis.

Por fim, a determinação de carboidratos foi obtida por diferença entre o somatório de fibras, proteínas, lipídeos, cinzas e umidade por 100.

4.3.1.1. Valor energético total

O cálculo do valor energético total dos feijões foi baseado na composição centesimal e nos fatores de conversão de 4 kcal/g para carboidratos e proteínas e de 9 kcal/g para lipídeos (MACLEAN et al., 2003).

4.3.2. Digestão gastrointestinal simulada

A digestão simulada in vitro foi realizada a partir de adaptações da metodologia de Brodkorb et al. (2019), em três etapas: fase oral, fase gástrica e fase intestinal. As principais adaptações do método dizem respeito a não utilização da amilase salivar, na fase oral, e da lipase gástrica, na fase gástrica. Em resumo, as amostras de feijão-caupi foram diluídas em 4 mL de fluido salivar simulado. Imediatamente após, foram adicionados de 8 mL do fluido gástrico simulado e ajustado o pH para 3, com uso de HCl (5M). Adicionou-se a pepsina e foi feita a incubação sob agitação (pH 3, 37 °C por 2h). Posteriormente, o conteúdo foi diluído em 8 mL do fluido intestinal simulado, bile bovina e pancreatina e o pH foi ajustado para 7 com uso de NaOH (5M). Fez-se a incubação sob agitação (pH 7, 37 °C por 2h). Para inativação enzimática e finalização da digestão, as amostras foram submetidas ao banho-maria a 75°C por 20 min. Finalmente, o conteúdo final foi centrifugado (5500 g por 15 min) e os sobrenadantes foram congelados, em placas de Petri, liofilizados e utilizados nas análises descritas nos tópicos 4.3.3. e 4.3.5.

4.3.3. Determinação do teor de ferro

Foi determinado o teor de ferro dos feijões (antes e depois da digestão gastrointestinal simulada), das dietas experimentais, e do tecido hepático. O conteúdo de ferro foi mensurado por espectrometria de absorção atômica (AOAC, 2019). Inicialmente, foi feita a digestão de 0,5 g de amostra com 10 mL de ácido nítrico P.A. em equipamento de micro-ondas MARS 6 (CEM Corporation®). Em seguida, as amostras foram transferidas para balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com água deionizada. Posteriormente, as amostras foram analisadas em espectrômetro de absorção atômica (SavantAA; GBC Scientific Equipment®), com curva padrão elaborada a partir de solução padrão de 1000 ppm.

4.3.4. Complexantes de minerais

4.3.4.1. Compostos fenólicos totais

O extrato foi preparado na ausência de luz, a partir de 1g feijão-caupi triturado com 40 mL de etanol (80% v/v), por 2 h a 5°C. Em seguida, foi feita a centrifugação a 7000 g por 5 minutos em temperatura ambiente. Os extratos obtidos foram armazenados fora da luz, em temperatura de congelamento, a – 20°C (PEREIRA; TAVANO, 2014). Após, fez-se a análise espectrofotométrica em leitor de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific®), a 760 nm, de acordo com Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999), empregando o ácido gálico (entre 0 ppm e 250 ppm) para elaboração da curva padrão e o reagente Folin-Ciocalteu. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente ao ácido gálico por grama de amostra seca (mg GAE / g).

4.3.4.2. Determinação de ácido fítico

O conteúdo de ácido fítico foi mensurado de acordo com as instruções metodológicas do kit comercial utilizado (*K-PHYT Phytic Acid (Phytate)/Total Phosphorus Kit*, Megazyme®). Ele se baseia na determinação do conteúdo de fósforo, através de um ensaio colorimétrico, na absorvância de 655 nm.

4.3.4.3. Determinação de taninos

O conteúdo de taninos foi mensurado pela reação vanilina/HCl, de acordo com a metodologia de Burns (1971) e as modificações de Price, Scoyoc e Butler (1978). Inicialmente, 200 mg de feijão triturado foram adicionadas a 10 mL de solução a 1% de HCl em metanol. Os tubos foram colocados em agitação e, em seguida, foram centrifugados. Alíquotas de 1 mL do sobrenadante foram adicionadas em 2,5 mL de solução a 1% de vanilina em metanol e 2,5 mL de solução a 8% de HCl em metanol. Por fim, os tubos foram mantidos em repouso por 20 minutos e as absorvâncias foram medidas a 500 nm em leitor de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific®). A catequina foi utilizada para elaboração da curva padrão e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente à catequina por grama de amostra seca (mg EC / g).

4.3.4.4. Razão molar fitato:ferro

A determinação da razão molar fitato:ferro seguiu a fórmula descrita abaixo, na qual considera-se o peso molecular do fitato como 659,91 g/mol e o peso atômico do ferro como 55,8 g/mol.

$$\text{Razão molar fitato:ferro} = \frac{\text{Teor de fitato (g)} / 659,91}{\text{Teor de ferro (g)} / 55,8}$$

4.3.5. Atividade antioxidante

4.3.5.1. Extração

Os extratos foram preparados de acordo com adaptações da metodologia de Pereira e Tavano (2014). Para tanto, foram pesados 1g do feijão-caupi triturado, e misturado com 40 mL de etanol (80% v/v), posteriormente seguiu-se com agitação por 2 h em temperatura ambiente. Em seguida, foi feita a centrifugação a 7000 g por 5 minutos a 5°C. Os sobrenadantes obtidos foram armazenados na ausência da luz a – 20°C.

Preparou-se também o extrato do feijão-caupi após digestão gastrointestinal simulada. Para o preparo do extrato, o feijão digerido foi diluído em etanol 10% (v/v) na concentração de 1 mg/mL. O conteúdo final foi armazenado na ausência da luz a – 20°C.

4.3.5.2. Captura do radical livre ABTS

Em um tubo protegido da luz, foram adicionados 3 mL de solução etanólica de ABTS e 30 µL do extrato de feijão-caupi triturado ou do extrato de feijão-caupi digerido. O conteúdo foi agitado por 10 segundos e, em seguida, mantido no repouso por 6 min. Ao final desse período, a absorbância da solução foi lida em leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific®) a 734 nm (RUFINO et al., 2007).

A construção da curva de calibração utilizou solução etanólica de trolox com concentração entre 0 e 1,5 mM. A atividade antioxidante total foi expressa em µM de equivalente trolox por g de amostra.

4.3.5.3. Método de redução do ferro (FRAP)

Em um tubo protegido da luz, foram adicionados 1,35 mL de solução do reagente FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), 45 µL do extrato de feijão-

caupi triturado ou do extrato de feijão-caupi digerido e 135 µL de água destilada. O conteúdo foi agitado e, em seguida, mantido no repouso por 30 min, no banho-maria a 37°C. Ao final desse período, a absorbância da solução foi lida em leitor de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific®) a 595 nm (RUFINO et al., 2006).

Para a construção da curva de calibração utilizou-se solução padrão de sulfato ferroso com concentração entre 0,5 mM e 2 mM. A atividade antioxidante total foi expressa em µM de sulfato ferroso por g de amostra.

4.4. Bioacessibilidade de ferro com células Caco-2

As análises de bioacessibilidade de ferro em células Caco-2 (adenocarcinoma de colorretal) foram realizadas na *Cornell University* (Ithaca, New York, USA), com os feijões cozidos e liofilizados no Brasil. Inicialmente, as células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), adicionado de 1% de antibiótico, 25 mmol/L de HEPES e 10% de FBS (soro fetal bovino), e mantidas em incubadora (37 °C; 5% CO₂; 95% de ar atmosférico; umidade constante). Nesse período, os meios de cultivo foram trocados a cada 48h.

As células foram mantidas em placas de seis poços, sendo a densidade inicial de 50.000 células/cm². Dois dias antes do experimento, retirou-se o meio de cultivo e foi adicionado o MEM (*minimum essential medium*, pH 7), contendo 10 mmol/L de PIPES, 1% solução de antibiótico, 4 mg/L de hidrocortisona, 5 mg/L de insulina, 5 µg/L de selênio, 20 µg/L de triiodotironina, e 20 µg/L de fator de crescimento epidermal (GLAHN et al., 2002).

Para o experimento, as amostras de feijão-caupi foram adicionadas e incubadas por 2h. Em seguida, os pellets foram removidos e 1 mL de MEM foi adicionado. Após 22h mantidas em incubação (37 °C; 5% CO₂; 95% de ar atmosférico; umidade constante), o meio foi removido, foram feitas duas lavagens em solução tampão e as células foram coletadas. Estas células foram transferidas para microtubos plásticos, sonicadas e estocadas a – 80°C.

Ao final do processo, foram determinados os teores de proteínas totais (ensaio colorimétrico) e de ferritina (ensaio imunorradiométrico) nas células. Com estes resultados, executou-se o cálculo do índice de captação celular de ferro, que se baseia na divisão do valor de ferritina (ng) sobre o valor de proteínas totais (mg).

4.5. Ensaio Biológico

4.5.1. Questões éticas

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), Campus de Alegre, da Universidade Federal do Espírito Santo, protocolo nº 13/2022 (Anexo A).

4.5.2. Protocolo experimental

Iniciou-se o experimento com 40 ratos machos Wistar, com 21 dias de idade, recém-desmamados, peso inicial médio de $102,01 \pm 15,98$ g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde da UFES. Os animais foram distribuídos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura controlada em 24°C e fotoperíodo de 12 h, e receberam água deionizada e dieta *ad libitum*. Em todo período experimental, o peso dos animais e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente.

A avaliação da biodisponibilidade de ferro ocorreu por meio do método de depleção-repleção da hemoglobina com adaptações (AOAC, 1998). Na fase de depleção, durante os 21 primeiros dias, os animais receberam dieta isenta de ferro para induzir a anemia ferropriva. Em seguida, na fase de repleção, durante 14 dias, os animais receberam dietas preparadas para fornecer 12 mg/kg de ferro, a partir de sulfato ferroso ou de feijões-caupi, com objetivo de recuperar os níveis de hemoglobina. Todas as dietas foram padronizadas de acordo com AIN-93G para roedores (REEVES et al., 1993), sendo que os teores dos componentes foram modificados de acordo com a composição de cada feijão, de forma que as composições finais ficassem semelhantes (Tabela 4).

Ao final da fase de depleção, foi medido o valor de hemoglobina dos animais, com kit comercial (Labtest®). Em seguida, os animais foram randomizados aleatoriamente de acordo com o peso e com os níveis de hemoglobina (g/dL) em 5 grupos experimentais, com 8 animais em cada grupo. Os grupos experimentais foram: Sulfato Ferroso, Aracê, Xiquexique, Tumucumaque e Pajeú.

Tabela 4. Composição das dietas experimentais durante as fases de depleção e repleção.

