



ELENICE CARLA EMÍDIO CUNHA

“DETERMINAÇÃO DE FOLATOS EM FEIJÃO”

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ELENICE CARLA EMÍDIO CUNHA

“DETERMINAÇÃO DE FOLATOS EM FEIJÃO”

Orientadora: Prof^a. Dra. Helena Teixeira Godoy

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós
Graduação em Ciência de Alimento da Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título
de Mestra em Ciência de Alimentos

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ELENICE CARLA EMÍDIO CUNHA
E ORIENTADA PELA PROFA.DRA.HELENA TEIXIERA GODOY

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2013

FICHA CATALOGRÁFICA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
MÁRCIA REGINA GARBELINI SEVILLANO - CRB 8/3647

Cunha, Elenice Carla Emídio, 1986-
C914d Determinação de folatos em feijão / Elenice Carla Emídio
Cunha. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Helena Teixeira Godoy.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Feijão. 2. Folatos 3. Hidrólise enzimática 4. Cromatografia
líquida de alta eficiência. I. Godoy, Helena Teixeira, 1957 -. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Determination of folate in beans

Palavras-chave em inglês:

Beans

Folates

Enzymatic hydrolysis

High performance liquid chromatography

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Helena Teixeira Godoy [Orientador]

Juliana Azevedo Lima Pallone

Elede Martins Elias

Data de defesa: 06-09-2013

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Banca Examinadora

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
Orientadora

Profa. Dra. Juliana Azevedo Lima Pallone
Membro Titular
FEA – UNICAMP

Dra. Elede Martins Elias
Membro Titular
SFDK Laboratório de Análise de Produtos LTDA

Dra. Adriana Dillenburg Meinhart
Membro Suplente
FEA – UNICAMP

Dra. Ana Cecília Poloni Ribka
Membro Suplente
Embrapa Semiárido

Dedico esta dissertação

A minha mãe Maria Célia Emídio Cunha,
mestra maior que tive em toda a minha formação.

Ao meu pai, João e aos meus irmãos,
Elizângela, Elaine e Éder por todo apoio, incentivo e
compreensão em muitas das minhas ausências.

Ao Jeffinho, que chegou a tempo de acompanhar tudo,
trazendo força e alegria para os momentos mais difíceis.

Feijão Maravilha

Dez entre dez brasileiros preferem feijão
esse sabor bem Brasil
verdadeiro fator de união da família
esse sabor de aventura
famoso Pretão Maravilha
faz mais feliz a mamãe, o papai
o filhinho e a filha

Dez entre dez brasileiros elegem feijão!
Puro, com pão, com arroz
com farinha ou macararrão
macarrão, macarrão!

E nessas horas que esquecem dos seus preconceitos
gritam que esse crioulo
é um velho amigo do peito

Feijão tem gosto de festa
é melhor e mal não faz
ontem, hoje, sempre
feijão, feijão, feijão
o preto que satisfaz!...

(As Frenéticas)

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo agradeço a Deus, pelo dom da vida, pela sabedoria e por guiar meu caminho nos momentos de mais dificuldade.

Aos meus pais João e Maria Célia, que me ensinaram a buscar meus ideais, superar os obstáculos e pelo auxílio nos momentos mais importantes.

Aos meus irmãos Elizângela, Elaine e Éder pelo carinho e incentivo, e aos meus sobrinhos Letícia, Murilo, Maria Eduarda e Álvaro pela alegria e leveza de ser criança!

Ao Jeffinho, uma pessoa simples, admirável e maravilhosa, que me deu amor, carinho, e sempre acreditou em mim. Você foi meu alicerce!

Ao apoio de toda a família, tios, tias, primos e primas, e a vó Margarida que me deu refúgio na sua casa sempre que eu precisei fugir.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de alimentos e em especial ao Laboratório de Análises de alimentos pela oportunidade do desenvolvimento do meu projeto.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

A profa. Helena por me acolher de braços abertos, por sua orientação, ensinamentos, atenção, pelos exemplos e por ser tão humana e especial!

Aos membros da banca examinadora, pelas observações e sugestões que muito contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Aos amigos de laboratório Wellington, Dani Neves, Thais, Maria Rosa, Polly, Danilo, Janclei, Mateus, Dani Bio, Milene, Adriana, enfim, a todos... pela amizade,

pedidos de ajuda, momentos de descontração... Em especial a Tayse, que teve toda paciência para me ensinar a operar o HPLC, e por pensar junto comigo várias e várias vezes!

Ao seu Adalto pelo empréstimo do fogão para cozinhar os feijões (cuidado com a panela de pressão menina!). E à Bruna, por gentilmente ceder a centrífuga para não atrasar os experimentos.

Às técnicas Renata e Marcela pela ajuda na execução do trabalho e pelos momentos de descontração. E ao seu Dirceu, pela ajuda na limpeza das vidrarias e por aguentar tanto cheiro ruim!

À república “A Ilha”, a família que escolhi ter! Obrigada a todos que por aqui passaram, pelo prazer da convivência e de poder dividir esses dois anos, especialmente à Mária, Elisa, Taísa e Ana Carolina, pelas conversas, conselhos, ajudas, almoços, aniversários, pela hora do “cafezim”... Meninas, sem vocês seria mais difícil!

Aos amigos de infância, aos amigos de Coluni que encontrei em Campinas, aos amigos de graduação, e ao casal de amigos de me acolheu no início de tudo, Bianca e Daniel, vocês foram essenciais na conquista desse sonho.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho e que deixaram essa trajetória mais leve...

MUITO OBRIGADA!

ÍNDICE

RESUMO GERAL	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3

FEIJÕES – FOLATOS: UMA REVISÃO.

RESUMO.....	5
ABSTRACT	6
1. FEIJÃO.....	7
1.1. Histórico	7
1.2. Fisiologia e Classificação.....	7
1.3. Produção e Consumo	9
1.4. Qualidade Nutricional.....	10
2. FOLATOS.....	11
2.1. Definição, Estrutura Química e Biossíntese.....	11
2.2. Importância dos Folatos.....	13
2.3. Digestão, Absorção, Transporte e Metabolismo	14
2.4. Biodisponibilidade e Estabilidade	15
2.5. Necessidades Nutricionais.....	16
2.6. Fontes.....	17
2.7. Deficiência de Folatos.....	18
2.8. Toxicidade	19
3. EXTRAÇÃO DE FOLATOS EM ALIMENTOS	19
3.1. Extração Tri-enzimática	21
4. MÉTODOS DE ANÁLISE	22
4.1. Métodos Biológicos.....	23
4.2. Métodos Químicos	23
4.3. Métodos Microbiológicos	23
4.4. Métodos Imunológicos	24

4.5. Métodos Cromatográficos	24
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

ESTUDO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO NA ANÁLISE DE FOLATOS EM FEIJÃO CARIOCA (*Phaseolus vulgaris* L.): COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS.

RESUMO	33
ABSTRACT	34
1. Introdução	35
2. Materiais e Métodos	36
2.1. Amostra	36
2.2. Reagentes	37
2.3. Extração e Hidrólise da Amostra	38
2.3.1. Tratamento tri-enzimático	39
2.3.2. Tratamento di-enzimático	39
2.3.3. Tratamento mono-enzimático	39
2.3.4. Extração sem hidrólise enzimática	40
2.4. Análise de Folatos por CLAE	40
2.5. Avaliação do método	41
2.5.1. Repetibilidade	41
2.5.2. Limite de detecção e quantificação	42
2.5.3. Curva de calibração	42
2.6. Análise Estatística	42
3. Resultados e Discussão	42
4. Conclusões	47
5. Referências Bibliográficas	48

ANÁLISE DE FOLATOS EM DIFERENTES VARIEDADES DE FEIJÕES UTILIZANDO TRATAMENTO TRI-ENZIMÁTICO.

RESUMO	51
--------------	----

ABSTRACT	52
1. Introdução	53
2. Materiais e Métodos	54
2.1. Amostra	54
2.2. Determinação de umidade	55
2.3. Reagentes	55
2.4. Extração e Hidrólise da Amostra	56
2.5. Condições Cromatográficas.....	57
3. Análise Estatística	58
4. Resultados e Discussão	58
5. Conclusões.....	63
6. Referências Bibliográficas.....	63
 CONCLUSÕES GERAIS.....	 65

RESUMO GERAL

No Brasil, o feijão obteve ampla difusão cultural e atualmente o país é considerado o maior produtor e consumidor do grão. Essa leguminosa é citada internacionalmente como uma fonte de folatos, um grupo de vitaminas pertencentes ao complexo B. Entretanto, é quase inexistente o levantamento de dados sobre o teor de folatos em feijões brasileiros. Os folatos participam de dois processos biológicos importantes: o ciclo de metilação, que consiste na transferência de carbonos e a biossíntese do DNA, fundamental para a manutenção das células. Sua deficiência está relacionada a problemas na formação do tubo neural em fetos, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. Deste modo, torna-se necessário um método eficiente para detectar e quantificar os folatos presentes nas diferentes variedades de feijão consumidas no país. O objetivo do trabalho foi determinar o teor de folatos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando diferentes métodos de hidrólise enzimática, além de aplicar o método em quatro variedades de feijão comum (carioca, preto, vermelho e branco) e uma variedade de feijão de corda, avaliando o efeito do cozimento sobre os folatos presentes. Em comparação com os outros tratamentos, apenas o tratamento tri-enzimático foi mais eficiente na identificação e quantificação dos folatos. Nos feijões, foram detectados somente o tetraidrofolato (THF) e o 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF). Os folatos foram separados utilizando uma coluna C_{18} como fase estacionária, solução acidificada com ácido acético/acetonitrila como fase móvel, e detectados por fluorescência (λ_{exc} . 290 nm e λ_{emis} 360 nm). Os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, 0,9 ng/mL e 5,4 ng/mL para o THF, e 0,7 ng/mL e 4,2 ng/mL para o 5-MTHF. O método apresentou linearidade na faixa de trabalho, além de repetitividade e reprodutibilidade. Nos feijões crus o teor de THF variou de 20,3 a 1484 $\mu\text{g}/100\text{g}$ e o teor de 5-MTHF variou de não determinado a 60 $\mu\text{g}/100\text{g}$. Já nos feijões cozidos, que foram processados de acordo com a recomendação dos fabricantes, o teor de THF variou de 15,3 a 1207 $\mu\text{g}/100\text{g}$, e de 5-MTHF variou de não determinado a 31,3 $\mu\text{g}/100\text{g}$. Observou-se que as perdas por processamento foram significativas e diferentes entre as variedades de feijões, sendo o 5-MTHF o

composto mais susceptível. Além disso, as perdas foram ainda maiores quando o feijão foi submetido ao remolho antes do cozimento, como no feijão branco. No feijão de corda foram encontrados os maiores teores de folatos, embora tenha sido encontrado apenas o THF. Houve diferenças significativas entre os três lotes de cada variedade, que pode ser devido à diversidade das condições de cultivo e variação de genótipos do feijão. Os dados mostram que o feijão brasileiro é uma boa fonte de folatos presentes na dieta.

Palavras-chave: Feijão, folatos, hidrólise enzimática, Cromatografia Líquida de alta eficiência, dieta.

ABSTRACT

The beans have been widespread used as a traditional food in Brazil and nowadays the country is the largest producer and consumer of this grain. This legume is referred internationally as a source of folates, which belong to the group of vitamins B complex. However, the data about folates from Brazilian beans are almost nonexistent. Folates take part in two important biological processes: the methylation cycle, that is the transfer of carbon, and the biosynthesis of the DNA, essential for cell maintenance. The folates deficiency is related to problems in neural tube formation in fetuses, cardiovascular disease and some cancers. Thus, it becomes necessary to develop an efficient method for detecting and quantifying folate present in different varieties of beans consumed in Brazil. The aim of this study was to determine the content of folates by high performance liquid chromatography (HPLC), using different enzymatic hydrolysis methods, and apply the method on four common bean (carioca, black, white and red) and a cowpea, as well as evaluating the effect of cooking process on the content of folates. The tri-enzyme treatment compared to other treatments was the most efficient for identification and quantification of the folates. Only the tetrahydrofolate (THF) and 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF) were detected in the beans. Folates were separated using a C₁₈ column as the stationary phase, acidified solution with acetic acid/acetonitrile as the mobile phase, and were detected by fluorescence (290 nm and λ_{exc} . λ_{emis} 360 nm). The limits of detection and quantification were, respectively, 0.9 ng/mL and 5.4 ng/mL for THF, and 0.7 ng/mL and 4.2 ng/mL for 5-MTHF. The method was linear in the working range including repeatability and reproducibility. In raw beans the THF content ranged from 20.3 to 1484 $\mu\text{g}/100\text{g}$ and the amount of 5-MTHF ranged from 60 $\mu\text{g}/100\text{g}$ to not determined. Whereas for the cooked beans, which were cooked according to the manufacturer's recommendations, the content of THF ranged from 15.3 to 1207 $\mu\text{g}/100\text{g}$ and the amount of 5-MTHF ranged from 31.3 $\mu\text{g}/100\text{g}$ to not determined. It was observed that the losses due the process were significant between the different varieties of beans, were the 5-MTHF compound was more susceptible to degradation. Furthermore, the losses were even greater when the beans were subjected to

soaking before cooking, as in white beans. In cowpea were found the highest levels of folates, although it has been found only THF. There were significant differences among the three batches of each variety, which may be due to the different growing conditions and variation in the bean genotypes. The data show that the Brazilian beans are a good source of folate present in the diet.

Keywords: Beans, folates, enzymatic hydrolysis, High performance liquid chromatography, diet.

INTRODUÇÃO GERAL

O ácido fólico (2-amino-4-hidroxi-6-metilenoaminobenzol-L-glutâmico), também é conhecido como ácido pteroilglutâmico, vitamina Bc, vitamina B₉ e vitamina M. Está naturalmente presente em alimentos, geralmente, na forma reduzida, como derivados de poliglutamatos, com 3 a 11 resíduos de ácido glutâmico, conhecidos como folatos (BALL, 2006; JOHANSSON et al., 2008). Folato é um termo geral que se refere a compostos não só estruturalmente, mas também com atividade semelhante a do ácido fólico (KEAGY, 1985; BRODY, 1991).

Os folatos estão envolvidos em dois processos biológicos importantes: o ciclo de metilação, que consiste na transferência de carbonos e a biossíntese do DNA, fundamental para a manutenção das células (SCOTT et al., 2000; TRUMBO, 2003), sendo a baixa ingestão apontada como possível causa de doenças graves que atingem o homem, como as doenças cardíacas, alguns tipos de câncer e as malformações congênitas (GREGORY, 1989; AUSTIN et al., 2003; ANDERSON et al., 2004).

Dessa forma, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da resolução nº 344 de 13/12/2002, reconheceu a importância dos folatos e obrigou o enriquecimento de farinhas de trigo e milho com ácido fólico (BRASIL, 2002). Recentemente, pesquisadores têm estudado outra opção para aumentar os níveis de folatos nos alimentos através de engenharia genética ou técnicas de reprodução em plantas (BEKAERT et al., 2008).