Ingrediente (g/kg)	Depleção			Repleção		
	Padrão	SF	T	P	A	X
Albumina	200	200	158,32	157,78	152,70	157,06
Amido dextrinizado	132	132	132	132	132	132
Sacarose	100	100	100	100	100	100
Óleo de soja	70	70	62,41	63,15	61,02	62,33
Celulose	50	63,03	23,08	0	16,44	16,71
Mix de minerais ¹	35	35	35	35	35	35
Mix de vitaminas	10	10	10	10	10	10
L-Cistina	3	3	3	3	3	3
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Amido de milho ²	397,5	384,41	297,60	321,82	301,34	297,01
Feijão-caupi ^{3 e 4}	-	-	176,08	174,75	186,02	184,39
Sulfato ferroso ³	-	0,0597	-	-	-	-
Conteúdo de Fe (mg/kg) ⁵	-	19,46	14,25	16,38	17,89	18,98

¹ Isento em ferro. ² Quantidade suficiente para fornecer 1 kg de dieta. ³ Quantidade suficiente para fornecer 12 mg de ferro por kg de dieta. ⁴ O preparo dos feijões dieta seguiu a metodologia descrita no tópico 4.2. ⁵ Conteúdo determinado por espectrometria de absorção atômica (conforme tópico 4.3.3.). SF: Sulfato ferroso. T: Tumucumaque. P: Pajeú. A: Aracê. X: Xiquexique. Fe: ferro.

Ao final do período de repleção, os animais foram mantidos em jejum por 12h e, posteriormente, eutanasiados. Para a eutanásia, foi aplicada uma dose de 0,2 mL por 100 g de massa corporal de uma combinação de ketamina, xilasina e soro fisiológico, na proporção de 1,5:1:1,5 via intraperitoneal. Imediatamente depois, foram coletadas gotas de sangue da porção terminal da cauda do animal para realização do teste de hemoglobina. Além disso, foram coletados cerca de 5 mL de sangue por punção cardíaca e centrifugados a 400 g por 10 minutos a 4°C para obtenção do soro.

Após a eutanásia, o fígado e o intestino delgado (duodeno) foram recolhidos, para determinação de marcadores de estresse oxidativo e da expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo do ferro. Estes órgãos foram imediatamente imersos em solução tampão fosfato 0,01 M (pH 7,4) para lavagem e remoção de sujidades externas e armazenados em freezer – 80°C.

4.5.3. Ganho de peso e consumo alimentar

O peso e o consumo alimentar dos animais foram monitorados semanalmente, e ao final da fase de repleção foram calculados os seguintes parâmetros: ganho de peso (GP) (1); consumo alimentar (CA) (2); coeficiente de eficiência alimentar (CEA) (3) e consumo de ferro (Cons. Fe) (4). Estes cálculos foram feitos de acordo com as fórmulas descritas abaixo.

$$\text{GP (g)} = \text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)} \quad (1)$$

$$\text{CA (g)} = \text{soma do consumo de dieta nos 14 dias de repleção} \quad (2)$$

$$\text{CEA} = \frac{\text{GP na repleção (g)}}{\text{CA na repleção (g)}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Cons. Fe (mg)} = \frac{[\text{Teor de ferro da dieta (mg)} \times \text{CA na repleção (g)}]}{1000} \quad (4)$$

4.5.4. Biomarcadores hematológicos

No fígado foi medido o teor de ferro, um dos principais estoques corporais deste nutriente, de modo semelhante ao descrito na metodologia exposta no tópico 4.3.3.. No soro foram feitas análises bioquímicas de ferro sérico, ferritina e transferrina, utilizando kits comerciais (Bioclin®), seguindo as instruções do fabricante.

Na determinação do teor de hemoglobina, 20 µL de sangue foram homogeneizados em 5 mL do reagente de cor, preparado segundo as instruções do kit comercial (Labtest®). Uma alíquota de 200 µL desta mistura foi pipetada em microplaca de 96 poços e foi determinada a absorbância em 540 nm em leitor de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific®). O resultado final (g/dL) foi obtido a partir da divisão da absorbância encontrada na amostra teste sobre a absorbância encontrada no produto padrão de hemoglobina, multiplicado por 10 (valor de Hb do padrão).

A partir dos valores de hemoglobina, foram calculados o ganho de hemoglobina (Hb) (1), o pool de ferro na hemoglobina (Hb-Fe) inicial (2) e final (3), a eficiência de regeneração da hemoglobina (HRE) (4) e o valor biológico relativo (RBV) (5) na fase de repleção, conforme as fórmulas a seguir (MAHONEY; VANORDEN; HENDRICKS, 1974).

$$\text{Ganho de Hb (g/dL)} = \text{teor de Hb final (g/dL)} - \text{teor de Hb inicial (g/dL)} \quad (1)$$

$$\text{Hb-Fe inicial (mg)} = \frac{[\text{peso inicial (g)} \times \text{teor de Hb inicial (g/dL)} \times 6,7 \times 0,335]}{1000} \quad (2)$$

$$\text{Hb-Fe final (mg)} = \frac{[\text{peso final (g)} \times \text{teor de Hb final (g/dL)} \times 6,7 \times 0,335]}{1000} \quad (3)$$

$$\text{HRE (\%)} = \frac{\text{Hb-Fe final (mg)} - \text{Hb-Fe inicial (mg)}}{\text{Ferro consumido (mg)}} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{RBV} = \frac{\text{HRE do grupo teste (\%)}}{\text{HRE do grupo controle (\%)}} \times 100 \quad (5)$$

4.5.5. Expressão gênica de proteínas

A expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo do ferro foi analisada pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR), utilizando StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Inicialmente, foi feita a extração do RNA mensageiro (mRNA) a partir de 100 mg do tecido hepático e duodenal, utilizando o reagente Trizol (Invitrogen Brasil Ltda.). Em seguida, através da quantificação e obtenção de 2 µg de mRNA, foi sintetizado o DNA complementar (cDNA) com uso do Kit de transcrição reversa (Invitrogen Brasil Ltda.). A quantificação da expressão de mRNA foi mensurada em RT-qPCR, com Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram: um ciclo inicial de desnaturação 95°C (20 min), 40 ciclos de 30 segundos de desnaturação (95°C) e anelamento e extensão por 30 segundos (60°C), seguidos da curva de dissociação (LIVAK; SCHMITTENT, 2001). As sequências de primers senso e anti-senso foram utilizadas para amplificar a ferritina e a transferrina, no fígado, e a DMT-1, ferroportina e hefaestina, no intestino delgado (Tabela 5). A expressão relativa dos níveis de mRNA foram normalizadas pelo controle endógeno beta-actina.

Tabela 5. Sequência de primers usada na análise biomolecular.

Tecido	Genes	Senso (5' – 3')	Anti-senso (5' – 3')
Controle	Beta-actina	TTCGTTGCCGGTCCACC	GCTTTGCACATGCCGGAGCC
Fígado	Ferritina	CAGCCGCCTTACAAGTCTCT	ATGGAGCTAACCGCGAAGAC
	Transferrina	AGCTGCCACCTGAGAACATC	CGCACGCCCTTTATTCATGG
Intestino	DMT-1	CTGATTTACAGTCTGGAGCAG	CACTTCAGCAAGGTGCAA
Delgado	Ferroportina	TTCCGCACTTTTCGAGATGG	TACAGTCGAAGCCCAGGACCGT
	Hefaestina	GGCACAGTTACAGGGCAGAT	AGTAACGTGGCAGTGCATCA

DMT-1: Transportador de metal divalente 1.

4.5.6. Marcadores de estresse oxidativo

200 mg do tecido hepático foi macerado usando bastão de vidro em um microtubos, para a formação do homogenato. Em seguida, foi adicionado 1 mL de tampão fosfato 50 mM, com EDTA (pH 7,4). O conteúdo final foi centrifugado a 1200 g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi recolhido. Por fim, armazenou-se o homogenato em freezer a – 80°C.

Para quantificação de óxido nítrico, seguiu-se a metodologia de Green et al. (1982), com modificações. Para isso, 120 µL de homogenato diluído em água na proporção 1:3 (30 µL de homogenato e 90 µL de água) foram adicionados a 120 µL da solução com reagente de Griess. Em seguida, o conteúdo foi incubado em temperatura ambiente por 10 min e, por fim, as absorbâncias foram lidas em 540 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific®). Na elaboração da curva padrão, utilizou-se o nitrito de sódio (NaNO₂) com concentrações variando entre 0,01 µM a 100 µM.

A capacidade antioxidante total (CAT) do fígado foi determinada com a utilização de kit comercial (*Antioxidant Assay Kit*, Sigma-Aldrich). De acordo com as instruções do fabricante, em que 20 µL de homogenato foi diluído em água na proporção 1:3 (5 µL de homogenato e 15 µL de água) e adicionados a 100 µL do mix reagente. O conteúdo final foi incubado em temperatura ambiente por 10 min e as absorbâncias foram lidas em 570 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific®). No preparo da curva padrão, foram utilizadas concentrações de Trolox entre 0 µM a 1000 µM.

4.6. Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-smirnov e, ao se comprovar a normalidade dos dados, foram submetidos ao teste estatístico da Análise de Variância (ANOVA). Os dados relativos à composição nutricional dos feijões, bem como as análises in vitro (células Caco-2) foram submetidos ao teste de comparação de médias de Tukey, enquanto os resultados do experimento in vivo foram submetidos ao teste de Newman-Keuls. O valor de p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo. As análises foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism, versão 9.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição nutricional

Os resultados da composição nutricional refletem, em suma, a diversidade das cultivares de feijão-caupi. Isso porquê em todos os componentes mensurados do alimento foram identificadas diferenças significativas em, pelo menos, um feijão em comparação aos demais (Tabela 6).

Tabela 6. Composição nutricional dos feijões-caupi convencional e biofortificados em base seca.

Componentes	Biofortificados			Convencional
	Aracê	Xiquexique	Tumucumaque	Pajeú
Umidade (g/100g)	1,89 ± 0,21 ^a	1,79 ± 0,23 ^a	1,57 ± 0,29 ^{ab}	1,14 ± 0,10 ^b
Cinza (g/100g)	3,80 ± 0,03 ^{bc}	3,89 ± 0,03 ^b	3,74 ± 0,02 ^c	4,00 ± 0,06 ^a
Lipídio (g/100g)	4,83 ± 0,31 ^a	4,17 ± 0,35 ^{ab}	4,31 ± 0,25 ^{ab}	3,93 ± 0,03 ^b
Proteína (g/100g)	25,43 ± 0,60 ^a	23,29 ± 0,14 ^b	23,67 ± 0,11 ^b	24,16 ± 0,74 ^b
Carboidrato (g/100g)	38,99	41,75	44,02	30,70
Fibra Total (g/100g)	25,06 ± 3,40 ^{ab}	25,12 ± 2,16 ^{ab}	22,69 ± 1,29 ^b	36,07 ± 1,08 ^a
Fibra Solúvel (g/100g)	1,65 ± 0,16 ^b	1,80 ± 1,09 ^b	2,18 ± 0,34 ^b	5,85 ± 0 ^a
Fibra Insolúvel (g/100g)	23,40 ± 3,23 ^{ab}	23,32 ± 1,06 ^{ab}	20,52 ± 0,96 ^b	30,22 ± 1,08 ^a
Ácido fítico (g/100g)	0,66 ± 0,02 ^c	0,97 ± 0,02 ^a	0,89 ± 0,01 ^b	0,97 ± 0,02 ^a
Taninos (mgEC / g)	n.d.	n.d.	n.d.	3,83 ± 0,27
Fenólicos (mgGAE / g)	25,33 ± 1,18 ^c	32,00 ± 2,36 ^b	23,25 ± 1,77 ^c	112,83 ± 0 ^a
Razão molar Fi:Fe	8,64	12,66	11,00	11,95
VET (kcal/100g)	301,19	297,64	309,57	254,81

Valores expressos em média ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes na mesma linha significa diferença estatística (p<0,05) pela ANOVA e *post-hoc* de Tukey. EC: Equivalente à catequina. GAE: Equivalente ao ácido gálico. Fi:Fe: Fitato:Ferro. n.d.: Não detectado. VET: Valor Energético Total.

Na determinação da umidade, percebe-se a eficiência da liofilização no processo de secagem dos alimentos, visto que os teores de umidade encontrados estavam abaixo de 2%. Neste processamento, a água do alimento é eliminada através da sublimação a vácuo, ou seja, ela passa diretamente do estado sólido para o estado gasoso (CELESTINO, 2010). No estudo de SANT'ANA et al. (2019), foi utilizado outro equipamento para secagem, a estufa, e os teores de umidade dos feijões-caupi estiveram acima de 5%. Uma vantagem do processo de liofilização são as perdas mínimas de nutrientes durante o processamento, característica relevante

para estudos que avaliam propriedades nutricionais dos alimentos (CELESTINO, 2010).

Os feijões avaliados no presente estudo apresentaram teor de proteínas semelhante aos reportados na literatura, entre 23% e 32% em base seca. Por outro lado, foram encontrados valores maiores de lipídios e de fibras alimentares nos feijões deste estudo (FROTA; SOARES; ARÊAS, 2008; JAYATHILAKE et al., 2018; SANT'ANA et. al, 2019). Esse alto teor de fibras pode afetar a biodisponibilidade do ferro, através da formação de complexos não absorvíveis. Além disso, o aumento da viscosidade ocasionado pelas fibras alimentares pode impedir o acesso das enzimas digestivas aos nutrientes (ROUSSEAU et al., 2020). No presente trabalho, a cultivar convencional Pajeú apresentou o teor de fibras solúveis maior ($p < 0,05$) que as demais cultivares. Em relação ao teor de fibras totais e insolúveis, a cultivar Pajeú foi superior apenas à cultivar Tumucumaque.

As cultivares biofortificadas apresentaram valores energéticos superiores a cultivar convencional. Este resultado pode ser explicado devido ao maior teor de fibras e, conseqüentemente, à menor concentração de carboidrato disponível da cultivar convencional. Isso porque as fibras são carboidratos não digeríveis, as quais fornecem um aporte energético menor que os carboidratos. Neste estudo, a energia fornecida pela fermentação das fibras e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), de 1 kcal/g, não foi considerada para o cálculo do valor energético total (MACLEAN et al., 2003).

Observa-se ainda a predominância de ácido fítico nas cultivares Pajeú e Xiquexique, em detrimento das cultivares Aracê e Tumucumaque (Tabela 6). Além disso, estas duas cultivares apresentaram os menores valores de razão molar fitato:ferro. Isto demonstra uma vantagem destas cultivares biofortificadas para a absorção de ferro, visto que o ácido fítico é capaz de se ligar aos minerais tornando-os indisponíveis para absorção (GUPTA; GANGOLIYA; SINGH, 2015; PLATEL; SRINIVASAN, 2016). Sendo assim, uma estratégia interessante pode ser a redução de ácido fítico nos alimentos biofortificados em ferro para aperfeiçoar a eficácia da biofortificação (PETRY et al., 2014).

Os taninos foram detectados apenas na cultivar convencional Pajeú. Como eles são encontrados, majoritariamente, em cultivares escuras e, apenas, a cultivar convencional é um feijão de coloração escura neste estudo, o resultado já era

esperado (Tabela 2) (EMBRAPA, 2022; SANT'ANA et al., 2019). Destaca-se que este componente é considerado prejudicial à absorção de ferro, por ser capaz de formar complexos insolúveis com os minerais (DELIMONT; HAUB; LINDSHIELD, 2017).

A concentração total de compostos fenólicos também foi significativamente maior na cultivar convencional do que nas demais cultivares biofortificadas. Os compostos fenólicos são descritos como compostos detentores de atividade antioxidante, o que é vantajoso no combate a doenças crônicas não transmissíveis. Mas também são detentores de propriedades quelantes de metais, o que prejudica a biodisponibilidade de ferro (JAYATHILAKE et al., 2018).

Tabela 7. Teor de ferro de feijões-caupi convencional e biofortificado, antes e depois da digestão gastrointestinal simulada.

Conteúdo de ferro	Biofortificados			Convencional
	Aracê	Xiquexique	Tumucumaque	Pajeú
Anterior DS (mg/kg)	64,51 ± 0,35 ^a	65,08 ± 1,44 ^a	68,15 ± 2,41 ^a	68,67 ± 2,29 ^a
Após DS (mg/kg)	13,64 ± 0,0 ^a	14,37 ± 0,18 ^a	12,72 ± 0,95 ^a	9,72 ± 0,25 ^b
Fe digerível (%)	21,14	22,08	18,66	14,15

Valores expressos em média ± desvio padrão (n = 2). Letras diferentes na mesma linha significa diferença estatística (p<0,05) pela ANOVA e *post-hoc* de Tukey. Fe: Ferro. DS: Digestão gastrointestinal simulada.

Não houve diferença significativa (p>0,05) entre o teor de ferro das cultivares biofortificadas e convencional, antes da digestão simulada (Tabela 7). Além disso, os feijões não atingiram os valores mínimos para a alegação da biofortificação, considerado uma concentração de ferro 50% maior que a concentração média de ferro das cultivares convencionais (em torno de 55 mg/kg) (BIGONHA, 2013). Apesar disso, além do acréscimo no teor total de ferro, a bioacessibilidade e a biodisponibilidade devem ser consideradas na avaliação da efetividade da biofortificação dos feijões-caupi.

Na literatura, foram descritos teores de ferro maiores, menores e similares a estes em feijões-caupi convencionais (FROTA; SOARES; ARÊAS, 2008; PAIXÃO; DE MELO, 2020; SANT'ANA et al., 2019). No estudo de Garcia (2018), com estas mesmas três cultivares biofortificadas, os teores de ferro foram ainda menores que os do presente estudo (Tabela 1). Percebe-se que esta variação em comparação

aos feijões de outros estudos é comum. Este fato pode ser explicado pela existência de fatores responsáveis pela variedade no teor de nutrientes das plantas, como a variabilidade genética, o local de cultivo e o processamento ao qual o alimento é submetido (BURATTO, 2012).

Os feijões biofortificados deste estudo apresentaram maior permanência de ferro após digestão simulada, indicando uma maior bioacessibilidade mineral nestas cultivares (Tabela 7). Isso porque o teor de nutriente que permanece na fração solúvel do conteúdo digerido após a digestão é aquele que possivelmente estará disponível para absorção no trato gastrointestinal (SANT'ANA et al., 2019). Logo, todas as cultivares biofortificadas mostraram-se superiores na concentração de ferro, após digestão gastrointestinal simulada.

É importante associar a predominância de todos os complexantes de minerais mensurados na cultivar convencional ao menor percentual de ferro digerível desta mesma cultivar. Tal fato indica que a presença de complexantes de minerais pode ter sido responsável por reduzir o teor de ferro digerível, devido à capacidade destes compostos de formar complexos insolúveis. Destaca-se ainda que esta digestão *in vitro* não mimetiza com exatidão toda complexidade do processo digestivo humano. Contudo, ela é útil para avaliar características indicativas da biodisponibilidade de ferro, visto que apresenta uma correlação positiva com os experimentos que utilizaram modelos *in vivo* (SANT'ANA, 2018).

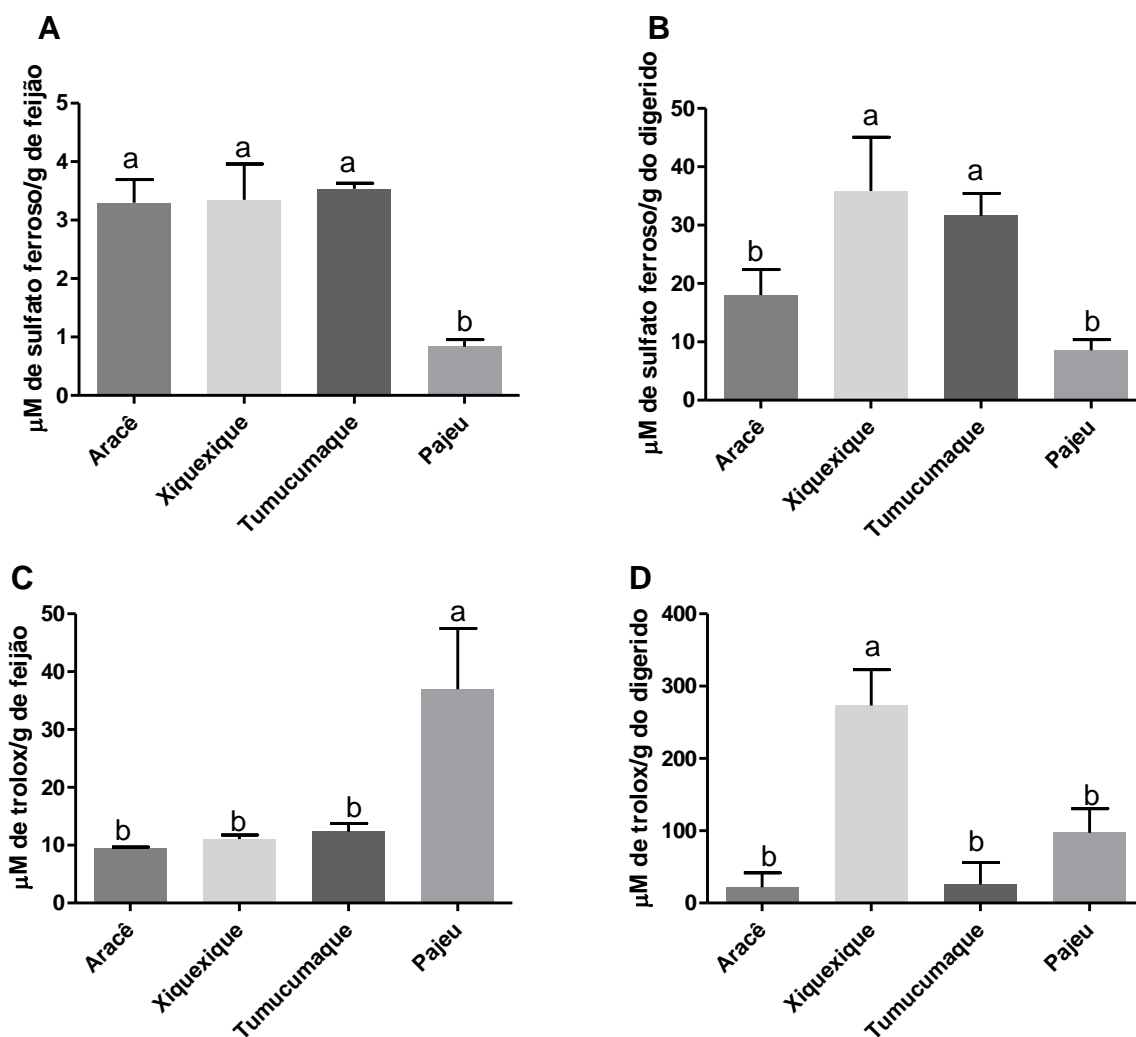
5.2. Atividade antioxidante

Os resultados para atividade antioxidante (AA) total através do FRAP apontam superioridade das cultivares biofortificadas, tanto no alimento triturado quanto no seu extrato após digestão simulada (Figuras 3A e 3B). No ensaio com ABTS, a atividade antioxidante do feijão triturado foi maior para a cultivar convencional, sem diferença entre as cultivares biofortificadas. Após a digestão, os maiores resultados foram encontrados para o feijão biofortificado Xiquexique, sem diferença entre as demais cultivares (Figuras 3C e 3D).