A maioria dos alimentos consumidos pela população contém folatos, sendo as principais fontes os vegetais folhosos, carnes, fígados, rins, frutas, cereais, leveduras e leguminosas (BRODY, 1991; LIMA-PALLONE et al., 2008). Entre as leguminosas, o feijão, que é um alimento barato, acessível, e está presente diariamente na mesa dos brasileiros, destaca-se como uma importante fonte dessa vitamina. Porém, informações sobre o teor de folato em feijão ainda são escassas, especialmente quando se consideram as diferentes variedades, condições de cultivo, tipos de solo e processamento antes do consumo (HEFNI et al., 2010).

No entanto, a confiabilidade dos resultados depende do uso de metodologias apropriadas para esse fim. Para a determinação de folatos são empregadas metodologias de hidrólise enzimática, com o uso de enzimas conjugases, que promovem a quebra das cadeias de folatos poliglutâmicos em folatos diglutâmicos ou monoglutâmicos (SHRESTHA et al., 2000). Além das conjugases, as enzimas α -amilase e protease são usadas para aumentar a eficiência de extração, por promoverem a liberação dos folatos presos às matrizes alimentares constituídas de carboidratos e proteínas (JOHNSTON et al., 2002). Contudo, a etapa de hidrólise ainda é bastante crítica e deve ser avaliada para cada tipo de alimento.

Para a detecção dos folatos, uma técnica amplamente usada é cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência, que fornece a melhor resolução na separação das diversas formas bioativas presentes nos alimentos. Além de ser altamente sensível, rápida e exata (ARCOT e SHRESTHA, 2005).

Assim, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o emprego da hidrólise enzimática e da técnica de CLAE na determinação de folatos em feijões brasileiros.

Objetivos Específicos:

- Avaliar a influência da hidrólise tri-, di- e mono-enzimática na determinação de folatos nos feijões;
- Adaptar metodologia por CLAE para a determinação de folatos;
- Avaliar o teor de folatos em quatro variedades de feijão comum e uma variedade de feijão de corda;
- Obter dados sobre a perda de folatos durante o cozimento dos feijões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J. L.; JENSEN, K. R.; CARLQUIST, J. F.; BAIR, T. L.; HORNE, B. D.; MUHLESTEIN, J. B. Effect of folic acid fortification of food on homocysteine-related mortality. **The Am. J. of Med.**, v. 116, p. 158 – 164, 2004.
- ARCOT, J.; SHRESTHA, J. Folate: methods of analysis. **Trends Food Sci Technol**, v. 16, p. 253–266, 2005.
- AUSTIN, R. C.; KONING, A. B. L.; WERSTUCK, G. H.; ZHOU, J. Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. **Clin. Biochem.**, v. 36, p. 431 – 441, 2003.
- BALL, G. F. M. **Vitamins in food: analysis, bioavailability and stability**. Boca Raton: CRC Taylor & Francis Group. 2006. 785 p.
- BEKAERT, S.; STOROZHENKO, S.; MEHRSHAHI, P.; BENNETT, M. J.; LAMBERT W.; GREGORY III, J. F.; SCHUBERT, K.; HUGENHOLTZ, J.; VAN DER STRAETEN D.; HANSON, A. D. Folate biofortification in food plants. **Trends Plant Sci**, v.13, p. 28-35, 2008.
- BRASIL. Resolução – RDC nº344, de 13 de dezembro de 2002. Regulamento Técnico para Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 de dezembro de 2002.
- BRODY, T. Folic Acid In: Machlin, L. J. **Handbook of vitamins**. 2 ed. New York: Marcel Decker, 1991.
- GREGORY, J. F. III. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability and bioavailability of dietary folates. **Advanced Food and Nutritional Research**, v. 33, p. 1-101, 1989.
- HEFNI, M.; VERONICA, O.; MOHAMED, T.; CORNELIA, W. Folate content in foods commonly consumed in Egypt. **J. Food Chem**, v. 121, p. 540-545, 2010.
- JOHANSSON, M.; FURUHAGEN, C.; FRALICH W.; JAGERSTAD, M. Folate content in frozen vegetarian ready meals and folate retention after different reheating methods. **Food Sci. Tech**, v. 41, p. 528-536, 2008.
- JOHNSTON, K. E.; LOFGREN, P. A.; TAMURA, T. Folate concentrations of fast foods measured by trienzyme extraction method. **Food Research International**, v. 35, p. 565–569, 2002
- KEAGY, P. M. **Folacin I: Methods of vitamin assay**, 4ed, New York: John Wiley.
- LIMA-PALLONE, J. A.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Folatos em brócolis convencional e orgânico e perdas no processo de cocção em água. **Quim. Nova**, v. 31, n. 3, p. 530-535, 2008.
- SCOTT, J.; RÉBEILLE, F.; FLETCHER, J. Review: Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **J. Sci. Food Agric.**, v. 80, p. 795-824, 2000.
- SHRESTHA, A. K.; ARCOT, J.; PATERSON, J. Folate assay of foods by traditional and tri-enzyme treatments using cryoprotected *Lactobacillus casei*. **Food Chemistry**, v. 71, p. 545–552, 2000.
- TRUMBO, P.R. Dietary Reference Intakes: Revised nutritional equivalents for folate, vitamin e and provitamin a carotenoids. **J. Food Comp. Anal.**, v.16, p. 379-382, 2003.

FEIJÕES – FOLATOS: UMA REVISÃO.

RESUMO

Atualmente, sabe-se que os folatos, termo geral que se refere a compostos não só estruturalmente mas também com atividade semelhante a do ácido fólico, estão envolvidos em inúmeras reações metabólicas e são extremamente importantes para a manutenção da saúde. A carência da vitamina vem sendo relacionada a uma série de doenças graves como a anemia megaloblástica, alguns tipos de câncer, problemas cardíacos, malformações congênitas, entre outras. Mesmo sendo um composto necessário em pequenas quantidades, parte da população apresenta deficiência de folatos, devido, principalmente, à baixa ingestão de alimentos fonte. Por isso, recomenda-se o aumento do consumo de alimentos ricos em folatos e, como tentativa de amenizar o quadro, o Brasil estabeleceu a obrigatoriedade da fortificação de farinhas de trigo e milho com ácido fólico, através da resolução nº 344 de 13/12/2002. O feijão, considerado um alimento fonte de folato, está presente diariamente na mesa dos brasileiros, que em média, consomem 17 kg de feijão por ano. Dessa forma, a necessidade de estudos sobre o teor de folatos em feijão é reforçada, por representar uma alternativa barata e acessível para atingir as necessidades diárias de ingestão de folatos pela população.

Palavras-chave: Deficiência, doenças graves, ingestão, fortificação, alimento fonte.

ABSTRACT

Nowadays it is known that folates, general term referring to compounds not only structurally, but also with similar activity to the folic acid, are involved in numerous metabolic reactions and are extremely important for health maintenance. The lack of this vitamin has been linked to a multiple diseases such as megaloblastic anemia, cancer, heart problems and birth defects, among others. In spite of being a compound required in small amounts, the population has folate deficiency, mainly due to the low intake of foods that are source of this compound. Therefore, it is recommended to increase the consumption of foods rich in folate and in order to improve this, Brazil established the mandatory fortification of wheat and corn flour with folic acid, through Resolution no. 344 of 13/12/2002. The beans, considered as a good source of folates, consumed daily by Brazilians, who consume, on average, 17 kg of beans per year. Therefore, the need for studies of the amount of folates in beans has enhanced, since its represent a cheap and affordable alternative to the daily requirement of folate intake by the population.

Keywords: Deficiency, serious diseases, intake, fortification, food source.

1. FEIJÃO

1.1. Histórico

Os feijões estão entre os alimentos mais antigos da história da humanidade e diversas hipóteses tentam explicar a origem e domesticação do feijoeiro (CFI, 2013). Dados, com base em padrões eletroforéticos da faseolina, sugerem a existência de três centros americanos primários de diversidade genética, tanto para as espécies silvestres, como as cultivadas. Dentre eles, a América Central (sudoeste dos Estados Unidos, Panamá, México e Guatemala); sul dos Andes (desde o norte do Peru até o noroeste da Argentina); e norte dos Andes (Colômbia e Venezuela até o norte do Peru). Além destes, foram identificados outros centros secundários na Europa, Ásia e África, onde foram introduzidos genótipos americanos (GEPTS, 1998).

No Brasil, já no século XVI, as leguminosas faziam parte da alimentação dos índios. Além disso, o feijão é repetidamente citado como alimento de resistência, oferecido aos escravos africanos, e certamente o grande responsável pela sobrevivência nutricional da maioria dos brasileiros (OLIVEIRA, 2008; MACHADO, 2012).

Em 2012, de acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), o Brasil foi considerado um dos maiores produtores e consumidores mundiais de feijão. O mundo contemporâneo viu, entretanto, a rápida disseminação desse produto entre os países do hemisfério sul, que se transformaram em grandes produtores de matérias-primas para os países europeus e para os Estados Unidos.

1.2. Fisiologia e Classificação

Feijão é uma variedade de sementes do feijoeiro pertencente à família *Fabaceae*, chamado de leguminosa (SAMMOUR et al., 2007). Os feijões mais consumidos no mundo são do gênero *Phaseolus vulgaris*, chamados de feijões comuns (BROUGHTON et al., 2003). Existem diversidades genéticas tanto para as espécies silvestres como as cultivadas. Do gênero *Phaseolus*, existem

aproximadamente 55 espécies, das quais apenas cinco são cultivadas: *Phaseolus vulgaris*, o feijão comum; *Phaseolus lunatus*, o feijão de lima; *Phaseolus coccineus*, o feijão ayocote; *Phaseolus acutifolius*, o feijão tepari; e *Phaseolus polyanthus*, o feijão botil (PEDROSO, 2012).

O feijão anão (gênero *Phaseolus*), como tecnicamente é conhecido, é uma planta herbácea, trepadora ou não, levemente pubescente, de altura mediana, não se espalha pelo chão, e cujo ciclo de vida varia de 65 a 120 dias, dependendo da cultivar e das condições e época de plantio. As vagens são retas ou ligeiramente curvas, achatadas ou arredondadas, com bico curto ou curvado, em geral possuem de nove a doze centímetros de comprimento e contém de três a sete sementes (VIEIRA et al., 2001). Apresenta boa adaptação em diversos climas o que permite seu cultivo durante todo ano, visando à produção de grãos alimentícios, destinado propriamente ao consumo (MENDES, 2005; MACHADO, 2012).

O cultivo pode ocorrer em três épocas distintas de semeadura: feijão de 1ª época ou “feijão das águas” ou cultivo de primavera-verão; feijão de 2ª época ou “feijão da seca” ou cultivo de verão-outono; e o feijão de 3ª época ou “feijão de inverno” ou cultivo de outono-inverno. Os cultivos do feijão de 1ª e 2ª épocas correspondem a mais de 80% da produção nacional (RICHETTI et al., 2011).

O gênero *Vigna unguiculata*, conhecido como feijão de corda, feijão caupi ou feijão macassar, representa cerca de 20% da produção nacional de feijão, e seu consumo concentra-se nas regiões semiáridas do Norte e Nordeste (PEDROSO, 2012). Quanto ao número de espécies, apresenta grande divergência, mas apenas sete são cultiváveis, sendo as mais importantes: *Vigna unguiculata*, o feijão de corda; *Vigna angularis*, o feijão adzuki; *Vigna radiata*, o feijão mungo-verde; e *Vigna umbellata*, o feijão arroz (BORÉM e CARNEIRO, 2006).

O feijão de corda possui ciclo de vida de dois a oito meses (dependendo do ambiente), maturação desuniforme e temperatura mais adequada de desenvolvimento na faixa de 20 a 35° C (VIEIRA et al., 2001).

Em relação à qualidade, o feijão consumido no país segue as regras normatizadas pela Classificação Vegetal do Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento (BRASIL, 2000), que estipula a padronização de qualidade e identidade dos grãos.

A padronização da classificação estabelece divisões na ordem das características intrínsecas, segundo a espécie, coloração da película e qualidade. Normalmente são utilizados grupos, subgrupos e classes. Os grupos são as espécies ou gêneros, por exemplo, *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata*. Os subgrupos são as cultivares da espécie, *Phaseolus vulgaris* L. e *Vigna unguiculata* Walp. As classes ou tipos são utilizados para conotação do tamanho ou cor, por exemplo, feijão preto, cores e misturado (NETO, 2004).

1.3. Produção e Consumo

O feijão tem uma ampla variedade de espécies, no entanto, tem pouca importância comercial em termos mundiais, devido ao baixo consumo em países de primeiro mundo. Os principais países produtores são também grandes consumidores, não havendo excedente exportável, razão pela qual o comércio internacional é tão restrito (PEDROSO, 2012). De acordo com a CONAB (2012), o Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão, seguido pela Índia, China e México.

O consumo do feijão, alimento tradicional na mesa dos brasileiros é, em média, 17,6 kg/hab/ano (IBGE, 2013). O cultivo é realizado por pequenos e grandes produtores em todo país, sendo os principais estados produtores Paraná, Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Bahia, que respondem por mais de 65% da produção nacional (BORÉM e CARNEIRO, 2006). Na safra 2012, a produção brasileira foi de 2,8 milhões de toneladas de feijão, em uma área colhida de 2,7 milhões de hectares, com rendimento médio de 1.030 kg/hab (CONAB, 2013).

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em parceria com o Ministério da Saúde, realizou entre os anos de 2008-2009 a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), que investiga informações sobre consumo, despesas e recebimentos das famílias brasileiras. Os dados indicaram um consumo médio per capita de 182,9 g de feijão por dia.

O feijão sempre fez parte da dieta dos brasileiros, porém, nos últimos anos houve uma redução constante do consumo per capita do produto. O tradicional “arroz com feijão” cedeu lugar ao consumo de alimentos industrializados, calóricos e com poucos nutrientes (IBGE, 2013). As possíveis causas da queda do consumo per capita de alimentos básicos da dieta estão relacionadas com a mudança de hábitos alimentares, além das fortes flutuações de oferta e preços e a demora para o preparo do produto (WANDER e FERREIRA, 2012).

1.4. Qualidade Nutricional

Os feijões são excelentes fontes de proteínas e fibras alimentares. Eles contêm altos níveis de carboidratos, baixos níveis de gordura e não contêm colesterol (DURANTI, 2006). Também são boas fontes de minerais, tais como cálcio, ferro e zinco, além de vitaminas do complexo B, principalmente os folatos (MESQUITA et al., 2007; HEFNI et al., 2010).

É um alimento que representa a principal fonte de proteínas das populações de baixa renda e constitui um produto de destacada importância nutricional, econômica e social (DURANTI, 2006). Entretanto, o valor nutritivo da proteína do feijão é baixo quando utilizado como única fonte protéica, mas quando combinado com arroz, por exemplo, torna-se bastante nutritivo, já que o feijão é pobre em aminoácidos sulfurados, e rico em lisina; e o arroz é pobre em lisina e relativamente rico em aminoácidos sulfurados (COSTA et al., 2006).

Porém, os grãos também possuem atributos indesejáveis, como o longo tempo de cocção, fatores anti-nutricionais e a presença de substâncias causadoras de flatulência (QUEIROZ, 2002). Os fatores anti-nutricionais, tais como inibidores de proteases, fitatos, taninos e fibras dietéticas, podem reduzir a digestibilidade das proteínas, carboidratos, minerais e também reduzir a atividade de enzimas digestivas, causando danos à mucosa do trato gastrointestinal ou exercer efeitos tóxicos sistêmicos que limitam a absorção desses nutrientes (DELFINO e CANNIATTI-BRAZACA, 2010). Já a flatulência é causada por oligossacarídeos, como a rafinose e estaquiose, e pela ausência de atividade da enzima α -galactosidase, que hidrolisa esses compostos. Assim, os

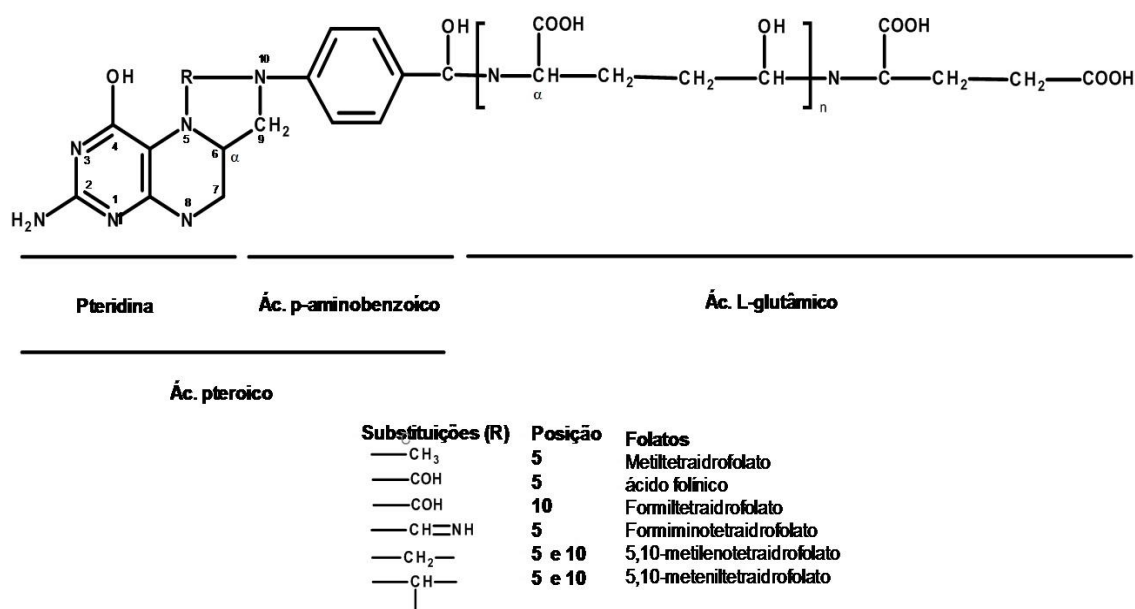
oligossacarídeos que não são absorvidos sofrem fermentação anaeróbica no intestino grosso, produzindo gases como o H_2 , CO_2 e CH_4 , que provocam sensação de desconforto abdominal e diarreia (COSTA, 2006).

2. FOLATOS

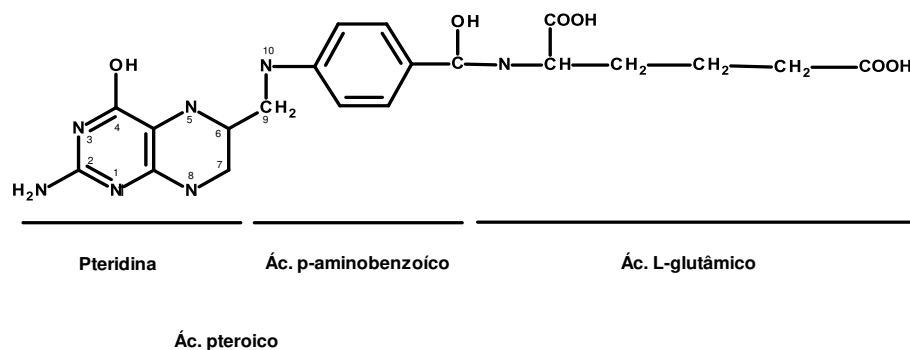
2.1. Definição, Estrutura Química e Biossíntese

Folato é o termo usado para se referir a uma família de vitaminas com atividade biológica relacionada, de ocorrência natural, principalmente na forma de poliglutamatos e ao ácido fólico, que é a forma sintética do folato, comumente usado para a fortificação de alimentos e suplementos nutricionais (ARCOT e SHRESTHA, 2005; IYER e TOMAR, 2009).

Quimicamente, os folatos são moléculas constituídas de um anel de pteridina bicíclica ligado a um para-aminobenzoato, que por sua vez está ligado ao L-glutamato (Figura 1a). No ácido fólico, o anel de pteridina está totalmente oxidado (Figura 1b).



(a)



(b)

Figura 1: Estrutura química dos folatos (a) e ácido fólico (b).

Fonte: Adaptado de Fokkema et al. (2005), Swiglo (2007) e Roure (2010).

Nos folatos, de ocorrência natural, o anel de pteridina é total ou parcialmente reduzido e pode ter ou não um átomo de carbono substituinte. Os substituintes podem existir nas posições N₅ ou N₁₀ (predominantemente como grupos metilo ou formilo), ou como unidades de metileno formando ponte entre N₅ e N₁₀. Os folatos totalmente reduzidos têm dois centros quirais: um carbono α na fração do ácido glutâmico e outro na posição seis do radical pteroil. O tamanho da cadeia lateral de um folato de ocorrência natural pode variar de três a onze resíduos de L-glutamato (BALL, 2006; JOHANSSON et al., 2008).

A síntese de folato nas plantas ocorre em três compartimentos sub-celulares: citosol, plastídios e mitocôndrias (Figura 2). A porção de pteridina é formada a partir de guanosina trifosfato (GTP) no citosol e o radical p-aminobenzóico (p-ABA) é formado nos plastídios. Pteridina e p-ABA são então transportados para a mitocôndria, onde são acoplados em conjunto, e glutaminados na forma reduzida para produzir tetraidrofolato (THF) (EUDÉS et al., 2008). Uma cadeia curta de glutamatos, unidas por ligações δ, é então adicionada nas mitocôndrias, plastídios ou citosol, produzindo os folatos poliglutâmicos (BEKAERT et al., 2008). Nas plantas, os folatos poliglutamados são os preferidos pelas enzimas dependentes de folato envolvidos no metabolismo. Já os transportadores de folatos preferem os monoglutamados, assim a glutaminação tende a favorecer a retenção dos folatos

no interior das células e compartimentos celulares. Dessa forma, são encontrados nos vacúolos, plastos, citoplasma e mitocôndrias (SAMUEL et al., 2003).

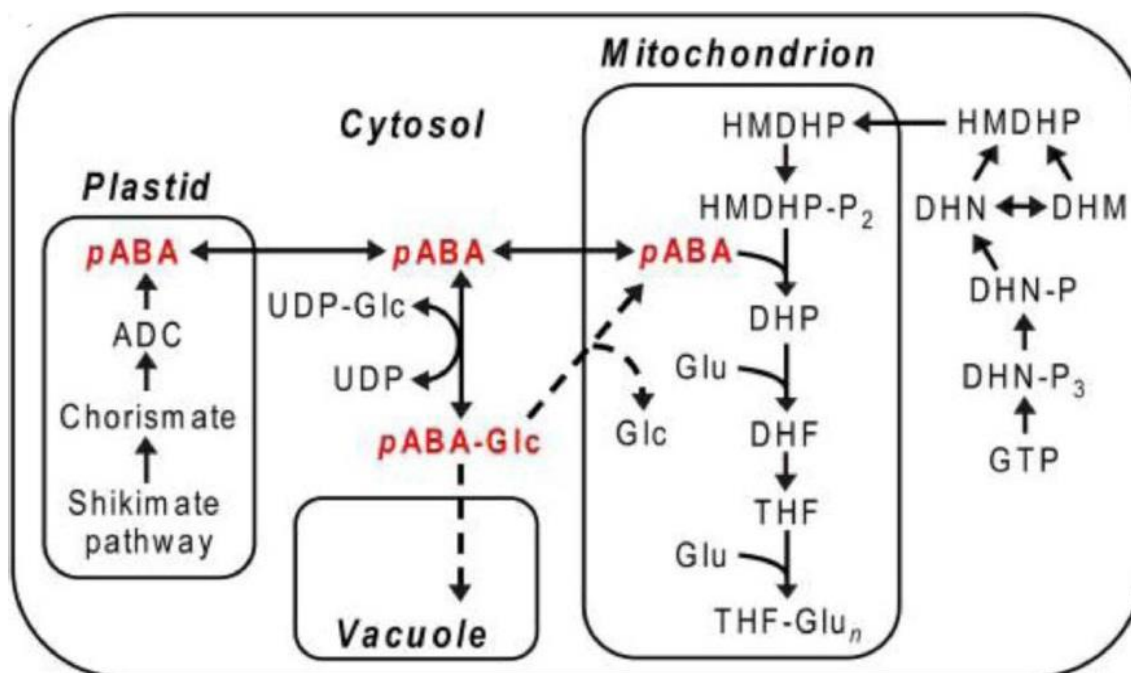


Figura 2: Sistema da biossíntese de folato em plantas, mostrando locais subcelulares dos passos da biossintética. Fonte: Eudes et al. (2008).

2.2. Importância dos Folatos

Os folatos estão envolvidos como cofatores nas chamadas “reações de transferência de carbono”, que ocorrem em dois ciclos importantes dos vegetais e mamíferos, o “ciclo de biossíntese de DNA” e o “ciclo de metilação” (LUCOCK, 2000; FOX e STOVER, 2008).

Os derivados do tetraidrofolato (THF) estão envolvidos em funções essenciais do metabolismo celular, como reparo do DNA, replicação, metilação, síntese de nucleotídeos e aminoácidos (SCOTT et al., 2000; LIMA, 2005). Além disso, são importantes para a formação de produtos intermediários do metabolismo, e estão envolvidos na síntese de colina, serina e glicina. Como quantidades adequadas de colina e outros aminoácidos, podem geralmente ser obtidos da dieta, a participação de folatos na síntese de purina e timidilato (dTMP)

parece ser, dessas reações, a metabolicamente mais significativa, por ser fundamental à síntese de DNA (DANG et al., 2000; FOX e STOVER, 2008).

Os folatos também participam na produção normal de hemácias e a carência de alimentos que contenham a vitamina, pode levar à anemia megaloblástica (VAN DER PUT et al., 2001; SPITZER, 2007). O tetraidrofolato (THF) juntamente com a vitamina B₁₂ é necessário para a conversão de homocisteína a metionina (FOX e STOVER, 2008). Esta reação é de extrema importância para o sistema cardiovascular, dado que a hiperhomocisteinemia pode causar lesões nos vasos sanguíneos, aumentar a agregação de plaquetas e levar à arteriosclerose vascular e trombose (SCOTT et al., 2000; RYBKA, 2010).

Além disso, produzem as proteínas que participam da biossíntese das camadas de lipídios que separam os nervos axônios, conhecida como mielina (SCOTT et al., 2000; LIMA, 2005), e são essenciais para a formação e maturação de hemácias e leucócitos na medula óssea (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 2005).

2.3. Digestão, Absorção, Transporte e Metabolismo

Os folatos da dieta são comumente encontrados na forma de derivados poliglutâmicos, e passam por uma série de modificações antes de serem utilizados pelo organismo humano (FITZPATRICK, 2003).

Na digestão gastrointestinal, esses derivados poliglutâmicos são hidrolisados às formas monoglutâmicas pela ação da enzima pteroil- δ -glutamildrolase, encontrada nas vilosidades da mucosa jejunal (WANG et al., 1993). Em seguida, os folatos monoglutâmicos são unidos às proteínas ligantes presentes na parede intestinal e então absorvidos ativamente (GREGORY, 2001). Antes de entrar na circulação sanguínea são convertidos a 5-metiltetraidrofolato-monoglutamato (5-CH₃-H₄PteGlu₁) pelas células da mucosa, que é a forma da vitamina encontrada no plasma (SCOTT et al., 2000; LUCOCK et al., 2003). Ao ser distribuído para os tecidos, o 5-CH₃-H₄PteGlu₁ é convertido tetraidrofolato-monoglutamato (H₄PteGlu₁) pela ação da enzima metionina sintase. Por sua vez, o H₄PteGlu₁ é novamente transformado em oligo- δ -pteroilglutâmicos, principalmente o H₄PteGlu₆

(REISENAUER e HALSTED, 1987; SHILS et al., 1994; SCOTT et al., 2000; FITZPATRICK, 2003).

O fígado é o responsável pela homeostase dos folatos, onde é metabolizado a derivados poliglutâmicos sendo armazenados ou liberados para a circulação sanguínea. Neste ciclo, uma parte é liberada na bile, novamente reabsorvida no intestino e distribuída subsequentemente aos tecidos (HOLLMAN et al., 1993). O suprimento constante de 5-CH₃-H₄PteGlu₁ é mantido pela alimentação e pelo ciclo entero-hepático da vitamina. Os produtos de degradação, principalmente, ácido p-aminobenzóico e pteridinas, são excretados nas fezes e urina (BRODY, 1991; DEVLIN, 1998).

2.4. Biodisponibilidade e Estabilidade

A avaliação da biodisponibilidade de folatos em alimentos inclui estudos que vão desde a absorção intestinal, função metabólica das coenzimas folato-dependentes até o processo de excreção (GREGORY, 1989). Então, qualquer fator que influencie a absorção intestinal ou que afete o metabolismo e excreção dessa vitamina deve ser considerado. Além disso, muitos alimentos são atualmente enriquecidos ou fortificados com ácido fólico. Portanto, é necessário distinguir o valor nutricional entre ácido fólico (forma monoglutâmica) e folato (forma poliglutâmica) (LIMA, 2005).

O valor nutricional atribuído às formas mono ou poligutâmicas varia, porque existem diferenças de biodisponibilidade entre elas. Acredita-se que devido à exigência de hidrólise dos poliglutamatos a biodisponibilidade dos folatos monoglutâmicos seja maior (FITZPATRICK, 2003). De acordo com Iwatani et al. (2003), os folatos monoglutamatos são melhor absorvidos que os folatos conjugados. Konings et al. (2001), afirmaram que a biodisponibilidade de folatos monoglutamatos varia de 70 a 120% em relação ao ácido fólico sintético e que em geral, a biodisponibilidade de folatos presentes em alimentos é de 50%. Já a forma sintética adicionada apresenta biodisponibilidade em torno de 85 a 100% (TRUMBO, 2003)

Em relação à estabilidade, os folatos são moléculas sensíveis que sofrem oxidação espontânea ou clivagem foto-oxidativa da ligação C₉-N₁₀. A reatividade química torna esta vitamina uma das mais vulneráveis para perdas durante o processamento. Fatores como temperatura, luz, pH, presença de catalisadores e agentes oxidantes são responsáveis pela degradação dos folatos (GREGORY, 1989; BRODY, 1991; SCOTT et al., 2000). No entanto, estão naturalmente protegidos da desagregação através da ligação a proteínas específicas (JONES e NIXON, 2002). Proteínas de ligação também protegem os folatos poliglutâmicos da quebra da cadeia glutâmica (ORSOMANDO et al., 2005).