A diversidade dos resultados pode ser explicada pela diferença entre as metodologias de detecção da AA. No FRAP, trata-se de uma medida de atividade antioxidante pela redução do ferro (RUFINO et al., 2006). Por isso, questiona-se sobre o maior teor de ferro utilizável nos feijões biofortificados ter favorecido a maior

redução do ferro e, conseqüentemente, a maior detecção de atividade antioxidante. Por outro lado, com o ABTS, a capacidade antioxidante é determinada pela captura do radical livre (RUFINO et al., 2007). Os compostos fenólicos, por exemplo, possuem atividade detectável pelo método com ABTS.

Figura 3 - Atividade antioxidante total.



A: AA pelo FRAP no feijão triturado. B: AA pelo FRAP no feijão digerido. C: AA pelo método com ABTS no feijão triturado. D: AA pelo método com ABTS no feijão digerido. Valores expressos em média \pm desvio padrão (n = 3). Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e *post-hoc* de Tukey.

Outros trabalhos da literatura apontam uma ampla faixa de resultados para atividade antioxidante (ANJOS BARROS et al., 2020; MOREIRA-ARAÚJO et al., 2018). Esta variação pode ser devido às diferenças na metodologia, nas unidades de medidas, entre outras. Contudo, no trabalho de Honaiser (2022), ao avaliar a capacidade antioxidante do feijão-caupi cozido, antes e depois da digestão

simulada, os resultados do FRAP estavam próximos ao encontrado no trabalho atual. Sendo que, Honaiser (2022) também observou um aumento da capacidade antioxidante após o processo digestivo in vitro.

As propriedades antioxidantes têm sido muito exploradas devido ao potencial benefício à saúde. Isso tendo em vista que o desequilíbrio entre o estado pró e antioxidante é capaz de aumentar o risco de desenvolvimento e progressão de doenças. Em feijões-caupi, essa capacidade pode estar relacionada às proteínas, bem como os peptídeos bioativos, e aos polifenóis presentes na matriz alimentar (AWIKA; DUODU, 2017; JAYATHILAKE et al., 2018; MATEMU; NAKAMURA; KATAYAMA, 2021).

Nos dois testes, houve aumento na atividade antioxidante total dos feijões Xiquexique e Pajeú, após o processo de digestão simulada. Uma possível explicação é que, após a ação enzimática, os compostos com ação antioxidante sofrerão mudanças relativas às interações com outras moléculas e ao pH. Sabe-se que o comportamento antioxidante é fortemente influenciado pela matriz alimentar (GARCÍA-CASAS et al., 2022). Destaca-se, por fim, que os valores após a digestão simulada refletem a fisiologia do organismo humano.

5.3. Bioacessibilidade de ferro em células Caco-2

Todas as cultivares biofortificadas apresentaram valores de bioacessibilidade de ferro superiores a cultivar convencional, nas células Caco-2 ($p < 0,05$). Assim, as cultivares Tumucumaque e Aracê exibiram os valores mais elevados de ferritina (ng) por proteína (mg), seguidos pela cultivar Xiquexique (Tabela 8).

Tabela 8. Índice de captação celular de ferro.

Grupos	Ferritina (ng) / proteína (mg)
Aracê	4,36 ± 1,28 ^{ab}
Xiquexique	2,80 ± 0,41 ^b
Tumucumaque	5,61 ± 1,22 ^a
Pajeú	0,92 ± 0,18 ^c

Valores expressos em média ± desvio padrão (n = 6). Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e *post-hoc* de Tukey.

Os estudos com essas células constituem um modelo de avaliação de ampla aplicabilidade, rápido e pouco custoso. Células Caco-2 são células isoladas de adenocarcinoma de cólon que mimetizam a ação do epitélio intestinal (DIAS et al., 2018). Na utilização das células Caco-2, a produção de ferritina pelas células é uma resposta à absorção de ferro, ou seja, à presença de ferro intracelular; sendo um bom indicativo do processo absorptivo (VAZ-TOSTES et al., 2016). Logo, é possível avaliar pelo modelo in vitro com células Caco-2 a bioacessibilidade de ferro, ou seja, o teor de ferro do alimento que foi absorvido in vitro (TORRES, 2018).

Os resultados demonstram a superioridade das cultivares biofortificadas na absorção de ferro. Isso porque, apesar do teor de ferro não ter sido estatisticamente diferente, a bioacessibilidade em células foi superior para os feijões biofortificados. Este fato vai ao encontro dos resultados de manutenção de ferro pós-digestão encontrados no presente trabalho, também maior para as cultivares biofortificadas (Tabela 7).

Uma provável explicação para a melhor utilização do ferro nos feijões biofortificados está na composição nutricional dos alimentos. O feijão convencional apresentou maiores concentrações de compostos que podem reduzir a absorção de ferro, como fibras alimentares, taninos, ácido fítico e compostos fenólicos. Assim como o feijão Xiquexique, o qual teve maior teor de fenólicos, ácido fítico e atividade antioxidante no material digerido, mas, ao mesmo tempo baixa captação celular de ferro. Este fato indica uma relação inversa entre a absorção de ferro e a presença de complexantes de minerais na matriz alimentar.

Além disso, o resultado atual coincide com outros estudos, nos quais também foram encontrados valores de bioacessibilidade de ferro em células Caco-2 superiores para cultivares biofortificadas (CORRÊA et al., 2020; GANNON; GLAHN; MEHTA, 2021; TAKO; BLAIR; GLAHN, 2011). Logo, os feijões-caupi biofortificados apresentam-se como alimentos promissores para auxiliar na melhoria do estado nutricional de ferro.

5.4. Ensaio Biológico em ratos

5.4.1. Ganho de peso e consumo alimentar

Todos os grupos experimentais apresentaram um ganho de peso e consumo alimentar semelhantes, não havendo diferença estatística entre eles, nas duas

etapas do estudo ($p > 0,05$) (Tabela 9 e 10). Esta semelhança no ganho de peso e no consumo alimentar entre os grupos era esperada, uma vez que, foi fornecida a mesma quantidade de dieta. Além disso, as dietas experimentais apresentavam os mesmos valores de densidade energética, de acordo com as indicações da AIN93-G (REEVES et al., 1993). Desta forma, foi possível obter padronização entre os grupos, de modo que o objetivo final - avaliar a biodisponibilidade de ferro - sofresse uma interferência mínima de fatores externos.

Tabela 9. Ganho de peso e consumo alimentar na fase de depleção.

Grupos	Ganho de peso (g)	Consumo alimentar (g)
Sulfato Ferroso	110,3 ± 13,62 ^a	336,05 ± 36,63 ^a
Aracê	112,7 ± 10,01 ^a	334,66 ± 21,48 ^a
Xiquexique	112,84 ± 12,43 ^a	336,65 ± 24,0 ^a
Tumucumaque	114,95 ± 13,81 ^a	347,85 ± 18,92 ^a
Pajeú	117,2 ± 9,28 ^a	335,2 ± 26,87 ^a

Valores expressos em média ± desvio padrão (n = 8). Letras diferentes na mesma coluna significa diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e *post-hoc* de Newman-Keuls.

As cultivares de feijão-caupi biofortificadas foram capazes de suprir as necessidades nutricionais e de promover o crescimento dos animais, de modo semelhante a cultivar convencional do feijão e ao controle positivo (sulfato ferroso), de acordo com o CEA (Tabela 10). Em relação ao consumo de ferro, diferenças significativas foram identificadas entre os grupos experimentais. O maior consumo de ferro encontrado foi para o grupo Sulfato Ferroso e, em seguida, para os grupos Xiquexique e Aracê, sem diferença entre estes dois ($p > 0,05$). Além disso, durante a fase de repleção, o grupo Tumucumaque foi o que apresentou o menor consumo deste mineral.

Apesar de todas as dietas terem sido formuladas para terem o mesmo teor de ferro, na análise química da concentração final deste mineral nas dietas, os resultados foram diferentes (Tabela 4). Isso pode explicar o porquê do consumo mineral também ter sido diferente, mesmo com o consumo alimentar total semelhante. Ainda assim, ressalta-se que em termos numéricos, os valores de consumo do ferro em todos os grupos foram próximos; sendo que as diferenças estatísticas podem ser explicadas pelos baixos valores de desvio padrão.

Tabela 10. Ganho de peso, consumo alimentar, coeficiente de eficiência alimentar e consumo de ferro na fase de repleção.

Grupos	Ganho de peso (g)	Consumo alimentar (g)	Coeficiente de Eficiência Alimentar	Consumo de ferro (mg)
Sulfato Ferroso	53,53 ± 7,88 ^a	248,73 ± 10,53 ^a	21,51 ± 2,92 ^a	4,84 ± 0,20 ^a
Aracê	46,15 ± 12,01 ^a	242,84 ± 12,11 ^a	19,02 ± 4,87 ^a	4,34 ± 0,22 ^b
Xiquexique	50,93 ± 13,44 ^a	241,48 ± 13,39 ^a	21,07 ± 5,33 ^a	4,58 ± 0,25 ^b
Tumucumaque	46,49 ± 10,21 ^a	239,96 ± 21,12 ^a	19,39 ± 3,94 ^a	3,42 ± 0,30 ^d
Pajeú	52,48 ± 12,49 ^a	240,85 ± 10,99 ^a	21,74 ± 4,82 ^a	3,95 ± 0,18 ^c

Valores expressos em média ± desvio padrão (n = 8). Letras diferentes na mesma coluna significa diferença estatística (p<0,05) pela ANOVA e *post-hoc* de Newman-Keuls.

5.4.2. Biomarcadores hematológicos e biodisponibilidade de ferro

Não foi observada diferença estatística nos teores de hemoglobina no final da fase de depleção, entre os grupos. A dieta de depleção foi eficaz para tornar todos os grupos igualmente anêmicos, com níveis de hemoglobina abaixo de 12 g/dL (JACOB FILHO et al., 2018). Assim foi garantido que, no início da fase de repleção, os animais possuísem condições fisiológicas relativas ao ferro semelhantes; de modo que os fatores externos, mais uma vez, não se tornassem vieses capazes de interferir no resultado final de biodisponibilidade de ferro.