A ordem de estabilidade das formas reduzidas é: 5-formiltetrahydrofolato > 5-metiltetrahydrofolato > 10-formiltetrahydrofolato > tetrahydrofolato. O ácido fólico é mais estável do que os folatos reduzidos (GREGORY, 1996, ELIAS, 2010).

2.5. Necessidades Nutricionais

Os folatos são necessários em pequenas quantidades, porém, parte da população apresenta deficiência desse nutriente. Para tentar amenizar esse quadro, é recomendável o aumento da ingestão de alimentos ricos nessa vitamina (IWATANI et al., 2003).

As necessidades diárias de folatos variam de organização para organização (Tabelas 1 e 2), segundo a FAO/WHO (2002) e a USDA (2013) a recomendação para adultos seria de 400 µg/dia, já segundo a ANVISA (2005) essa recomendação seria de 240 µg/dia. Alta ingestão de folatos é recomendada para mulheres antes e durante a gravidez (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 2005; SPITZER, 2007; IYER e TOMAR, 2009).

A suplementação de ácido fólico, desde três meses antes da concepção até a décima segunda semana da gestação pode prevenir a doença do tubo neural (DTN) no feto. A razão para a administração antes da gestação se deve ao fato do tubo neural se formar entre o 25º e 27º dia após a concepção, antes que a maioria das mulheres se de conta de que estão grávidas (VILLAREAL et al., 2001).

Tabela 1. Ingestão diária recomendada, segundo USDA (2013).

Grupos	Folato (µg/dia)
Crianças	
0 – 6 meses	80
7 – 12 meses	80
1 – 3 anos	160
4 – 6 anos	200
7 – 9 anos	300
Adolescentes, 10 -18 anos	400
Adultos	
19 – 65 anos	400
> 65 anos	400
Grávidas	600
Lactantes	500

Fonte: USDA (2013).

Tabela 2. Ingestão diária recomendada, segundo ANVISA (2005).

Grupos	Folato (µg/dia)
Lactentes	
0 – 6 meses	48
7 – 11 meses	48
Crianças	
1 – 3 anos	95
4 – 6 anos	118
7 – 10 anos	177
Homens	240
Mulheres	240
Gestantes	355
Lactantes	295

Fonte: ANVISA (2005).

2.6. Fontes

Os folatos estão presentes na maioria dos alimentos, como leguminosas e oleaginosas (feijão, nozes, ervilha), folhas verdes (espinafre), frutas cítricas, legumes (brócolis, couve-flor), fígado e rins de algumas aves, ovos e laticínios (leites e fermentados) (LIN e YOUNG, 2000; ARCOT e SHRESTHA, 2005; HYUN e TAMURA, 2005). Os vegetais têm sido identificados como a maior fonte de

folatos na dieta, e são empregados em recomendações nutricionais para aumentar os níveis de folatos (IWATANI et al., 2003).

2.7. Deficiência de Folatos

As células dos mamíferos não são capazes de sintetizar folato, portanto uma fonte exógena desta vitamina é necessária para prevenir a deficiência nutricional (KONINGS et al., 2001).

A deficiência pode também provir de uma complicação comum do intestino delgado, que interfere na absorção do folato dos alimentos e na sua circulação pelo ciclo êntero-hepático (FISHMAN, 2000). Há evidências de que o álcool e as doenças hepáticas, como os anticonvulsivantes e os anticoncepcionais, interferem na absorção e metabolismo dos folatos, podendo levar à deficiência da vitamina. Nefropatas também desenvolvem a deficiência de folatos, pois estes são removidos do plasma cada vez que os pacientes são dializados (IYER e TOMAR, 2009). Mulheres grávidas e pacientes com anemia hemolítica têm maior necessidade de folatos e podem tornar-se deficientes, especialmente se suas dietas oferecerem quantidades marginais dessa vitamina (FITZPATRICK, 2003).

Há também a deficiência secundária de folatos, que pode ser ocasionada pela deficiência de vitamina B₁₂, levando à anemia megaloblástica, uma vez que os dois nutrientes são fundamentais para a produção normal de células vermelhas do sangue. E a deficiência de vitamina B₁₂ leva ao metabolismo ineficiente de ácido fólico, que acarreta em eritropoiese ineficaz (VAN DER PUT et al., 2001). Quando há deficiência de folatos a fase de síntese e divisão celular é prolongada e a fase de maturação das células é retardada, no caso da medula óssea, há produção de células vermelhas com tamanho e diâmetro maior que as demais (megaloblastos) (FISHMAN et al., 2000).

Devido à importância dos folatos na prevenção de doenças relacionadas ao organismo humano, no Brasil, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) reconheceu a importância dos folatos, através da resolução nº 344 de 13/12/2002, que obriga o enriquecimento de farinhas de trigo e milho com ácido fólico (BRASIL, 2002).

A fortificação de produtos cereais e grãos com ácido fólico é uma prática comum em muitos países (CHO et al., 2002). Outra opção que recentemente vem sendo pesquisada é aumentar o nível de folatos em plantas por engenharia genética ou técnicas de reprodução. Este assunto tornou-se cada vez mais importante (BEKAERT et al., 2008), no entanto, a disponibilidade de dados confiáveis sobre vários derivados do folato em plantas é uma das questões-chave para pesquisadores da área (ZHANG et al., 2005).

2.8. Toxicidade

O ácido fólico não é tóxico em humanos. Mesmo em doses tão altas como 15 mg/dia, não foi relatado nenhum efeito tóxico substancial, tanto que um suplemento diário de 10 mg foi consumido por 5 anos sem efeito adverso (SPITZER, 2007). Nenhum sintoma de toxicidade foi observado na ingestão de elevadas doses de folato em animais, apesar da administração parenteral de quantidades de cerca 30 de 1000 vezes a necessidade dietética ter produzido ataques semelhantes a epiléticos em ratos (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 2005).

Entretanto, grandes quantidades de folatos podem mascarar a anemia ocasionada pela falta de cianocobalamina (vitamina B12), ocasionando danos irreparáveis ao sistema nervoso central. Tendo em vista os problemas causados quando o folato mascara os efeitos da cianocobalamina, o Food and Drug Administration (FDA) recomendou que a concentração dos folatos fosse limitada em 1mg/dia ou menos para todos os produtos farmacêuticos e alimentícios (BRODY, 1991; KATZUNG, 1994; CATHARINO, 2000).

3. EXTRAÇÃO DE FOLATOS EM ALIMENTOS

Diversos métodos de extração de folatos são citados na literatura, para a análise cromatográfica (DE SOUZA e EITENMILLER, 1990; FINGLAS et al., 1993; DANG et al., 2000; ARCOT e SHRESTHA, 2005; DEVI et al., 2008; HEFNI et al., 2010), e muitos ainda estão sendo desenvolvidos.

Os procedimentos tradicionais geralmente começam com homogeneização da amostra de alimento em tampão com um pH ácido, contendo agentes redutores

para evitar a degradação oxidativa dos folatos lábeis. Vários tipos de tampão podem ser utilizados na extração dos folatos em alimentos, como tampão fosfato, tampão acetato, tampão ácido 2-(ciclohexilamino)-etanosulfônico (CHES) e ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico (HEPES) (RUGGERI et al., 1999; BALL, 2006). O pH do tampão pode variar de 4,5 a 7,85, dependendo do pH ótimo da enzima utilizada para desconjugação subsequente (GREGORY, 1989). Aiso e Tamura et al. (1998) relataram que para cada amostra há um pH apropriado que deve ser testado isoladamente. Em relação aos folatos, Brouwer et al. (2007) mostraram que o tetraidrofolato (THF) é instável sob condições ácidas ($\text{pH} < 5$) com e sem tratamento térmico.

Em relação aos redutores, os mais comuns são o ácido ascórbico, que oferece melhor estabilidade em pH ácido (4,0 -5,0) do que neutro (7,0) (GREGORY, 1989), e o 2-mercaptoetanol. Wilson e Horne (1982) recomendam adição de 2% de ácido ascórbico e de 0,2 M de 2-mercaptoetanol, que são mais eficazes sob condições ácidas. Já Chen e Cooper (1979) relataram que 0,1% de ácido ascórbico são suficientes para proteger o 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF) da oxidação por 3h à 100°C.

Uma pesquisa da literatura demonstrou que o ácido ascórbico a 1%, e pH 6.0 é mais comumente utilizado na extração de folatos (DE SOUZA e EITENMILLER, 1990; FINGLAS et al., 1993; RADER et al, 1998; ARCOT e SHRESTHA, 2005). Somado ao ácido ascórbico, o 2-mercaptoetanol aumentou a estabilidade dos folatos reduzidos durante a extração (AISO e TAMURA, 1998). Proteções contra a luz e oxigênio também ajudam a manter as formas reduzidas dos folatos naturais (HYUN e TAMURA, 2005).

Após a homogeneização, a etapa seguinte é a destruição da matriz do alimento, que é determinante para assegurar a liberação completa dos folatos. A amostra homogeneizada é normalmente aquecida brevemente a 100°C ou autoclavada para precipitar proteínas e inativar enzimas que catalisam a oxidação dos folatos ou realizam a interconversão (KEAGY, 1985; GREGORY, 1989)

Os folatos liberados da amostra pela extração com tampão requerem desconjugação completa, através do uso de enzimas conjugases. Após ação, as

enzimas devem ser rapidamente inativadas por aquecimento (KONINGS et al., 2001). Além disso, a digestão pelas enzimas α -amilase e protease atualmente são reconhecidas como necessária para a melhor determinação de folatos (DEVI et al., 2008). Conjugases de diversas fontes são utilizáveis, pâncreas de frango, rim de porco, plasma humano e de rato. Algumas propriedades dessas enzimas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 3. Propriedades das conjugases usadas em ensaios de folatos.

Fonte	pH ótimo	Resíduos glutâmicos
Pâncreas de frango	7,8	2
Rim de porco	4,5	1
Plasma humano	6,5	1
Plasma de rato	5,5 – 6,0	1

Fonte: Entenmiller e Landen (1999).

O tipo e a atividade da conjugase, e as condições de desconjugação, podem ser afetadas por fatores como tempo, temperatura e pH e natureza do substrato. Isso tudo deve ser levado em consideração durante o desenvolvimento dessa etapa, que afeta crucialmente o desempenho de todo o ensaio (SCOTT et al., 2000).

Antes da análise cromatográfica, algumas amostras biológicas e de alimentos passam pelo procedimento de limpeza e purificação do extrato. Esta etapa elimina os interferentes e permite a concentração do analito melhorando sua identificação. As formas mais utilizadas são a extração em fase sólida (SPE) (GREGORY, 1989; PFFEIFER et al., 1997) e troca iônica (SAX) (VAHTERISTO et al. 1996).

Dessa forma, a extração, tratamento enzimático e limpeza da amostra devem ser otimizados para permitir a aplicação a vários tipos de alimentos.

3.1. Extração Tri-enzimática

Na década de 1980, pesquisadores relataram que o tratamento com conjugase sozinho não seria eficaz no rompimento das ligações dos folatos com os alimentos. Então, enzimas proteolíticas e amilolíticas começaram a ser adicionadas para maximizar a atividade do folato em alguns alimentos (YAMADA,

1979; CERNA e KAS, 1983). Em 1990, Martin e seus colaboradores desenvolveram o método de extração tri-enzimático após confirmarem a eficácia da técnica na extração dos folatos de várias matrizes alimentares, em relação à técnica de extração tradicional, utilizando apenas conjugase.

Os tratamentos com α -amilase e protease permitem digestão de carboidratos e proteínas das matrizes alimentares, onde os folatos possivelmente estão presos. Assim, acredita-se que estes tratamentos proporcionam uma extração mais completa dos folatos em comparação com a combinação de aquecimento e tratamento tradicional com conjugase (SHRESTHA et al., 2000; JOHNSTON et al., 2002). Embora a ordem de atuação das enzimas fosse diferente entre alguns pesquisadores, os extratos dos alimentos tratados com as três enzimas estavam mais claros e menos viscosos, quando comparado com o extrato tratado com conjugase sozinho, ou seja, ajudou na purificação e rendimento, além de melhorar o formato do pico na análise por CLAE (PFFEIFER et al., 1997; TAMURA et al., 1997; RADER et al., 1998).

No entanto, o número e tipo de enzimas utilizadas na extração, podem ser em grande parte determinada pela natureza e composição dos alimentos. Por exemplo, o uso de amilase em carnes e produtos cárneos e protease em alimentos ricos em amido não são justificáveis (TAMURA, 1998). Dessa forma, as condições de tratamento com enzimas podem ser diferentes para cada tipo de alimento e, por conseguinte, a identificação do pH ótimo e tempo de incubação adequado para cada um dos alimentos deve ser feito antes da análise de folato (AISO e TAMURA, 1998).

4. MÉTODOS DE ANÁLISE

A análise de vitaminas em alimentos envolve vários desafios em decorrência da complexidade da amostra, presença de interferentes, concentrações mínimas, baixa estabilidade da substância analisada e, principalmente, dificuldade de desenvolver um método geral para determinação simultânea de várias vitaminas, com estruturas e propriedades diferentes (TREVISAN, 2010). Em relação aos folatos, os desafios concentram-se na identificação e diferenciação das múltiplas

formas presentes na amostra, na quebra das cadeias poliglutâmicas que contêm de três a onze resíduos, e principalmente, na instabilidade, a principal preocupação (DEVI et al., 2008).

Os métodos usados na determinação de folatos podem ser biológicos, químicos, microbiológicos, imunológicos ou físicos (CATHARINO, 2000).

A escolha de método depende da utilização final dos dados. Por exemplo, para rotulagem nutricional, onde os folatos totais são citados, normalmente utiliza-se o método microbiológico, embora os ensaios imunológicos também forneçam esses valores. Em estudos bioquímicos e de biodisponibilidade, onde a compreensão mais detalhada das várias formas de folato é necessária, os métodos cromatográficos são indicados (SCOTT et al., 2000).

4.1. Métodos Biológicos

Os métodos biológicos avaliam o efeito de dietas pobres em vitaminas sobre os processos fisiológicos (crescimento, ganho de peso, níveis plasmáticos, reprodução) de animais de laboratório. São caros e demorados, além de possuir baixa repetibilidade. Entretanto, é um método que fornece importantes ferramentas para o estabelecimento das vias bioquímicas dos folatos no organismo (SCOTT et al., 2000).

4.2. Métodos Químicos

Os métodos químicos são muito criticados principalmente pela falta de sensibilidade quando comparados aos outros métodos, além disso, a presença de muitos interferentes compromete a análise sendo muito pouco utilizados principalmente para análise quantitativa (KEAGY, 1985).