Tabela 11. Ganho de hemoglobina, eficiência de regeneração da hemoglobina e valor biológico relativo na fase de repleção.

Grupos	Ganho de Hb (g/dL)	HRE (%)	RBV
Sulfato Ferroso	2,44 ± 0,51 ^a	49,10 ± 7,31 ^b	100,00 ± 14,89 ^b
Aracê	2,10 ± 0,43 ^{ab}	46,20 ± 7,80 ^b	94,09 ± 15,88 ^b
Xiquexique	2,59 ± 0,83 ^a	52,74 ± 12,06 ^b	107,41 ± 24,57 ^b
Tumucumaque	2,23 ± 0,53 ^{ab}	62,92 ± 9,02 ^a	128,14 ± 18,38 ^a
Pajeú	1,66 ± 0,51 ^b	48,16 ± 6,83 ^b	98,08 ± 13,91 ^b

Valores expressos em média ± desvio padrão (n = 8). Letras diferentes na mesma coluna significa diferença estatística (p<0,05) pela ANOVA e *post-hoc* de Newman-Keuls. Hb: hemoglobina. HRE: eficiência de regeneração da hemoglobina. RBV: valor biológico relativo.

Ao final do período de repleção, os níveis de hemoglobina ainda não estavam normais, ou seja, os animais ainda estavam anêmicos (hemoglobina < 12 g/dL). Isso pode ter ocorrido devido ao curto período de aplicação da dieta com ferro, apenas 14 dias (SANT'ANA, 2018). No entanto, essa recuperação parcial da anemia é

importante para diferenciar os grupos, caso contrário, se o tempo de consumo fosse maior, não seria possível avaliar a velocidade de recuperação da anemia entre os grupos.

Quanto às concentrações de hemoglobina ao final da fase de repleção e o ganho de hemoglobina, os feijões biofortificados foram semelhantes ao grupo controle, em especial o feijão Xiquexique. A cultivar convencional Pajeú teve um ganho de hemoglobina menor, comparado ao grupo controle. Sendo assim, o feijão biofortificado Xiquexique, como fonte de ferro para hematopoiese, foi mais satisfatório do que o feijão convencional Pajeú, sendo o resultado apresentado pelos feijões biofortificados comparável ao Sulfato Ferroso (Tabela 11).

Destaca-se que nos estudos de biodisponibilidade de ferro o sulfato ferroso é considerado um controle positivo, com biodisponibilidade igual a 100% (CORRÊA et al., 2020). Sabe-se que este composto é caracterizado pela solubilidade em água e por ser absorvível pelo organismo (BUENO; MARCHINI; OLIVEIRA, 2011). Portanto, pode-se ponderar sobre a boa biodisponibilidade de ferro dos feijões biofortificados. Também, através desse parâmetro, a dieta com feijão biofortificado Xiquexique pode ser considerada mais biodisponível em ferro do que a dieta composta pelo feijão convencional Pajeú.

Outra medida relativa à biodisponibilidade de ferro é a eficiência de regeneração da hemoglobina. Ela corresponde ao teor de ferro incorporado à hemoglobina, a partir do consumo das dietas de repleção. Com base na HRE, é possível calcular o valor biológico relativo, o qual indica a eficiência de utilização do ferro pelo organismo, em relação ao controle positivo (sulfato ferroso), considerado 100% (SANT'ANA, 2018).

Tanto para a medida de HRE quanto para a medida de RBV, o grupo que consumiu feijão Tumucumaque apresentou os melhores resultados, indicando sua alta biodisponibilidade em ferro. No geral, todos os feijões do estudo exibiram uma boa biodisponibilidade de ferro, tendo em vista que todos os RBV foram similares ou maiores que o RBV do Sulfato Ferroso, considerado 100% (Tabela 11).

Outro dado relevante é que, no presente trabalho, os valores de HRE e RBV do feijão Tumucumaque se destacaram em relação à literatura científica, visto que esse feijão já fora avaliado por outro grupo de pesquisadores. Sant'Ana et al. (2019) encontraram valores de HRE e RBV, para esta cultivar, em torno de 50% e 82,

respectivamente. No trabalho de Antunes et al. (2019), com utilização da cultivar Aracê, a medida de biodisponibilidade de ferro apresentou valores maiores que os valores encontrados no atual estudo. Estes autores identificaram uma HRE em torno de 61% e um RBV em torno de 119, no entanto, o feijão convencional (BRS Nova Era) teve uma biodisponibilidade de ferro semelhante ao feijão biofortificado.

Essas diferenças entre os resultados dos estudos são possíveis, uma vez que as condições de cultivo podem interferir não apenas no teor de ferro de cada feijão, mas também na concentração de metabólitos secundários, como os taninos e os fitatos, presentes neles (BURATTO, 2012). Ambos os grupos de compostos impactam diretamente à biodisponibilidade de ferro.

No atual estudo, os resultados in vivo (modelo animal) corroboram com os in vitro (células Caco-2 e digestão gastrointestinal simulada), uma vez que ambos os ensaios demonstraram uma maior biodisponibilidade de ferro para os feijões biofortificados, especialmente para a cultivar Tumucumaque. Sabe-se que o estudo in vivo complementou o conhecimento adquirido pelo estudo in vitro, o qual era mais restrito à fase de absorção do ferro (DIAS et al., 2018). Para todos esses achados, o feijão convencional Pajeú exibiu resultados inferiores de biodisponibilidade, mesmo que a concentração de ferro não tenha sido diferente entre os grupos.

5.4.3. Biomarcadores bioquímicos e biomoleculares

A ferritina sérica, como biomarcador do *status* de ferro, reflete o estoque mineral de todo o organismo (DIAS, 2017). De maneira geral, os níveis encontrados supõem uma repleção pouco eficiente das reservas de ferro corporal, muito provavelmente em função do tempo reduzido de repleção. O grupo Aracê apresentou um valor maior que o Xiquexique e o Pajeú, sem diferença em relação aos grupos Tumucumaque e Sulfato Ferroso (Tabela 12). Este resultado está em consonância com a expressão gênica de ferritina, também mais alta nos grupos Aracê e Sulfato Ferroso (Figura 4).

Possivelmente, a baixa razão fitato:ferro do feijão Aracê facilitou a absorção e o armazenamento de ferro, na forma de ferritina (ANTUNES et al., 2019). Em consequência o ferro estava menos disponível para hematopoiese no grupo Aracê, como pode ser comprovado por seus resultados de HRE e de RBV. Nos grupos Pajeú e Xiquexique, os mais baixos valores séricos e de expressão gênica de

ferritina podem estar relacionados a uma maior mobilização do ferro hepático para outras funções fisiológicas, diferente do armazenamento (DIAS et al., 2015).

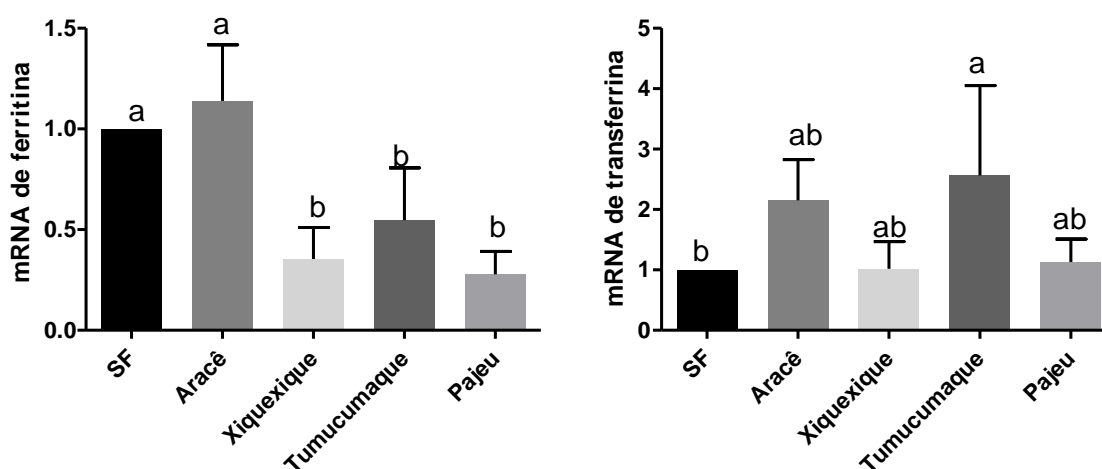
Em relação ao ferro sérico, seu uso de maneira isolada é pouco aplicado na prática clínica, visto que é uma medida passível de variações (CAMARGO et al., 2013). Por esta razão, ele não é um biomarcador utilizado para avaliação da deficiência de ferro em humanos, em nenhum dos três estágios (COSTA; PELUZIO, 2021). No presente estudo, o grupo Aracê teve o menor valor de ferro sérico, o que corrobora o alto valor de ferritina, uma vez que o ferro está estocado, reduz-se o valor de ferro sérico. O resultado do feijão Pajeú, que não diferiu do Aracê, pode indicar menor utilização do mineral neste feijão, se considerados os demais parâmetros avaliados (Tabela 12).

Tabela 12. Concentração de ferro, ferritina e transferrina no soro dos animais após fase de repleção.

Grupos	Ferro sérico ($\mu\text{g/dL}$)	Ferritina ($\mu\text{g/L}$)	Transferrina (mg/dL)
Sulfato Ferroso	$30,09 \pm 6,37^a$	$2,14 \pm 2,89^{ab}$	$105,75 \pm 17,57^b$
Aracê	$20,88 \pm 6,15^b$	$4,25 \pm 4,90^a$	$112,55 \pm 12,81^b$
Xiquexique	$30,64 \pm 5,73^a$	$0,15 \pm 0,43^b$	$114,75 \pm 11,87^{ab}$
Tumucumaque	$27,79 \pm 5,82^{ab}$	$0,90 \pm 1,89^{ab}$	$123,09 \pm 8,98^{ab}$
Pajeú	$22,87 \pm 3,38^{ab}$	$0,49 \pm 1,39^b$	$130,89 \pm 8,61^a$

Valores expressos em média \pm desvio padrão ($n = 8$). Letras diferentes na mesma coluna significa diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e *post-hoc* de Newman-Keuls.

Figura 4 - Expressão de mRNA de ferritina e transferrina no tecido hepático dos animais, após o período de repleção.

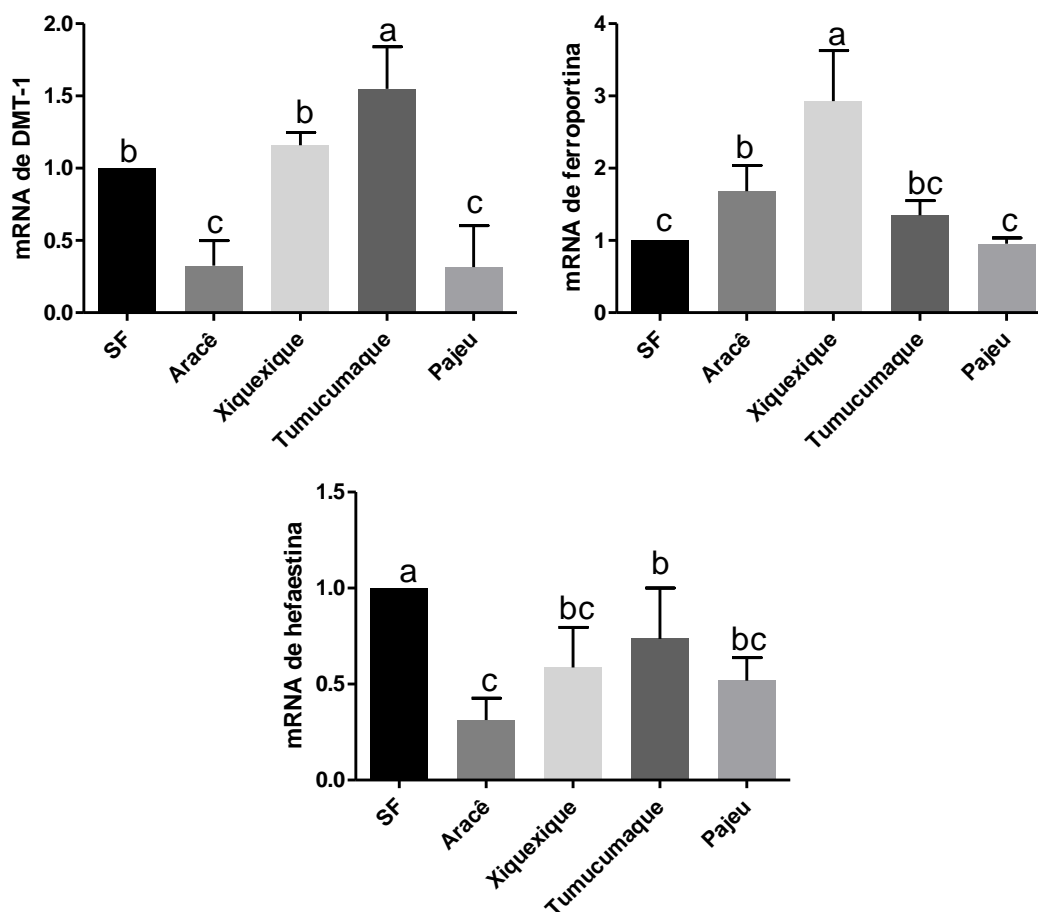


Valores expressos em média \pm desvio padrão ($n = 5$). Letras diferentes significa diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e *post-hoc* de Newman-Keuls. SF: Sulfato ferroso.

Os resultados de transferrina indicam uma reação para aumentar o transporte de ferro no organismo dos animais que consumiram o feijão Pajeú. Neste grupo, houve alta translação do gene de transferrina, aumentando sua concentração no soro, o que é uma resposta devido à menor acessibilidade de ferro nesta cultivar (Tabela 12 e Figura 4) (CORRÊA et al., 2020; SILVA et al., 2016). Tal fato está intrinsecamente associado a menor biodisponibilidade de ferro do feijão convencional; ou seja, apesar do teor de ferro ser semelhante aos demais grupos, nesta cultivar, o ferro estava menos disponível para ser utilizado.

A expressão de proteínas obtidas do tecido duodenal se relaciona mais diretamente com o processo absorptivo (Figura 5). A DMT-1 é responsável por mediar a captação do ferro pela membrana apical do enterócito e a ferroportina por exportar o ferro da célula intestinal para o plasma (COSTA; PELUZIO, 2021). Em ambos os casos, o feijão convencional Pajeú teve a menor expressão, o que pode ser associado a sua baixa utilização, em razão da quantidade de complexantes de minerais. No feijão Tumucumaque, a maior expressão de DMT-1 concorda com a maior HRE e indica maior absorção de ferro, mesmo que o consumo mineral desse grupo tenha sido o menor.

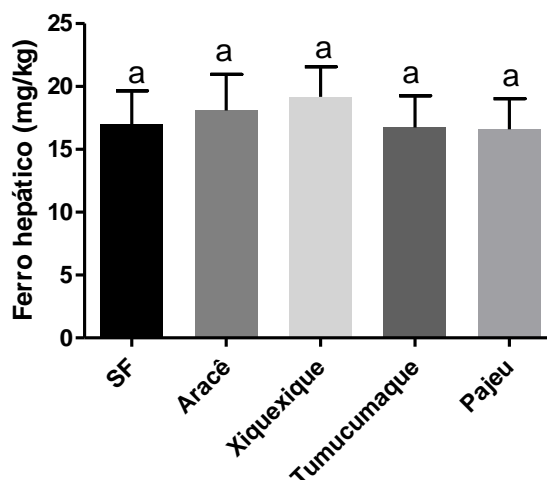
Figura 5 - Expressão de mRNA de DMT-1, ferroportina e hefaestina no tecido duodenal dos animais, após o período de repleção.



Valores expressos em média \pm desvio padrão (n = 5). Letras diferentes significa diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e *post-hoc* de Newman-Keuls. SF: Sulfato ferroso. DMT-1: proteína transportadora de metal divalente.

A expressão de hefaestina foi maior no grupo controle e menor no grupo Aracê. Este resultado está associado ao transporte de ferro pela corrente sanguínea após a saída do enterócito, pois essa proteína oxida o ferro, para que este possa se ligar ao seu transportador (transferrina) (COSTA; PELUZIO, 2021; DIAS et al., 2015). Por fim, as concentrações de ferro no tecido hepático foram semelhantes entre os grupos (Figura 6). O que indica que o consumo dos feijões biofortificados, durante este curto período de repleção, promoveu uma recuperação dos estoques de ferro, comparável ao consumo do sulfato ferroso.

Figura 6 - Concentração de ferro no fígado dos animais eutanasiados, após a fase de repleção.



Valores expressos em média \pm desvio padrão (n = 8). Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e *post-hoc* de Newman-Keuls. SF: Sulfato ferroso.

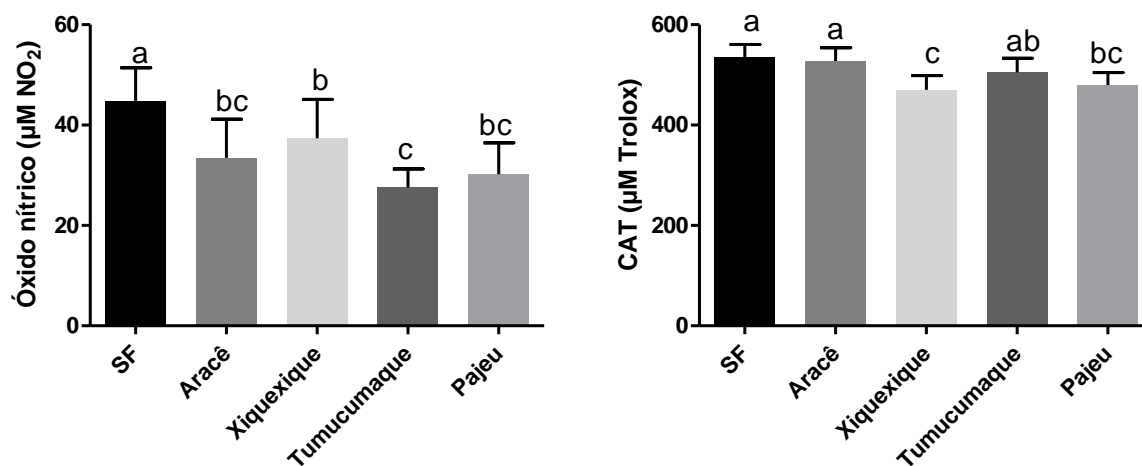
5.4.4. Marcadores de estresse oxidativo

O grupo controle (Sulfato Ferroso) apresentou maior valor de óxido nítrico hepático comparado aos grupos testes (Figura 7). O óxido nítrico é considerado um composto altamente reativo, pela presença de elétrons desemparelhados. Apesar de sua importância para processos fisiológicos, nos casos onde sua produção é desregulada/aumentada, a inflamação e o estresse oxidativo podem ocorrer, sendo danosos ao organismo (KRÓL; KEPINSKA, 2020).

Já com relação à capacidade antioxidante total, pode-se observar que os grupos Sulfato Ferroso, Tumucumaque e Aracê apresentaram os maiores valores. É possível que o elevado valor de CAT do grupo controle seja devido à rápida absorção desta fonte de ferro biodisponível, levando ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio. Em resposta, o organismo intensifica a atividade da superóxido dismutase, enzima com atividade antioxidante, promovendo uma elevação da capacidade antioxidante total (DIAS et al., 2015).

Salienta-se que os resultados da Figura 7 podem estar relacionados à composição nutricional dos feijões (JAYATHILAKE et al., 2018). Também, os resultados de ferritina e de transferrina indicam a ligação do ferro à proteína, característica essencial do mecanismo de defesa antioxidante do organismo humano (DIAS et al., 2015).

Figura 7 - Teor de óxido nítrico e capacidade antioxidante total do fígado dos animais, após o período de repleção.



Valores expressos em média \pm desvio padrão (n = 8). Letras diferentes significa diferença estatística ($p < 0,05$) pela ANOVA e *post-hoc* de Newman-Keuls. SF: Sulfato ferroso. CAT: Capacidade Antioxidante Total.

6. CONCLUSÃO

O feijão-caupi biofortificado, BRS Tumucumaque apresentou maior biodisponibilidade de ferro, em comparação ao feijão-caupi convencional BRS Pajeú. Esta superioridade foi detectada pela maior permanência de ferro após digestão simulada in vitro, maior produção de ferritina em células Caco-2 (in vitro) e maior eficiência de regeneração da hemoglobina em animais (in vivo). As demais cultivares biofortificadas, BRS Aracê e BRS Xiquexique, foram superiores à cultivar convencional nas medidas de bioacessibilidade de ferro in vitro, sem diferença em relação à biodisponibilidade in vivo.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os feijões biofortificados com ferro não atingiram a concentração mineral almejada para a biofortificação e não apresentaram maiores concentrações de ferro, comparado ao feijão convencional. No entanto, eles exibiram valores de bioacessibilidade e biodisponibilidade de ferro maiores do que o feijão convencional.

Esta superioridade foi demonstrada nos experimentos de manutenção de ferro após a digestão simulada, em células Caco-2 e no ensaio in vivo. O resultado é relacionado à composição nutricional dos feijões-caupi, uma vez que o feijão convencional Pajeú destacou-se pela predominância de complexantes de minerais em sua composição. Apesar de prejudicarem a absorção de ferro, esses compostos são conhecidos pelas propriedades antioxidantes, indicando potencialidades funcionais da cultivar convencional.