4.3. Métodos Microbiológicos

Os métodos microbiológicos são os mais versáteis e tradicionais para análise de folatos totais, sendo o único método reconhecido oficialmente pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*). São baseados na determinação da vitamina pelo requisito nutricional de um microrganismo (*Lactobacillus casei*). É

um ensaio lento, monótono e requer considerável experiência analítica, o que faz deste um método inapropriado para análises laboratoriais de rotina. Além disso, o método permite apenas a quantificação dos folatos totais presentes na matriz, indistintamente de suas formas químicas, naturais ou sintéticas (OSSEYI et al., 1998; FINGLAS et al., 1999).

4.4. Métodos Imunológicos

Novos métodos que envolvem procedimentos bioespecíficos como: ensaio por ligação a proteína enzimática (EPBA), ensaio por enzima ligada a fase imune (ELISA) e radioensaios têm algumas vantagens sobre o ensaio microbiológico. São, comparativamente, mais rápidos e menos sujeitos a variações (OSSEYI et al., 1998). No entanto, o radioensaio é mais utilizado em análises sanguíneas, já sua aplicação nas análises de alimentos é limitada. Os métodos por EPBA e ELISA são ainda técnicas novas, necessitam de certos conhecimentos do analista além de serem, em geral, mais caros que os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ARCOT e SHRESTHA, 2005).

4.5. Métodos Cromatográficos

Os métodos físicos envolvem as técnicas cromatográficas. Uma das técnicas mais empregadas para esta determinação é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), devido à possibilidade da determinação simultânea das diferentes formas de folatos ativos em uma única análise, utilizando a detecção por fluorescência (KONINGS, 1999; CATHARINO, 2004).

É uma técnica rápida, altamente sensível e exata, além de fornecer a melhor resolução na separação das diversas formas bioativas presentes nos alimentos, sendo uma das técnicas analíticas mais usadas (AGOSTINI, 1996). Entretanto, a CLAE ainda possui várias limitações, como a exigência de que os folatos estejam desconjugados, e de um rigoroso procedimento de limpeza das amostras antes da injeção no equipamento. A maioria das matrizes alimentares não tem um método de purificação válido e adequado, e ainda faltam detectores capazes de identificar alguns derivados do ácido fólico. Como a extração e os procedimentos de

purificação são complexos, pode ocorrer perda de folatos sensíveis, conduzindo ao erro experimental no valor do nutriente (ARCOT e SHRESTHA, 2005).

Recentemente, têm-se utilizado técnicas cada vez mais sensíveis, específicas e rápidas para a determinação de folatos em alimentos e amostras biológicas. A cromatografia líquida e a cromatografia líquida de ultra performance, ambas combinadas com espectrometria de massa (LC-MS/MS e UPLC-MS/MS) são capazes de identificar os folatos em matrizes complexas, mesmo em baixas concentrações e estabilidade, com significativo aumento da eficiência de separação e resolução cromatográfica (BROUWER et al., 2010; VISHNUMOHAN et al., 2011).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI, T. S. **Desenvolvimento de metodologia para determinação simultânea por CLAE de vitaminas B1, B2, B6, ácido nicotínico e nicotinamida em alimentos enriquecidos.** 1996. 183f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1996.
- ALSO, K.; TAMURA, T. Trienzyme treatment for food folate analysis: optimal pH and incubation time for α -amylase and protease treatment. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 44, p. 361–370, 1998.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais.** Diário oficial da união, Brasília, 23 de setembro de 2005. Disponível em <www.anvisa.gov.br>. Acesso em 11/07/2013.
- ARCOT, J.; SHRESTHA, J. Folate: methods of analysis. **Trends Food Sci Technol**, v. 16, p. 253–266, 2005.
- BALL, G. F. M. **Vitamins in food: analysis, bioavailability and stability.** Boca Raton: CRC Taylor & Francis Group. 2006. 785 p.
- BEKAERT, S.; STOROZHENKO, S.; MEHRSHAHI, P.; BENNETT, M. J.; LAMBERT W.; GREGORY III, J. F.; SCHUBERT, K.; HUGENHOLTZ, J.; VAN DER STRAETEN D.; HANSON, A. D. Folate biofortification in food plants. **Trends Plant Sci**, v.13, p. 28-35, 2008.
- BORÉM, A.; CARNEIRO, J. E. S. **A cultura.** In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. Feijão. 2 ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2006. p.13-18.
- BRASIL. Lei nº 9972 de classificação de produtos vegetais, seus subprodutos e resíduos de valor econômico e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 20 de novembro de 2000.
- BRASIL. Resolução – RDC nº344, de 13 de dezembro de 2002. Regulamento Técnico para Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 de dezembro de 2002.
- BRODY, T. Folic Acid In: Machlin, L. J. **Handbook of vitamins.** 2 ed. New York: Marcel Decker, 1991.
- BROUGHTON, W. J.; HERNANDEZ G.; BLAIR M.W.; BEEBE S. E.; GEPTS P., VANDERLEYDEN J. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. **Plant Soil**, v. 252, p. 55-128, 2003.
- BROUWER, V. D.; STOROZHENKO, S.; CHRISTOPHE, P.; STOVE, J. V. D.; DOMINIQUE, V. D. S.; LAMBERT, W. E. Ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC–MS/MS) for the sensitive determination of folates in rice. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 509–513, 2010.
- BROUWER, V. D.; ZHANG, G. F.; STOROZHENKO, S.; STRAETEN, D. V. D.; LAMBERT, W. E. pH Stability of Individual Folates During Critical Sample Preparation Steps in Prevision of the Analysis of Plant Folates. **Phytochem. Anal.**, v.18, p. 496–508, 2007.
- CATHARINO, R. R. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de folatos em alimentos.** 2004. 96f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2004.

- CATHARINO, R. R. **Desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia para análise de ácido fólico em alimentos enriquecidos**. 2000. 126f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2000.
- CERNA, L.; KAS, J. New conception of folacin assay in starch or glycogen containing food samples. **Nahrung**, v. 10, p. 957–964, 1983.
- CFI - CENTRO DE INTELIGÊNCIA DO FEIJÃO - Disponível em: (<http://www.cifeijao.com.br/index.php?p=historico>). Acesso em: 16/05/2013.
- CHEN, T. S.; COOPER, R. G. Thermal destruction of folacin. **Journal of Food Science**, v. 44, p. 713–716, 1979.
- CHO, S.; JOHNSON, G.; SONG, W.O. Folate Content of Foods: Comparison Between Databases Compiled Before and After New FDA Fortification Requirements. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, n. 3, p. 293–307, 2002.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, quarto levantamento, janeiro 2013. Brasília. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_01_09_17_44_20_boletim_graos_janeiro_2013.pdf>. Acesso em: 11/03/2013.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Prospecção para a Safra 2011/2012**. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/conjunturas-prospecção>>. Acesso em: 21/06/2012.
- COSTA, G. E. A.; QUEIROZ-MONICI, K. S.; REIS, S. M. P. M.; OLIVEIRA, A. C. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. **Food Chem**, v. 94, p. 327-330, 2006.
- DANG, J.; ARCOT, J.; SHRESTHA, A. Folate retention in selected processed legumes. **Food Chem.**, v. 68, n. 3, p. 295-298, 2000.
- DE SOUZA, S.; EITENMILLER, R. Effects of different enzyme treatments on extraction of total folate from various foods prior to microbiological assay and radioassay. **J Micronutr Anal**, v. 7, p. 37–57, 1990.
- DELFINO, R. A.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Interação de polifenóis e proteínas e o efeito na digestibilidade proteica de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Pérola. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 30, n. 2, p. 308-312, 2010.
- DEVI, R.; ARCOT, J.; SOTHEESWARAN, S.; ALI, S. Folate contents of some selected Fijian foods using tri-enzyme extraction method. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1100-1104, 2008.
- DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1998, 1007p.
- DURANTI, M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. **Fitoterapia**, v. 77, p. 67-82, 2006.
- EITENMILLER, R. R.; LANDEN, W. O. JR. **Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences**. Boca Raton: CRC Press. 1999. p. 411–466.
- ELIAS, E. M. **Ácido fólico e ferro em alimentos**. 2010. 192f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campina, Campinas, SP, 2010.
- EUDES, A.; BOZZO, G.G.; WALLER, J.C.; NAPONELLI, V.; LIM, E.-K.; BOWLES, D.J.; GREGORY, J.F.; ANDREW, D. Hanson metabolism of the folate precursor p-aminobenzoate in plants: Glucose ester formation and vascular storage. **Biol. Chem**, v. 283, p.15451-15459, 2008.

- FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Requirements of Vitamin A, Iron, Folate and Vitamin B12.** Rome, Italy, 2002. p. 62-73.
- FINGLAS, P. M.; FAURE, U.; SOUTHGATE, D. A. T. First BCR – intercomparison on the determination of folates in food. **Food Chem**, v. 46, p. 199-213, 1993.
- FINGLAS, P. M.; WIGERTZ, K.; VAHTERISTO, L.; WITTHOFT, C.; SOUTON, S.; DE FROIDMONT-GORTZ, I. Standardisation of HPLC techniques for the determination of naturally occurring folates in food. **Food Chem**, v. 64, p. 245–55, 1999.
- FISHMAN, S. M.; CHRISTIAN, P.; WEST, K. P. The role of vitamins in the prevention and control of anemia. **Public Health Nutr**, v. 3, p. 125–50, 2000.
- FITZPATRICK, A. Folic acid: implications for health and disease. **Agro Food Industry hi tech**, v. 45, n. 8, 2003.
- FOKKEMA, M. R.; MEIJER, W. M.; BERG, L. T. W. Benefits and concerns regarding folic-acid fortification. **Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk**, v. 30, p. 218-223, 2005.
- FOX, J.; STOVER, P. J. **Folate-mediated one-carbon metabolism.** In: Folic Acid and Folates, Vitamins and Hormones, c. 1, v. 79, p. 22-29, 2008.
- GEPTS, P. Origin and evolution of common bean: Past events and recent trends. **Hort. Sci.** v. 33, p. 1124-1130, 1998.
- GREGORY, J. F. Case study: folate bioavailability. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 4, p.1376S -1382S, 2001.
- GREGORY, J. F. **Vitamins.** In Food chemistry (Eds, Fennema, O. R.) Marcel Dekker Inc, New York, 1996, p. 531-610.
- GREGORY, J.F.III. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability and bioavailability of dietary folates. **Advanced Food and Nutritional Research**, 33: 1-101, 1989.
- HEFNI, M.; VERONICA, O.; MOHAMED, T.; CORNELIA, W. Folate content in foods commonly consumed in Egypt. **J. Food Chem**, v. 121, p. 540-545, 2010.
- HOLLMAN, P. C.; SLANGE, J. H.; WAGSTAFFE, J. P.; FAURE, U.; SOUTHGATE, D. A. T.; FINGLAS, P. M. Incorporation of methods for determination of vitamins in foods. **Analyst**, v. 118, p. 481-488, 1993.
- HYUN, T. H.; TAMURA, T. Trienzyme Extraction in Combination with Microbiologic Assay in Food Folate Analysis: An Updated Review. **Experimental Biology and Medicine**, v. 230, p. 444-454, 2005.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003 e 2008-2009.** Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em 19 maio 2013.
- IWATANI, Y.; ARCOT, J.; SHRESTHA, A. K. Determination of folate contents in some Australian vegetables. **J. Food Comp. Anal.**, v.16, p. 37-48, 2003.
- IYER, R.; TOMAR, S. K. Folate: A Functional Food Constituent. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 9, 2009.
- JOHANSSON, M.; FURUHAGEN, C.; FRALICH W.; JAGERSTAD, M. Folate content in frozen vegetarian ready meals and folate retention after different reheating methods. **Food Sci. Tech**, v. 41, p. 528-536, 2008.
- JOHNSTON, K. E.; LOFGREN, P. A.; TAMURA, T. Folate concentrations of fast foods measured by trienzyme extraction method. **Food Research International**, v. 35, p. 565–569, 2002.

- JONES, M. L.; NIXON, P. F. Tetrahydrofolates are greatly stabilized by binding to bovine milk folate-binding protein. **J. Nutr**, v. 132, p. 2690-2694, 2002.
- KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 5ed. São Paulo: Guanabara Koogans, 1994, 755p.
- KEAGY, P. M. **Folacin I: Methods of vitamin assay**, 4ed, New York: John Wiley.
- KONINGS, E. J. M.; ROOMANS, H. H.; DORANT, E.; GOLDBOHN, R. A.; SARIS, W. H.; VAN DEN BRANDT, P. A. Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. **Am J Clin Nutr**, v. 73, p.765–76, 2001.
- KONINGS, E. L. M. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, Milk powder, liver, and flour. **Journal of AOAC International**, v. 82, n. 1, 1999.
- LIMA, J. A. **Folatos em vegetais - influência do tipo cultivo e processamento**. 2005. 84f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2005.
- LIN, M. Y.; YOUNG, C. M. Folate levels in cultures of lactic acid bacteria. **Int Dairy J**, v. 10, p. 409-414, 2000.
- LUCOCK, M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology and role in disease process. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 71, p.131-38, 2000.
- LUCOCK, M.; YATES, Z.; GLANVILLE, T.; LEEMING, R.; SIMPSON, N.; DASKALAKIS, I. A critical role for B-vitamin nutrition in human developmental and evolutionary biology. **Nutr. Res.**, v.23, p.1463-1475, 2003.
- MACHADO, J. L. A.; **Feijão: O Alimento do Povo**. Disponível em: http://artigocientifico.uol.com.br/uploads/artc_1173460598_86.doc. Acesso em 13/10/2012.
- MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause – alimentos, nutrição & dietoterapia**. 11ed. São Paulo: Editora Rocca Ltda. 2005. 1242 p.
- MARTIN, J. I.; LANDEN, W. O.; SOLIMAN, A. G. M.; EITENMILLER, R. R. Application of a tri-enzyme extraction for total folate determination in foods. **J Assoc Off Anal Chem**, v. 3, p. 805–808, 1990.
- MENDES, W. M. **Comparação da Qualidade Física do Feijão Preto Importado da Argentina com o Feijão Preto Produzido em Santa Catarina**. (TCC) Tubarão/SC, 2005.
- MESQUITA, F. R.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; LIMA R. A. Z.; ABREU, A. F. B. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciênc. agrotec.**, v. 31, n. 4, p. 1114-1121, 2007.
- NETO, B. S. C. A. **Avaliação do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e (*Vigna unguiculata* L.) consumido no Distrito Federal sob aspectos qualitativos da classificação vegetal**. Monografia (Especialista em Qualidade de Alimentos) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- OLIVEIRA, J. E. D. **O Feijão na Alimentação/ Nutrição do Brasileiro: Ontem e Amanhã**. São Paulo: USP, 2008.
- ORSOMANDO, G.; DÍAZ DE LA GARZA, R.; GREEN B.J.; PENG, M.; REA, P.A.; RYAN, T. J.; GREGORY, J. F. I.; HANSON, A.D. Plant γ -glutamyl hydrolases and folate polyglutamates: characterization, compartmentation, and co-occurrence in vacuoles. **J. Biol. Chem**, v. 280, p. 28877-28884, 2005.