Portanto, os feijões-caupi biofortificados ganham evidência científica como bons carreadores de ferro biodisponível, o que reflete seu impacto social, científico e sustentável. Ressalta-se ainda o ótimo valor nutricional e o potencial funcional das cultivares, fruto da composição química, com fibras alimentares, proteínas e compostos fenólicos; reforçando o incentivo ao consumo de feijão. Estudos futuros são necessários para avaliar o perfil de compostos fenólicos, a fim de associar esta característica à biodisponibilidade de ferro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADJEI-FREMAH, S.; JACKAI, L. E.; WORKU, M. Analysis of phenolic content and antioxidant properties of selected cowpea varieties tested in bovine peripheral blood. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 10, n. 4, p. 235-245, 2015.
- AKOND, G. M.; GRAWFORD, H.; BERTHOLD, J.; TALUKDER, Z. I.; HOSSAIN, K. Minerals (Zn, Fe, Ca and Mg) and antinutrient (phytic acid) constituents in common bean. **American Journal of Food Technology**, v. 6, n. 3, p. 235-243, 2011.
- AL-NASEEM, A.; SALLAM, A.; CHOUDHURY, S.; THACHIL, J. Iron deficiency without anaemia: a diagnosis that matters. **Clinical Medicine**, v. 21, n. 2, p. 107-113, 2021.
- ANDERSSON, M.; KARUMBUNATHAN, V.; ZIMMERMANN, M. B. Global iodine status in 2011 and trends over the past decade. **The Journal of Nutrition**, v. 142, n. 4, p. 744-750, 2012.
- ANJOS BARROS, N. V. D.; ABREU, B. B. D.; SAMPAIO DA SILVA, D. T.; SOARES, A. K. D. O.; ROCHA, M. D. M.; REIS MOREIRA-ARAÚJO, R. S. D. Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Grains of Biofortified Cowpea Cultivars, Before and After Cooking. **Current Nutrition & Food Science**, v. 16, n. 1, p. 105–113, 2020.
- ANTUNES, P. T.; VAZ-TOSTES, M. G.; SANT'ANA, C. T.; FARIA, R. A.; TOLEDO, R. C. L.; COSTA, N. M. B. Bioavailability of Iron and the Influence of Vitamin a in Biofortified Foods. **Agronomy**, v. 9, n. 12, p. 777, 2019.
- AOAC - Association of Official Methods Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association Chemists**. 16th ed. Washington, D.C., 1998.
- AOAC - Association of Official Methods Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association Chemists**. 21th ed. Rockville, 2019.
- AWIKA, J. M.; DUODU, K. G. Bioactive polyphenols and peptides in cowpea (*Vigna unguiculata*) and their health promoting properties: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 686-697, 2017.
- BAILEY, R. L.; WEST JR, K. P.; BLACK, R. E. The epidemiology of global micronutrient deficiencies. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 66, n. Suppl. 2, p. 22-33, 2015.
- BASTOS, E. A. (coord.). **A cultura do feijão-caupi no Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte; Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Divisão de Análise de Risco de Pragas, 2016. 70 p.
- 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. 2, p. 67-79, 2011.

BIGONHA, S. M. **Qualidade proteica e biodisponibilidade de ferro e zinco em feijões biofortificados**. 2013. 103 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

BOUIS, H. E.; SALTZMAN, A. Improving nutrition through biofortification: a review of evidence from HarvestPlus, 2003 through 2016. **Global Food Security**, v. 12, p. 49-58, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 12 de 28 mar. 2008. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2008. Seção 1, p. 11-14.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher PNDS 2006: Dimensões do processo reprodutivo e da saúde da criança**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRODKORB, A.; EGGER, L.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; ASSUNÇÃO, R.; BALLANCE, S.; et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991-1014, 2019.

BUENO, L.; MARCHINI, J. S.; OLIVEIRA, J. E. D. Biodisponibilidade do ferro em formulações nutricionais. **Rev Bras Nutr Clin**, v. 26, n. 4, p. 276-80, 2011.

BURNS, R. E. Method for estimation of tannin in grain sorghum 1. **Agronomy Journal**, v. 63, n. 3, p. 511-512, 1971.

BURATTO, J. L. **Teores de minerais e proteínas em grãos de feijão e estimativas de parâmetros genéticos**. 2012. 148 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

CAMARGO, R. M. S.; ESPINOSA, M. M.; PEREIRA, S. F.; SCHIRMER, J. Prevalência de anemia e deficiência de ferro: relação com índice de massa corporal em gestantes do Centro-Oeste do Brasil. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 46, n. 2, p. 118-127, 2013.

CAMASCHELLA, C. Iron deficiency. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 133, n. 1, p. 30-39, 2019.

CAPPELLINI, M. D.; MUSALLAM, K. M.; TAHER, A. T. Iron deficiency anaemia revisited. **Journal of Internal Medicine**, v. 287, n. 2, p. 153-170, 2020.

CELESTINO, S. M. C. **Princípio de secagem de alimentos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2010. 51 p. (Documentos, 276).

CHEMIM, F. Cenário brasileiro do Feijão-caupi. **Instituto Brasileiro de Feijão e Pulses**, 2022. Disponível em: <<https://www.ibrafe.org/artigo/cenario-brasileiro-do-feijao-caupi>>. Acesso em: 19 de abril de 2023.

CORRÊA, S. R.; BRIGIDE, P.; VAZ-TOSTES, M. D. G.; COSTA, N. M. B. Cultivars of biofortified cowpea and sweet potato: Bioavailability of iron and interaction with

vitamin A in vivo and in vitro. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 3, p. 816-823, 2020.

COSTA, N. M. B.; PELUZIO, M. C. G. **Nutrição e Metabolismo Humano**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Rúbio, 2021. 448p.

DELIMONT, N. M.; HAUB, M. D.; LINDSHIELD, B. L. The impact of tannin consumption on iron bioavailability and status: A narrative review. **Current Developments in Nutrition**, v. 1, n. 2, p. 1-12, 2017.

DIAS, D. M.; CASTRO MOREIRA, M. E.; GOMES, M. J. C.; LOPES TOLEDO, R. C.; NUTTI, M. R.; PINHEIRO SANT'ANA, H. M.; MARTINO, H. S. D. Rice and bean targets for biofortification combined with high carotenoid content crops regulate transcriptional mechanisms increasing iron bioavailability. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9683-9696, 2015.

DIAS, D. M.; COSTA, N. M. B.; NUTTI, M. R.; TAKO, E.; MARTINO, H. S. D. Advantages and limitations of in vitro and in vivo methods of iron and zinc bioavailability evaluation in the assessment of biofortification program effectiveness. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 13, p. 2136-2146, 2018.

DIAS, G. C. **Associação do consumo alimentar com o status de ferro de mulheres saudáveis na idade reprodutiva**. 2017. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Catálogo de cultivares de feijão-caupi. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1354386/12356221/catalogo+caupi+3005/289c9228-6d9b-44d8-82db-0fb084633801>>. Acesso: 16/09/2022.

FAO; IFAD; UNICEF; WFP; WHO. **The state of food security and nutrition in the world 2020: transforming food systems for affordable healthy diets**. Food & Agriculture Org., 2020.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. de M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. da R.; RODRIGUES, E. V. **Feijão-caupi no Brasil: Produção, melhoramento genético e desafios**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Meio Norte), Teresina, 2011.

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

GANNON, B. M.; GLAHN, R. P.; MEHTA, S. Iron Bioavailability from Multiple Biofortified Foods Using an In Vitro Digestion, Caco-2 Assay for Optimizing a Cyclical Menu for a Randomized Efficacy Trial. **Current Developments in Nutrition**, v. 5, n. 9, p. nzab111, 2021.

GARCIA, B. F.; BARROS, M.; ROCHA, T. S. Bioactive peptides from beans with the potential to decrease the risk of developing noncommunicable chronic

diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 12, p. 2003-2021, 2020.

GARCÍA-CASAS, V. E.; SEIQUER, I.; PARDO, Z.; HARO, A.; RECIO, I.; OLÍAS, R. Antioxidant Potential of the Sweet Whey-Based Beverage Colada after the Digestive Process and Relationships with the Lipid and Protein Fractions. **Antioxidants**, v. 11, n. 9, p. 1827, 2022.

GARCIA, S. S. **Estudo comparativo da bioacessibilidade em cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) biofortificadas**. 2018. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

GERMANO, R. M. A. **Disponibilidade de ferro na presença do b-caroteno e o efeito dos interferentes em combinações de alimentos**. 2002. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

GLAHN, R. P.; CHENG, Z.; WELCH, R. M.; GREGORIO, G. B. Comparison of iron bioavailability from 15 rice genotypes: studies using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3586-3591, 2002.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, p. 390-397, 2008.

GROTTO, H. Z. W. Fisiologia e metabolismo do ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 08-17, 2010.

GUIMARÃES, J. S. **Alterações do metabolismo do ferro nas talassemias**. 2015. 126 f. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

GULEC, S.; ANDERSON, G. J.; COLLINS, J. F. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 307, n. 4, p. G397-G409, 2014.

GUPTA, R. K.; GANGOLIYA, S. S.; SINGH, N. K. Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 676-684, 2015.

HONAISSER, T. C. **Comparação de perfil proteico de grãos de quatro cultivares de Feijão-Caupi (*Vigna unguiculata*) e avaliação de sinergismo e bioacessibilidade fenólica durante codigestão in vitro com suco de laranja (*Citrus sinensis*)**. 2022. 96 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

JACOB FILHO, W.; LIMA, C. C.; PAUNKSNIS, M. R. R.; SILVA, A. A.; PERILHÃO, M. S.; CALDEIRA, M. et al. Reference database of hematological parameters for growing and aging rats. **The Aging Male**, v. 21, n. 2, p. 145-148, 2018.

JAYATHILAKE, C.; VISVANATHAN, R.; DEEN, A.; BANGAMUWAGE, R.; JAYAWARDANA, B. C.; NAMMI, S.; LIYANAGE, R. Cowpea: an overview on its nutritional facts and health benefits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 13, p. 4793-4806, 2018.

JHA, A. B.; WARKENTIN, T. D. Biofortification of pulse crops: Status and future perspectives. **Plants**, v. 9, n. 1, p. 73, 2020.

KAPRAVELOU, G.; MARTÍNEZ, R.; ANDRADE, A. M.; CHAVES, C. L.; LÓPEZ-JURADO, M.; ARANDA, P.; ARREBOLA, F.; CAÑIZARES, F. J.; GALISTEO, M.; PORRES, J. M. Improvement of the antioxidant and hypolipidaemic effects of cowpea flours (*Vigna unguiculata*) by fermentation: results of in vitro and in vivo experiments. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 6, p. 1207-1216, 2015.

KHAN, A. R.; ALAM, S.; ALI, S.; BIBI, S.; KHALIL, I. A. Dietary fiber profile of food legumes. **Sarhad Journal of Agriculture**, v. 23, n. 3, p. 763, 2007.

KHANG, D. T.; DUNG, T. N.; ELZAAWELY, A. A.; XUAN, T. D. Phenolic profiles and antioxidant activity of germinated legumes. **Foods**, v. 5, n. 2, p. 27, 2016.

KRÓL, M.; KEPINSKA, M. Human nitric oxide Synthase — Its functions, polymorphisms, and inhibitors in the context of inflammation, diabetes and cardiovascular diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 56, 2020.

LA FRANO, M. R.; DE MOURA, F. F.; BOY, E.; LÖNNERDAL, B.; BURRI, B. J. Bioavailability of iron, zinc, and provitamin A carotenoids in biofortified staple crops. **Nutrition Reviews**, v. 72, n. 5, p. 289-307, 2014.