- OSSEYI, E. S.; WEHLING, R. L.; ALBRECHT, J. A. Liquid chromatographic method for determining added folic acid in fortified cereal products. **Journal of Chromatography**, v. 826, p. 235–240, 1998.
- PEDROSO, C. **Incidência, controle de doenças de feijão-vagem e anatomia e histoquímica de *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata* resistentes e suscetíveis ao oídio (*Erysiphe Polygoni*)**. 2012. 144f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- PFFEIFER, C. M.; ROGERS, L. M.; GREGORY, J. F. III. Determination of folate in cereal-grain food products using trienzyme extraction and combined affinity and reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 407–413, 1997.
- QUEIROZ, K. et al. Soaking the common bean in a domestic preparation reduced the contents of raffinose-type oligosaccharides but did not interfere with nutritive value. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v. 48, n. 4, p. 238-239, 2002.
- RADER, J. I.; WEAVER, C. M.; ANGYAL, G. Use of a microbiological assay with tri-enzyme extraction for measurement of pre-fortification levels of folates in enriched cereal-grain products. **Food Chemistry**, v. 62, p. 451–465, 1998.
- REISENAUER, A. M.; HALSTED, C. H. Human Folate Requirements. **Journal of Nutrition**, v. 117, p. 600-602, 1987.
- RICHETTI, A.; MELO, C. L. P.; SOUSA, J. P. B. **Viabilidade Econômica da Cultura do Feijão Comum, Safra 2012, em Mato Grosso do Sul**. Embrapa, Dezembro 2011.
- ROURE, M. C. El déficit de ácido fólico. **Formación Médica Continuada em Atención Primaria**, v. 17, n. 2, p. 94-100, 2010.
- RUGGERI, S.; AGUZZI, A.; CARNOVALE, E. Folate nutritional importance and evaluation of different method for their determination in food. **La Rivista di scienza dell'alimentazione**, v. 28, n. 3, p. 45–54, 1999.
- RYBKA, A. C. P. **Folatos, capacidade antioxidante e trans-2-nonenal em cerveja brasileira**. 2010. 96f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2010.
- SAMMOUR, R. H.; RADWAN, S. A.; EL-KOLY, A. Genetic diversity in *Phaseolus spp.* As revealed by SDS-PAGE makers. **Plant Genetic Resources Newsletter**, n. 151, p. 69-75, 2007.
- SAMUEL, J.; RAVANEL, S.; GAMBONNET, B.; S. RÉBEILLÉ, F. One-carbon metabolism in plants: Regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development. **Plant Physiol.**, v. 73, n. 131, p. 1431-1439, 2003.
- SCOTT, J.; RÉBEILLE, F.; FLETCHER, J. Review: Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **J. Sci. Food Agric.**, v. 80, p. 795-824, 2000.
- SHILS, M. E.; OLSEN, J.; SHIKE, M. **Modern nutrition in health and disease**. 8 ed. Media, 1994. p. 402–25.
- SHRESTHA, A. K.; ARCOT, J.; PATERSON, J. Folate assay of foods by traditional and tri-enzyme treatments using cryoprotected *Lactobacillus casei*. **Food Chemistry**, v. 71, p. 545–552, 2000.
- SPITZER, V. **Vitamins Basics**. DSM Nutritional Products. 3ed. Burger Druck, 2007. 97 p.
- SWIGLO, A. G. Folates as antioxidants. **Food Chem**, v. 101, p. 1480–1483, 2007.
- TAMURA T. Determination of food folate. **J Nutr Biochem**, v. 9, p. 285–293, 1998.

- TAMURA, T.; MESSING, B. Bioavailability of acid folic in fortified food. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, n. 6, p. 1299 -1300, 1997.
- TREVISAN, G. A. G. M. **Determinação de vitaminas do complexo B em cremes vegetais enriquecidos**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2010.
- TRUMBO, P.R. Dietary Reference Intakes: Revised nutritional equivalents for folate, vitamin e and provitamin a carotenoids. **J. Food Comp. Anal.**, v.16, p. 379-382, 2003.
- USDA - NATIONAL NUTRIENT DATABASE REFERENCE. Disponível em :<<https://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/SR24/nutrlst/sr24a255>>: Acesso em: 12/04/2013.
- VAHTERISTO, L. T.; OLLILAINEN, V.; PEKKA, E. K.; VARO, P. Improvements in the analysis of reduced folate monoglutamates and folic acid in food by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 477–482, 1996.
- VAN DER PUT, N. M. J.; VAN STRAATEN, H. W. M.; TRIJBELS, F. J. M.; BLOM, H. J.; Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. **Exp Biol Med**, v. 226, p. 243–270, 2001.
- VIEIRA, C.; VIEIRA, R. F. **Leguminosas Graníferas**. Viçosa: UFV, 2001.
- VILLAREAL, L.E.M.; BENAVIDES, C.L.; VALDEZ-LEAL R.; SANCHEZ-PEÑA M.A.; VILLAREAL-PÉREZ J.Z. Efecto de La administración semanal de ácido fólico sobre losvalorse sanguíneos. **Salud Pública de México**, v. 43, n. 2, p. 103-7, 2001.
- VISHNUMOHAN, S.; ARCOT, J.; PICKFORD, R. Naturally-occurring folates in foods: Method development and analysis using liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). **Food Chemistry**, v. 125, p. 736–742, 2011.
- WANDER, A. E.; FERREIRA, C. M. **Consumo de feijão**. Agência de Informação Embrapa – Feijão - 2008. Disponível em: <www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia4/AG01/arvore/AG01_62_1311200215103>. Acesso em 01/10/2012.
- WANG, Y.; ZENIA NIMEC.; THOMAS, J.; RYAN; JAMES DIAS, A.; GALIVAN, J.; The properties of the secreted gamma-glutamyl hydrolases from H35-hepatoma cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1164, p. 227-235, 1993.
- WILSON, S. D.; HORNE, D. W. Use of glycerol-protected Lactobacillus casei for microbiological assay of folic acid. **Clinical Chemistry**, v. 28, p. 1198–2000, 1982.
- YAMADA, M. Folate contents in milk in Japanese modified powder milk and infant food. **Vitamins**, v. 53, p. 221–227, 1979.
- ZHANG, G. F.; STOROZHENKO, S.; STRAETEN, D. V. D.; LAMBERT, W. E. Investigation of the extraction behavior of the main monoglutamate folates from spinach by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1078, p. 59–66, 2005.

“ESTUDO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO NA ANÁLISE DE
FOLATOS EM FEIJÃO CARIOCA (*Phaseolus vulgaris* L.):
COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS”

Elenice C. E. Cunha e Helena T. Godoy *

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), CEP 13083-862,
Campinas-SP, Brasil.

RESUMO

Deficiências nutricionais de folatos podem causar defeitos no tubo neural, doenças cardíacas e vários tipos de câncer. Dentre as principais fontes incluem-se vegetais verde-escuros, leveduras, frutas e leguminosas. O feijão é uma leguminosa rica em folatos, entretanto, sua biodisponibilidade pode ser afetada pelas condições de processamento. A análise de folatos, em geral, envolve três etapas: a liberação da matriz celular; desconjugação, por meio da ação enzimática, das formas poliglutâmicas às formas mono e diglutâmicas, e a detecção da concentração dos folatos resultantes. Estudos recentes têm indicado que o tratamento tri-enzimático é essencial na etapa de desconjugação, para obter os níveis mais exatos de folatos nas análises em alimentos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar e comparar três diferentes tratamentos enzimáticos e suas respectivas eficiências na etapa de hidrólise enzimática, aplicando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a análise de folatos em feijões. As metodologias de extração e hidrólise foram adaptadas de Finglas et al. (1993), Konings et al. (1999) e Jastrebova et al. (2003), e a análise por CLAE desenvolvida por Catharino e Godoy (2004) foi avaliada para amostra estudada. Foram tomados 2g de feijão cozido/liofilizado adicionados de 20 mL de tampão fosfato e submetidos à hidrólise ácida e enzimática (tri-, di- e mono-enzimática), posteriormente, os extratos foram analisados por CLAE. Os resultados indicaram que para o feijão, o tratamento tri-enzimático aumentou o teor de folatos em 12, 17 e 82% quando comparado ao tratamento di-enzimático, mono-enzimático e sem hidrólise enzimática, respectivamente. Além disso, através do tratamento tri-enzimático foi possível identificar duas formas distintas de folatos, o tetraidrofolato (THF) e o 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF), este último não sendo identificável nos outros tratamentos. Em concordância com estudos envolvendo diferentes matrizes alimentícias, conclui-se que para a análise de folatos em feijão, o tratamento tri-enzimático também foi mais efetivo.

Palavras-chave: Desconjugação, formas poliglutâmicas, tratamento tri-enzimático, di-enzimático, mono-enzimático.

ABSTRACT

Nutritional deficiencies of folates can cause neural tube defects, heart disease and various cancers. Dark green vegetables, yeast, fruits and legumes are among the main sources of folates. Beans are a legume rich in folates, however, its bioavailability may be affected by processing conditions. The analysis of folates, in general, involves three steps: the release of the cellular matrix; deconjugation, by enzymatic action on the polyglutamates forms to the mono and diglutamic forms, and the detection of the concentration of folates resultant. Recent studies have indicated that the tri-enzymatic treatment is essential for the deconjugation step to obtain more accurate levels of folates in foods analysis. Therefore, the aim of this study was to evaluate and compare three different enzymatic treatments and their respective efficiencies in enzymatic hydrolysis step, applying the technique of high performance liquid chromatography (HPLC) for the analysis of folate in beans. The method of extraction and hydrolysis were adapted from Finglas et al. (1993), Konings et al. (1999) and Jastrebova et al. (2003), and the methodology of analysis by high performance liquid chromatography (HPLC) developed by Catharino and Godoy (2004) was used to evaluate the study sample. 2g of cooked beans/lyophilized then, were added 20 mL of phosphate buffer and this mixture were subjected to acid hydrolysis and enzymatic (tri-, di- and mono-enzymatic), and subsequently, the extracts were analyzed by HPLC. The results indicated that for the beans, the tri-enzymatic treatment increased the folates amount in 12, 17 and 82% when compared to the di-enzymatic treatment, mono-enzymatic treatment and without enzymatic hydrolysis, respectively. Furthermore, by the use of tri-enzyme treatment was possible to identify two distinct forms of folates, the tetrahydrofolate (THF) and the 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF). 5-MTHF was not identified in other treatments. In agreement with others studies involving different food matrix, it is concluded that for the analysis of folates in beans, tri-enzyme treatment was also more effective.

Keywords: Deconjugation, polyglutamates forms, tri-enzyme treatment, di-enzymatic, mono-enzymatic.

1. Introdução

Folatos representam um componente nutricional essencial (vitamina B₉) na dieta humana, que está envolvido em muitas vias metabólicas, principalmente em reações de transferência de carbono, tais como síntese purinas e pirimidinas, e interconversões de aminoácidos. A deficiência está associada com a incidência de defeitos no tubo neural durante o desenvolvimento do embrião, doença de Alzheimer, doenças coronarianas, aumento do risco de osteoporose, câncer de mama e colorretal (FINGLAS e WRIGHT, 2002; IYER e TOMAR, 2009; CAUDILL, 2010). A ingestão diária recomendada é de 240 µg/dia para adultos e 355 µg/dia para mulheres que planejam engravidar, e ao longo da gestação (ANVISA, 2005).

Dentre os alimentos naturais, os folatos são encontrados em vegetais verde-escuros, leguminosas, leveduras e em vísceras como fígado (HYUN e TAMURA, 2005; IYER e TOMAR, 2009). Os feijões são ricos em folatos, no entanto, sua biodisponibilidade e bioatividade dependem estritamente dos métodos de processamento dos grãos antes do seu consumo, da metodologia de extração e determinação do composto (DELCHIER et al., 2013).

A análise de folatos em alimentos envolve alguns desafios em decorrência da baixa concentração em que estão presentes, da presença de inúmeros interferentes, complexidade da matriz e exige cuidados especiais devido à baixa estabilidade desses nutrientes (CATHARINO et al., 2006). Em relação à extração de folatos, no geral, o procedimento envolve três etapas: a liberação da matriz celular; desconjugação, por ação enzimática, do poliglutamato às formas mono e diglutâmicas, e a detecção da concentração dos folatos resultantes (KONINGS et al., 2001; ARCORT e SHRESTHA, 2005). A liberação incompleta da matriz celular resulta em uma baixa estimativa de folatos, assim, um aumento na concentração de folatos a partir de uma amostra de alimento indica um método de ensaio melhorado (SHRESTHA et al., 2000).

Pesquisadores têm trabalhado para aprimorar os métodos de análise de folatos e alguns deles já relataram que o tratamento utilizando apenas a conjugase geralmente é insuficiente para quebrar as matrizes alimentares complexas e liberar os folatos presentes (MARTIN et al., 1990; DE SOUZA e EITENMILLER,

1990; PFFEIFER et al., 1997; AISO e TAMURA, 1998; IWANTANI et al., 2003; DEVI e ARCOT, 2008; DONG et al., 2011). O tratamento de alimentos ricos em proteínas, com protease, e alimentos ricos em amido e glicogênio, com α -amilase, em adição à conjugase (tratamento tri-enzimático), resulta em aumento significativo na concentração do total de folatos nos alimentos (DOHERTY e BEECHER, 2003). Estudos em matrizes alimentícias diversas evidenciam a necessidade do tratamento tri-enzimático, após relatos de significativo aumento no teor de folatos totais, quando tratados com três enzimas em relação ao tratamento com uma única enzima (KONINGS, 1999, RUGGERI et al., 1999; HYUN e TAMURA, 2005).

No entanto, pela dificuldade em se trabalhar com enzimas e pelo extenso trabalho laboratorial necessário, se faz importante confirmar e estudar diferentes formas de realizar a etapa de hidrólise para alimentos específicos. Assim o objetivo deste trabalho foi aplicar diferentes tratamentos enzimáticos e não enzimáticos, para avaliar os teores de folatos do feijão em metodologia adaptada para a matriz, utilizando a técnica de CLAE.

2. Materiais e Método

2.1. Amostra

Três diferentes lotes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), tipo carioca, de uma única marca, foram adquiridos em supermercados da cidade de Campinas, SP, e analisados individualmente em triplicata. Para cada lote, duas embalagens de 1 kg foram homogeneizadas e 200 g da amostra foram tomadas para o cozimento.

Os feijões foram cozidos em panela de pressão doméstica (Pressionella® 3L), sem remolho, seguindo as orientações de tempo de cocção (30 minutos) e proporção de grão: água (1:4), recomendadas pelo fabricante. Após o cozimento, os grãos e todo o caldo foram homogeneizados em liquidificador industrial (Colombo®) por 5 minutos, até obter uma consistência homogênea e uniforme do alimento. Em seguida, as diferentes amostras foram congeladas por 12 horas, e,

posteriormente submetidas à liofilização por 24 horas, utilizando o liofilizador (LS3000 - Terroni®).

O pó obtido na liofilização foi acondicionado em plástico laminado e embalado hermeticamente para evitar o contato com a luz e oxigênio, sendo armazenado em temperatura de congelamento (-18°C) até o momento da análise.

2.2. Reagentes

Os padrões de folatos, (6S)-5,6,7,8-tetraidrofolato de sódio (THF) e (6S)-5-metil-5,6,7,8-tetraidrofolato (5-MTHF), foram adquiridos dos laboratórios Dr. Schirck's (Jona, Switzerland). As soluções estoque dos padrões foram preparadas individualmente, na concentração de 200 µg/mL, com diluição em solução extratora (tampão fosfato 0,1 mol/L - Na₂HPO₄ e KH₂PO₄ - contendo 1% de ácido ascórbico e 0,1% de 2-mercaptoetanol). As soluções de trabalho foram preparadas a partir destas soluções estoque.

As enzimas utilizadas foram α-amilase (*Aspergillus oryzae* - Type X-A), protease (*Streptomyces griseus* - Type XIV) e a conjugase (Kidney acetone powder, porcine/ rim de porco) todas adquiridas na Sigma Chemical [St. Louis, MO, USA].

Para o preparo, cada enzima foi pesada separadamente e diluída no mesmo tampão de extração das amostras (tampão fosfato 0,1 mol/L - Na₂HPO₄ e KH₂PO₄ - contendo 1% de ácido ascórbico e 0,1% de 2-mercaptoetanol). O pH foi ajustado para 5,0 com HCl (2 mol/L) e para 7,0 com KOH (2 mol/L), de acordo com as etapas do tratamento e ponto ótimo de cada enzima. As soluções das enzimas foram preparadas antes de cada hidrólise, com 30 a 60 minutos de antecedência nas seguintes concentrações: α-amilase e conjugase (20 mg/mL) e protease (2 mg/mL).

Para a fase móvel, foi utilizada acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker Chemical Co.), ácido acético grau HPLC (J.T. Baker Chemical Co.) e água purificada no sistema Milli-Q (Millipore®) para o tampão acetato. Os reagentes foram fosfato de sódio monobásico anidro (Nuclear, Brasil); fosfato de potássio monobásico anidro (Synth, Brasil); hidróxido de potássio (Synth, Brasil); ácido clorídrico (Chemco,

Brasil); ácido ascórbico (Mallinckrodt Chemicals); 2-mercaptoetanol (Sigma, Brasil); todos com grau de pureza para análise.

As fases móveis foram filtradas em filtros Millipore® de PVDF, com poros de 0,45 µm de diâmetro.

2.3. Extração da Amostra

A metodologia de extração foi adaptada do trabalho de Jastrebova et al. (2003) para a amostra estudada.

Para a análise, 2g de feijão liofilizado foram pesados em tubos de centrífuga de 50 mL, utilizando balança analítica (Sartorius® BP221S), e adicionou-se 20 mL de tampão de extração (tampão fosfato 0,1 mol/L - Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 - contendo 1% de ácido ascórbico e 0,1% de 2-mercaptoetanol). Os tubos de centrífuga foram protegidos com papel alumínio para evitar o contato do extrato com a luz. Em seguida, os extratos foram homogeneizados durante 30 segundos em homogeneizador do tipo vortex (Phoenix®), depois submetidos à atmosfera de nitrogênio por 3 minutos, e vedados com tampa.

Os tubos foram colocados em água em ebulição (98°C – 100°C), por 10 minutos, e agitados por duas vezes nesse intervalo. Posteriormente, foram resfriados em água gelada (5°C) até alcançar a temperatura ambiente (30°C). Após esta etapa, seguiu-se para a centrifugação durante 1,5 minutos a 4000g (4°C) (Centrífuga SANYO/ Harrier 18/80). Do líquido sobrenadante, tomou-se 5 mL, que foi transferido para um novo tubo, onde foi realizada a etapa de hidrólise.

A metodologia de hidrólise enzimática foi adaptada dos trabalhos de Finglas et al. (1993), Konings et al. (1999) e Jastrebova et al. (2003) para a amostra estudada.

Durante a adequação da metodologia de hidrólise tri-enzimática, testes univariados foram realizados a fim de estabelecer a massa de amostra, o volume ideal de extrato a ser desconjugado e a eficiência de desconjugação de diferentes volumes de enzimas. Quando foi testada a variável massa, o volume de extrato foi fixado em 3 mL e 5 mL, e quando foi estudado o volume do extrato, então se utilizou o melhor resultado obtido para a massa da amostra, mantendo-se o maior

volume de extrato. A partir do melhor resultado obtido para massa e volume, realizou-se a variação do volume de enzima. Foram realizados três ensaios:

2.3.1. Tratamento tri-enzimático (α -amilase, conjugase e protease)

Os 5 mL do extrato foram transferidos para um novo tubo de centrífuga e tiveram o pH ajustado para 5,0 usando HCl (2 mol/L). Foram então adicionados 1,5 mL da solução de conjugase (20 mg/mL) e 1,5 mL da solução de α -amilase (20 mg/mL). A solução foi incubada no banho metabólico (Marconi®), com temperatura mantida a 37°C, sob agitação durante 3 horas. Após a incubação, os tubos foram retirados e o pH ajustado a 7,0 usando KOH (2 mol/L). Foi adicionado ao tubo 1,5 mL de solução de protease (2 mg/mL) e os tubos foram novamente incubados no banho a 37°C, sob agitação por 1 hora. Por fim, foi submetido ao banho quente (98-100°C) por 5 minutos para inativação das enzimas, e posteriormente arrefecidos em banho frio (5°C) por 3 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada durante 20 minutos a 4000g (4°C), o sobrenadante foi recolhido e filtrado em filtros de membrana de PVDF (Millipore®) de poro de 0,22 μ m de diâmetro e injetado imediatamente no cromatógrafo líquido.

2.3.2. Tratamento di-enzimático (α -amilase e conjugase)

O mesmo procedimento relatado para o tratamento tri-enzimático foi realizado para o tratamento di-enzimático, excluindo-se a etapa de incubação com a protease. Ou seja, as amostras foram hidrolisadas com α -amilase e conjugase por 3h a 37°C e em seguida as enzimas foram inativadas no banho quente (98-100°C), resfriadas até temperatura ambiente e centrifugadas 20 minutos a 4000g (4°C). O sobrenadante foi recolhido e filtrado em filtros de membrana de PVDF (Millipore®) de poro de 0,22 μ m de diâmetro e injetado imediatamente no cromatógrafo líquido.

2.3.3. Tratamento mono-enzimático (conjugase)

Repetiu-se o mesmo procedimento relatado para o tratamento di-enzimático, entretanto, utilizando somente a conjugase.

2.3.4. Extração sem hidrólise enzimática

Foi realizada a extração da amostra, sem a etapa de hidrólise enzimática, e o extrato foi imediatamente injetado no cromatógrafo líquido.

A Figura 1 apresenta um fluxograma da metodologia de extração e dos diferentes tratamentos enzimáticos, incluindo a extração sem hidrólise enzimática.

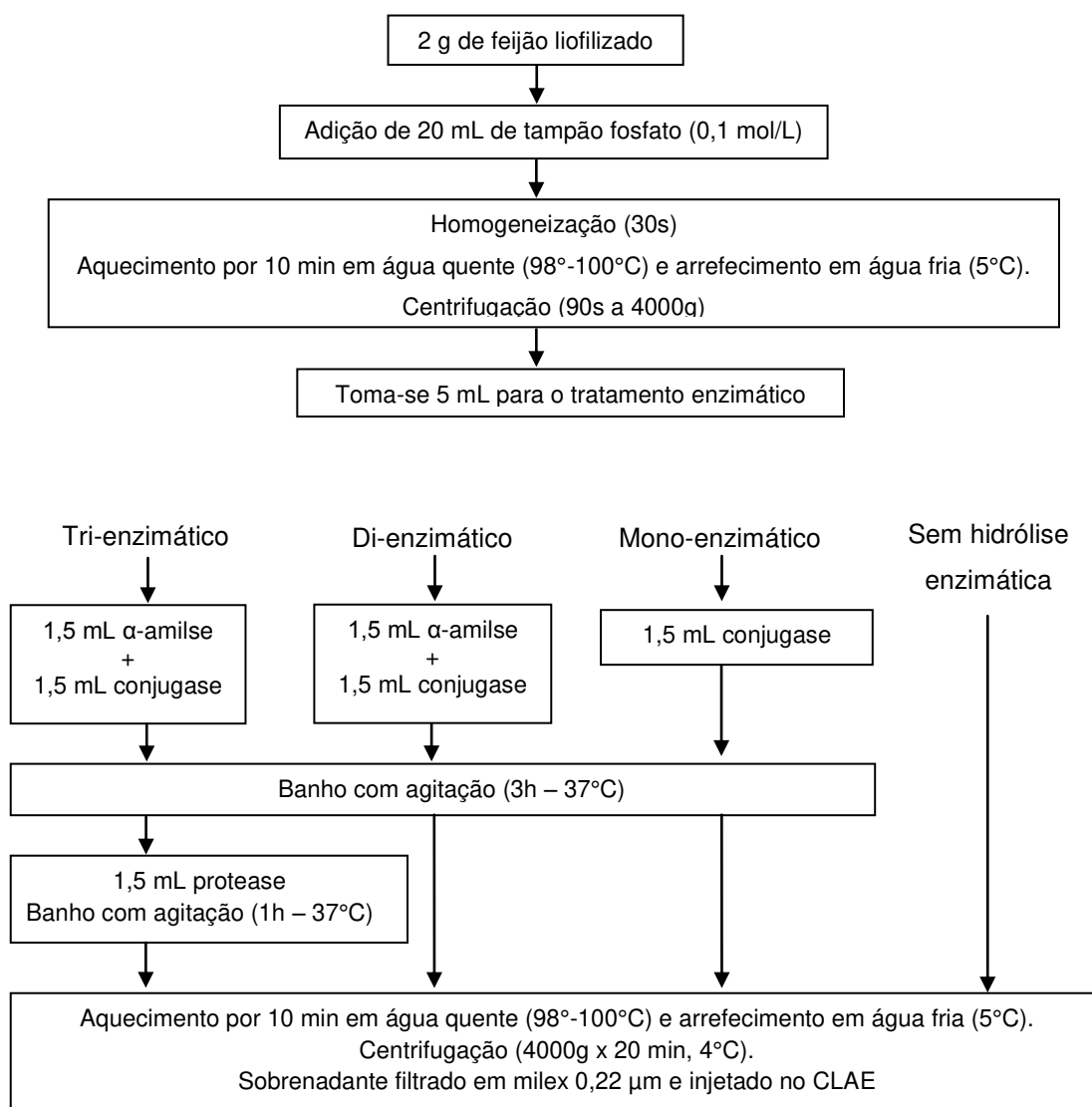


Figura 1. Fluxograma da metodologia de extração utilizando os tratamentos enzimáticos empregados para a análise de folatos em feijão.

2.4. Análise de folatos por CLAE

Para a determinação dos folatos foi utilizada a metodologia desenvolvida e validada por Catharino e Godoy (2004), adaptada à matriz.

Após a injeção de 30 µL do extrato hidrolisado de feijão, os folatos foram separados em um cromatógrafo líquido HP (HELWETT PACKARD) série 1100, com degaseificador, bomba quaternária, sistema de injeção automática, detectores de arranjo de diodos (DAD) (UV-Visível) e de fluorescência dispostos em série. Foi utilizada uma coluna cromatográfica C₁₈ com partículas de 3 µm, 10 mm x 4,6 mm d.i. (Acer®, Scotland) e sistema de eluição por gradiente com vazão de 0,5 mL/min, desenvolvido com 100% de solução acidificada (2% de ácido acético; pH ajustado para 2,8 com KOH) no início, chegando em 15 min a 76% de solução acidificada e 24% de acetonitrila (v/v). A partir desse ponto voltou-se às condições iniciais (100% fase móvel acidificada), mantendo-se por 5 minutos para condicionamento da coluna. As duas formas de folatos (THF e 5-MTHF) foram detectadas utilizando-se a fluorescência natural desses compostos (λ_{exc.} 290 nm e λ_{emis} 360 nm). Todo o sistema foi controlado pelo programa Chemstation-HP, que também gerencia o sistema de aquisição e tratamento de dados.

A identificação dos folatos foi feita por comparação entre os tempos de retenção, obtidos com os padrões analisados nas mesmas condições, por co-cromatografia e pelos espectros obtidos com a utilização do detector de fluorescência.

2.5. Avaliação do Método

Uma vez que a metodologia utilizada foi desenvolvida para outras matrizes alimentícias sem a aplicação de hidrólise enzimática, testes de repetibilidade, limites de detecção e quantificação, e a curva de calibração foram determinados. A avaliação foi realizada em padrão justificada pela falta de matriz semelhante, isenta de folatos.

2.5.1. Repetibilidade

Este parâmetro foi avaliado através de 10 determinações. A repetibilidade foi calculada segundo CALCUTT e BRODDY (1983), através da equação:

$$r = t \sqrt{2 \cdot sr} \quad \text{onde } r = \text{repetibilidade, com significância de 95\%}$$

sr = estimativa do desvio padrão

2.5.2. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção foi estimado através de diluições sucessivas do padrão. Foi considerado como limite de detecção a menor quantidade detectável do padrão que produziu um sinal de amplitude três vezes maior que o ruído ($S/R \geq 3$) (CALCUTT e BRODDY, 1983).

O limite de quantificação foi considerado como sendo seis vezes o limite de detecção.

2.5.3. Curva de Calibração

A quantificação foi realizada por padronização externa e construiu-se a curva analítica com 7 níveis de concentração, sendo cada ponto injetado em triplicata.

2.6. Análise Estatística

A análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey foram aplicados usando o software Statistica (versão 7.0), para identificar possíveis diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os lotes de feijão, e para verificar se houveram diferenças no conteúdo de folatos entre os diferentes tratamentos.

3. Resultados e Discussão

Foram identificados apenas o tetraidrofolato (THF) e o 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF), assim, a metodologia de análise por CLAE foi modificada em relação à metodologia inicial, desenvolvida por Catharino e Godoy (2004). O tempo de gradiente da fase móvel (76 tampão acetato: 24% acetonitrila) passou de 25 para 15 minutos, e retornou a 100%, mantendo-se essa condição até 20 minutos. Em virtude das características da amostra, a corrida foi reduzida de 31 para 20 minutos.

Em relação aos parâmetros avaliados, a repetibilidade do método de quantificação de folatos em feijão apresentou um coeficiente de variação igual a 4,03% para o THF e 7,44% para o 5-MTHF, e a precisão intermediária apresentou um coeficiente de 5,25 e 8,25% para o THF e 5-MTHF respectivamente. Os limites de detecção e quantificação para o THF foram 0,9 e 5,4 ng/mL e para o 5-MTHF

0,7 e 4,2 ng/mL. As concentrações das curvas foram de 5,4 a 350 ng/mL para THF ($Y = 1822,4x + 0,2679$; $R^2 = 0,998$) e 4,2 a 35 ng/mL para 5-MTHF ($Y = 1838x + 0,2$; $R^2 = 0,999$). A linearidade foi confirmada através da aleatoriedade dos resíduos, da significância da regressão e do ajuste do modelo.