LIBERAL, Â.; PINELA, J.; VÍVAR-QUINTANA, A. M.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARROS, L. Fighting iron-deficiency anemia: innovations in food fortificants and biofortification strategies. **Foods**, v. 9, n. 12, p. 1871, 2020.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGENT, T. D. Analysis of relative gene expression Data using real time quantitative PCR and the 2^{-2DDCT} Method. **Methods**, p. 402-408, 2001.

LUNA, S. V.; POMPANO, L. M.; LUNG'AHU, M.; GAHUTU, J. B.; HAAS, J. D. Increased iron status during a feeding trial of iron-biofortified beans increases physical work efficiency in Rwandan women. **The Journal of Nutrition**, v. 150, n. 5, p. 1093-1099, 2020.

MACLEAN, W.; HARNLY, J.M.; CHEN, J.; CHEVASSUS-AGNES, S.; GILANI, G.; LIVESEY, G. et al. Food energy – Methods of analysis and conversion factors. In: **Food and Agriculture Organization of the United Nations Technical Workshop Report**. Beltsville, MD, USA: Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, 2003. p. 8-9.

MAHONEY, A. W.; VANORDEN, C. C.; HENDRICKS, D. G. Efficiency of converting food iron into hemoglobin by the anemic rat. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 17, n. 4, p. 223-230, 1974.

MATEMU, A.; NAKAMURA, S.; KATAYAMA, S. Health benefits of antioxidative peptides derived from legume proteins with a high amino acid score. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 316, 2021.

MEHTA, S.; HUEY, S. L.; GHUGRE, P. S.; POTDAR, R. D.; VENKATRAMANAN, S.; KRISHER, J. T. et al. A randomized trial of iron-and zinc-biofortified pearl millet-based complementary feeding in children aged 12 to 18 months living in urban slums. **Clinical Nutrition**, v. 41, n. 4, p. 937-947, 2022.

MOLOTO, M. R.; PHAN, A. D. T.; SHAI, J. L.; SULTANBAWA, Y.; SIVAKUMAR, D. Comparison of phenolic compounds, carotenoids, amino acid composition, in vitro antioxidant and anti-diabetic activities in the leaves of seven cowpea (*Vigna unguiculata*) cultivars. **Foods**, v. 9, n. 9, p. 1285, 2020.

MOREIRA-ARAÚJO, R. S. D. R.; SAMPAIO, G. R.; SOARES, R. A.; SILVA, C. P. D.; ARAÚJO, M. A. D. M.; ARÊAS, J. A. G. Identification and Quantification of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Cowpeas of Brs Xiquexique Cultivar. **Revista Caatinga**, v. 31, n. 1, p. 209–216, 2018.

MURRAY-KOLB, L. E.; WENGER, M. J.; SCOTT, S. P.; RHOTEN, S. E.; LUNG'AHU, M. G.; HAAS, J. D. Consumption of iron-biofortified beans positively affects cognitive performance in 18-to 27-year-old Rwandan female college students in an 18-week randomized controlled efficacy trial. **The Journal of Nutrition**, v. 147, n. 11, p. 2109-2117, 2017.

MUTHAYYA, S.; RAH, J. H.; SUGIMOTO, J. D.; ROOS, F. F.; KRAEMER, K.; BLACK, R. E. The global hidden hunger indices and maps: an advocacy tool for action. **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, p. e67860, 2013.

NOGUEIRA-DE-ALMEIDA, C. A.; UED, F. V.; CIAMPO, L. A. D.; MARTINEZ, E. Z.; FERRAZ, I. S.; CONTINI, A. A. et al. Prevalence of childhood anaemia in Brazil: still a serious health problem: a systematic review and meta-analysis. **Public health nutrition**, v. 24, n. 18, p. 6450-6465, 2021.

NUTTI, M. R. Biofortificação no Brasil. *In*: SEMINÁRIO FORMAÇÃO DE MULTIPLICADORES, 2010, Rio de Janeiro. **Anais eletrônicos** [...] Rio de Janeiro: Associação Nacional de Biossegurança, 2010. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/878430/1/2010281.pdf>>. Acesso: 23 set. 2022.

NUTTI, M. R. Fortificação. Portal Embrapa, 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/tecnologia-de-alimentos/qualidade/nutricional/fortificacao>>. Acesso: 13/06/2023.

PAIXÃO, M. V. S.; DE MELO, W. H. M. Disponibilidade de ferro em diferentes espécies de feijões cultivadas na região de Adustina-BA. **Revista Ifes Ciência**, v. 6, n. 2, p. 163-170, 2020.

PARMAR, N.; SINGH, N.; KAUR, A.; THAKUR, S. Comparison of color, anti-nutritional factors, minerals, phenolic profile and protein digestibility between hard-to-cook and easy-to-cook grains from different kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) accessions. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 4, p. 1023-1034, 2017.

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

PETRY, N.; EGLI, I.; GAHUTU, J. B.; TUGIRIMANA, P. L.; BOY, E.; HURRELL, R. Phytic acid concentration influences iron bioavailability from biofortified beans in Rwandese women with low iron status. **The Journal of Nutrition**, v. 144, n. 11, p. 1681-1687, 2014.

PINTO, J. V. **Propriedades físicas, químicas, nutricionais e tecnológicas de feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) de diferentes grupos de cor**. 2016. 167 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

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.

PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Bioavailability of micronutrients from plant foods: an update. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 10, p. 1608-1619, 2016.

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

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, J. R. G. C., AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**. v. 123, p.1939–195, 1993.

ROCHA, M. de M.; ALMEIDA, M. J. de O.; SILVA, K. J. D. e; NEVES, A. C. das. **BioFort: saúde na mesa do brasileiro: biofortificação [do] feijão-caupi**. Brasília, DF, 2014. 45 p.

ROUSSEAU, S.; KYOMUGASHO, C.; CELUS, M.; HENDRICKX, M. E.; GRAUWET, T. Barriers impairing mineral bioaccessibility and bioavailability in plant-based foods and the perspectives for food processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 5, p. 826-843, 2020.

RUEL, M. T.; ALDERMAN, H.; MATERNAL AND CHILD NUTRITION STUDY GROUP. Nutrition-sensitive interventions and programmes: how can they help to accelerate progress in improving maternal and child nutrition?. **The Lancet**, v. 382, n. 9891, p. 536-551, 2013.

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

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica:** determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 4 p. (Comunicado Técnico).

SANT'ANA, C. T.; ANTUNES, P. T.; REIS, T. C.; VÁZ-TOSTES, M. G.; MEIRA, E. F.; COSTA, N. M. B. Bioaccessibility and bioavailability of iron in biofortified germinated cowpea. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 14, p. 6287-6295, 2019.

SANT'ANA, C. T. **Características físico-químicas, bioacessibilidade e biodisponibilidade de ferro do feijão-caupi biofortificado germinado.** 2018. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2018.

SHAHEEN, R.; SRINIVASAN, K.; ANJUM, N. A.; UMAR, S. Ageing-induced changes in nutritional and anti-nutritional factors in cowpea (*Vigna unguiculata* L.). **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 4, p. 1757-1765, 2019.

SILVA, B. P.; SILVA MATYELKA, J. C.; CASTRO MOREIRA, M. E.; TOLEDO, R. C. L.; DELLA LUCIA, C. M.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M.; MARTINO, H. S. D. A high fat diet does not affect the iron bioavailability in Wistar rats fed with chia and increases gene expression of iron metabolism proteins. **Food & function**, v. 7, n. 12, p. 4861-4868, 2016.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: **Methods in Enzymology**. Academic press, 1999, p. 152–178.

TALSMA, E. F.; MELSE-BOONSTRA, A.; BROUWER, I. D. Acceptance and adoption of biofortified crops in low-and middle-income countries: a systematic review. **Nutrition Reviews**, v. 75, n. 10, p. 798-829, 2017.

TAKO, E.; BLAIR, M. W.; GLAHN, R. P. Biofortified red mottled beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in a maize and bean diet provide more bioavailable iron than standard red mottled beans: Studies in poultry (*Gallus gallus*) and an in vitro digestion/Caco-2 model. **Nutrition Journal**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2011.

TORRES, L. C. R. **Bioacessibilidade e influência de promotores e inibidores de ferro e zinco na mistura arroz/feijão.** 2018. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

VAZ-TOSTES, M. G.; VEREDIANO, T. A.; DE MEJIA, E. G.; COSTA, N. M. B. Evaluation of iron and zinc bioavailability of beans targeted for biofortification using in vitro and in vivo models and their effect on the nutritional status of preschool

children. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 4, p. 1326-1332, 2016.

XIONG, S.; YAO, X.; LI, A. Antioxidant properties of peptide from cowpea seed. **International Journal of Food Properties**, v. 16, n. 6, p. 1245-1256, 2013.

WHO – World Health Organization. **Malnutrition**. WHO. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition>>. Acesso em: 23 set. 2022 a.

WHO – World Health Organization. **Anaemia in women and children**. WHO. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/anaemia_in_women_and_children>. Acesso em: 23 set. 2022 b.

ZIA-UL-HAQ, M.; AHMAD, S.; AMAROWICZ, R.; FEO, V. D. Antioxidant activity of the extracts of some cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) cultivars commonly consumed in Pakistan. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2005-2017, 2013.

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais.



Universidade Federal
do Espírito Santo



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Biodisponibilidade de Ferro**", que visa o atendimento das aulas práticas das disciplinas "PCTA 1140 - Biodisponibilidade de Nutrientes - Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos" e "DFN 05474 - Nutrição Experimental - Curso de Graduação em Nutrição", registrada sob o n.º **013/2022**, sob a responsabilidade de **Neza Maria Brunoro Costa**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.167 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CAMPUS DE ALEGRE (CEUA-ALEGRE) do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes).

Vigência da autorização: **28/09/2022 a 28/08/2027**

Finalidade: **Ensino**

Espécie(s): **Ratos (*Ratus norvegicus*) Wistar**

Peso: **Variável**

Idade: **Recém-desmamados**

Sexo: **Machos**

Número de animais: **48**

Origem: **Biotério Central do CCS da UFES, Campus de Maruípe, Vitória, ES.**

Alegre-ES, 28/09/2022

Mashal Costa Leme - Coordenador da CEUA-ALEGRE

Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus de Alegre – CEUA-ALEGRE
Alto Universitário, s/n – Guararema – Alegre, ES, Brasil – CEP 29500-000 - Telefone: 028 3552 8900 – ceua.alegre@gmail.com – www.alegre.ufes.br

Documento assinado digitalmente conforme descrito no(s) Protocolo(s) de Assinatura constante(s) neste arquivo, de onde é possível verificar a autenticidade do mesmo.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
MARSHAL COSTA LEME - SIAPE 1819683
Departamento de Medicina Veterinária - DMV/CCAE
Em 29/09/2022 às 09:21

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/571534?tipoArquivo=0>

Documento assinado digitalmente conforme descrito no(s) Protocolo(s) de Assinatura constante(s) neste arquivo, de onde é possível verificar a autenticidade do mesmo.