Os resultados dos testes univariados realizados para a adequação da metodologia de hidrólise enzimática estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Testes (univariados) da influência de algumas variáveis na extração de folatos.

VARIÁVEIS		Teor de Folatos ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	
		THF	5-MTHF
Massa da amostra (mg)	1,0	185,7 $\pm$ 11,9 ^b	30,5 $\pm$ 4,2 ^b
	2,0	265,0 $\pm$ 28,5 ^a	49,4 $\pm$ 4,7 ^a
	4,0	192,3 $\pm$ 16,2 ^b	35,1 $\pm$ 5,4 ^b
Volume de extrato (mL) submetido à hidrólise	3,0	264,1 $\pm$ 24 ^a	24,1 $\pm$ 5,5 ^b
	5,0	249,7 $\pm$ 6,7 ^a	48 $\pm$ 8,1 ^a
Volume de Enzima (mL) (conjugase, α -amilase, protease)	1,0	134,3 $\pm$ 10,3 ^{ab}	29,0 $\pm$ 5,6 ^b
	1,25	112,4 $\pm$ 4,7 ^b	32,7 $\pm$ 3,2 ^b
	1,5	163,3 $\pm$ 27,6 ^a	78,6 $\pm$ 10,1 ^a

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de análises realizadas em triplicata. Médias de cada teste (n=3) seguidas pela mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

De acordo com os resultados dos testes, os maiores teores de folatos foram obtidos com a massa de 2 g de feijão. Em relação ao volume de extrato submetido ao processo de hidrólise enzimática, a diferença não foi estatisticamente significativa entre os teores de THF, entretanto, utilizando o volume de 5 mL, obteve-se maior teor de 5-MTHF. Para o volume de enzimas usadas na desconjugação, os melhores teores de folatos foram obtidos com 1,5 mL de cada enzima. A partir destes ensaios, utilizou-se 2 g de massa, 5 mL de extrato para a hidrólise enzimática e 1,5 mL de cada enzima na etapa de desconjugação.

A seleção de pH foi baseada em estudos que demonstraram que o pH 5,0 é ideal para a atuação das enzimas conjugase e α -amilase, e o pH 7,0 é adequado e eficaz para a protease (RUGGERI et al., 1999; QUIRÓS, 2004).

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados para o teor de folatos do feijão carioca cozido/liofilizado, bem como as formas identificadas pelos diferentes tratamentos aplicados (Figura 2).

Somente o tratamento tri-enzimático foi capaz de identificar o 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF). Já a hidrólise utilizando o tratamento di-enzimático, mono-enzimático e a extração sem hidrólise enzimática, o 5-MTHF não foi identificado.

O tetraidrofolato (THF) foi a forma predominante de folato encontrado no feijão carioca. Estudos de Rychlik et al. (2007) relataram que a abundância das isoformas de folatos podem ser bastante diferenciadas nas leguminosas, por exemplo, em ervilhas congeladas, lentilhas secas, feijão verde o 5-MTHF foi a forma mais abundante. Já em feijões frescos e em soja o THF foi predominante, o que corrobora os dados deste trabalho.

Tabela 2. Comparação do teor de folatos dos tratamentos aplicados ao feijão carioca (base seca).

TRATAMENTO	LOTES	Concentração de Folatos (µg/100g)	
		THF	5-MTHF
TRI-ENZIMÁTICO	1	192,9 ± 13,6 ^{ab}	44,9 ± 0,7 ^a
	2	151,0 ± 3,4 ^b	54,4 ± 16,7 ^a
	3	225,6 ± 16,4 ^a	49 ± 4,7 ^a
	Média	189,8 ± 34,8 ^A	49,4 ± 8,8
AMILASE + CONJUGASE	1	170,1 ± 3,2 ^b	Nd
	2	199,7 ± 11,9 ^{ab}	Nd
	3	259,7 ± 22,3 ^a	Nd
	Média	209,8 ± 42,3 ^A	Nd
CONJUGASE	1	118,5 ± 4,2 ^c	Nd
	2	192,8 ± 7,6 ^b	Nd
	3	284,5 ± 10,3 ^a	Nd
	Média	198,6 ± 74,6 ^A	Nd
EXTRAÇÃO S/ HIDRÓLISE	1	37,1 ± 7,3 ^a	Nd
	2	52,5 ± 13,4 ^a	Nd
	3	36,0 ± 7,9 ^a	Nd
	Média	41,8 ± 11,7 ^B	Nd

Resultados expressos em base seca como média ± desvio padrão de análises realizadas em triplicata.

Médias de cada lote (n=3) seguidas pela mesma letra minúscula, nas colunas, para o mesmo feijão não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n=9) seguidas pela mesma letra maiúscula, nas colunas, para o mesmo feijão não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

nd (não determinado).

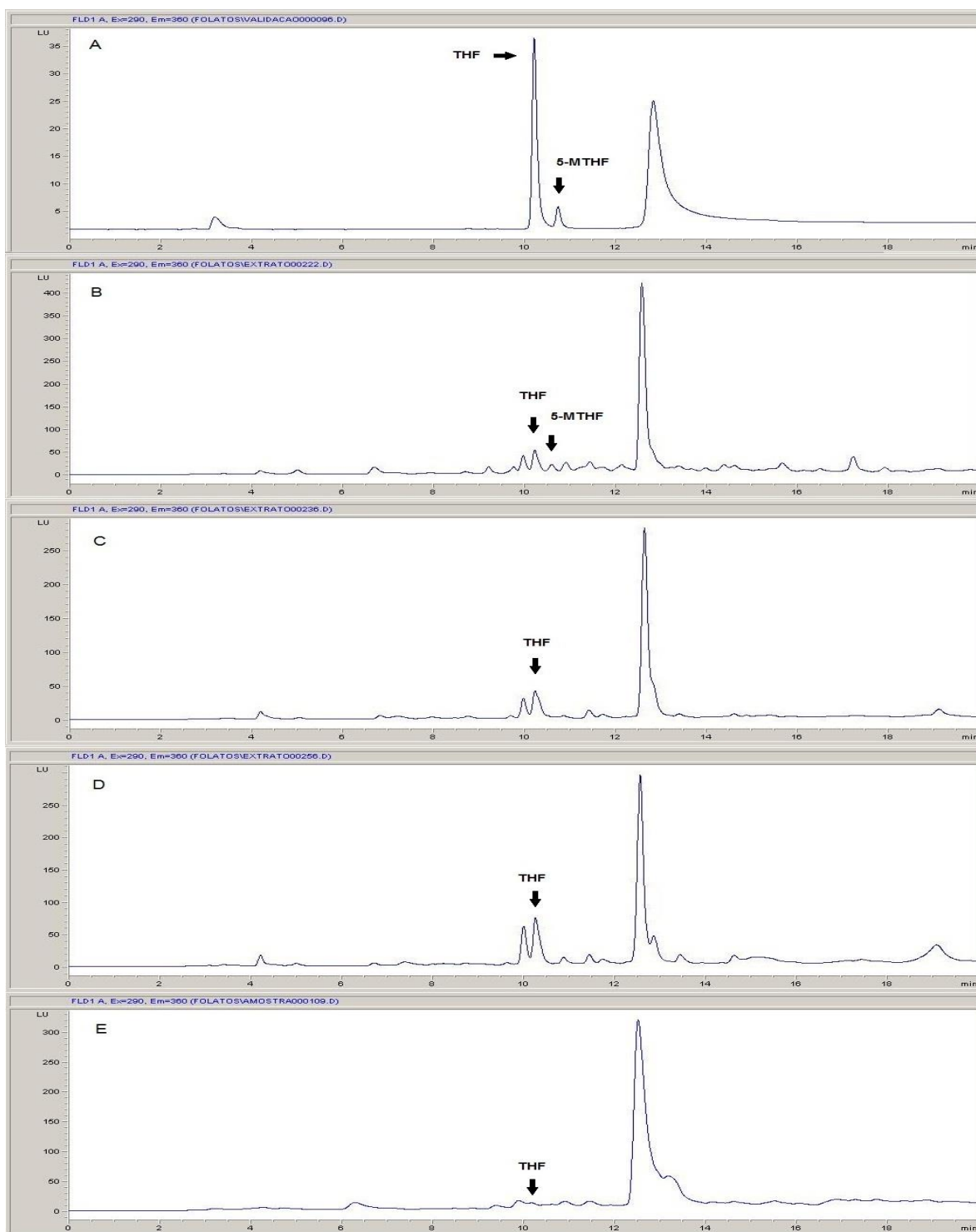


Figura 2. Perfil cromatográfico da solução padrão (A) e dos diferentes tratamentos em feijão carioca/liofilizado. Tratamento tri-enzimático (α -amilase, conjugase e protease) (B), di-enzimático (α -amilase e conjugase) (C), mono-enzimático (conjugase) (D), tratamento sem hidrólise enzimática (E). As condições cromatográficas estão descritas no texto. Detecção por fluorescência (λ_{exc} 290nm e λ_{emis} 360nm).

Entre os tratamentos enzimáticos aplicados, não houve diferença significativa a nível de 95% para o THF. No entanto, a hidrólise enzimática foi fundamental para sua determinação. Com relação ao 5-MTHF, apenas com o tratamento tri-enzimático foi possível a sua determinação. Os resultados corroboram como os dados de Martin et al. (1990) e De Souza e Eitenmiller (1990), que afirmam a necessidade do tratamento tri-enzimático para a determinação de folatos em alimentos.

Em relação à variação entre lotes, nos tratamentos tri-enzimático, di-enzimático e sem hidrólise enzimática, dois lotes diferiram entre si, a um nível de 95% de significância para análise do THF. Já no tratamento mono-enzimático, todos os lotes diferiram entre si para o mesmo nível de significância. Essas variações entre os lotes podem ser relacionadas ao estado fisiológico das plantas, tipo de solo, cultivo, irrigação, exposição à luz, presença de minerais como magnésio e potássio, que são bastante importantes na produção de folatos pelos vegetais, participando de uma das etapas da biossíntese dessa vitamina (SCOTT et al., 2000).

O conteúdo total de folato (THF + 5-MTHF) foi menor para o tratamento sem hidrólise enzimática. Quando o tratamento tri-enzimático foi realizado, os valores de folatos aumentaram 12, 17 e 82% em relação ao tratamento di-enzimático, mono-enzimático e sem hidrólise enzimática respectivamente, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Percentual (%) de aumento no teor de folatos totais, na comparação entre tratamentos.

Alimento	Folatos Totais (µg/100g)				% de aumento		
	M	D	T	S/H	D – T	M – T	S/H – T
Feijão Carioca (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	198,6	209,8	239,2	41,8	12%	17%	82%

% de aumento = (valor de folato por T – valor de folato por S/H ou A/C ou C) ÷ valor de folato por T x 100 (Konings et al., 2001). M = Mono-enzimático (conjugase); D = Di-enzimático (amilase/conjugase); T = Tri-enzimático (amilase/protease/conjugase); S/H = Sem hidrólise;

Yon e Hyun (2003) compararam valores de folatos totais de feijões crus consumidos na Coreia, submetidos ao tratamento tri-enzimático e mono-enzimático. Os valores encontrados foram 170 µg/100g para o tratamento mono-enzimático e 238 µg/100g para o tratamento tri-enzimático. Este trabalho foi o único na literatura, que avaliou as diferentes formas de hidrólise enzimática em feijões.

Em relação ao tratamento tri-enzimático aplicado a outras matrizes alimentícias, Tamura e Messing (1997) obtiveram um aumento de 270% no teor folatos em diferentes alimentos após o tratamento tri-enzimático em comparação ao tratamento mono-enzimático. Lim et al. (1998) relataram que o teor de folatos no leite humano aumentou em 85% após o tratamento tri-enzimático. Aiso e Tamura (1998) obtiveram um aumento de 22,3 a 51% no valor do espinafre quando o tratamento tri-enzimático foi comparado ao mono-enzimático. Shrestha et al. (2000) relataram aumento de 4% dos folatos totais em pão branco, 33% em arroz e 34% em macarrão. Johnston et al. (2001) relataram aumento de cerca de 45% em conteúdo de folatos de produtos lácteos após o tratamento tri-enzimático em relação ao mono-enzimático. Johnston et al. (2002) analisaram 56 alimentos consumidos em fast food e obtiveram aumento de 15% a 76% nos valores de folatos utilizando o tratamento tri-enzimático, em relação ao mono-enzimático. Hyun e Tamura (2005) demonstraram que o método tri-enzimático resultou em aumento de mais de 50% no teor de folato significativo de carne, leite de vaca, pão branco e espinafre sob o tratamento mono-enzimático.

4. Conclusões

O tratamento tri-enzimático foi o mais eficiente para a determinação de folatos em feijão em relação aos outros tratamentos, enzimático e não enzimático, além de ser o único tratamento que possibilitou a detecção do 5-MTHF, resultando na detecção de valor vitamínico até 17% mais elevado.

5. Referências Bibliográficas

- ALSO, K.; TAMURA, T. Trienzyme treatment for food folate analysis: optimal ph and incubation time for α -amylase and protease treatments. **Nutr Sci Vitaminol**, v. 44, p. 361-370, 1998.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais**. Diário oficial da união, Brasília, 23 de setembro de 2005. Disponível em <www.anvisa.gov.br>. Acesso em 11/07/2013.
- ARCOT, J.; SHRESTHA, J. Folate: methods of analysis. **Trends Food Sci Technol**, v. 16, p. 253–266, 2005.
- CALCUTT, R., BRODDY, R. **Statistic for Analytical Chemists**. 1 ed. Chapman and Hall, Londres. 1983. 1007p.
- CATHARINO, R. R. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de folatos em alimentos**. 2004. 96f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2004.
- CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T.; LIMA-PALLONE, J. A. Metodologia analítica para determinação de folatos e ácido fólico em alimentos. **Quim. Nova**, v. 29, n. 5, p. 972-976, 2006.
- CAUDILL, M. A. Folate bioavailability: implications for establishing dietary recommendations and optimizing status. **Am J Clin Nutr**, v.91, p.1455S–60S, 2010.
- DE SOUZA, S.; EITENMILLER, R. Effects of different enzyme treatments on extraction of total folate from various foods prior to microbiological assay and radioassay. **J Micronutr Anal**, v. 7, p. 37–57, 1990.
- DELCHIER, N.; RINGLING, C.; GRANDOIS, J. L.; WERNER, D. A.; GALLAND, R.;GEORGÉ, S.; RYCHLIK, M.; RENARD, C. M. G. C. Effects of industrial processing on folate content in green vegetables. **Food Chemistry**, v. 139, p. 815–824, 2013.
- DEVI, R., ARCOT, J., SOTHEESWARAN, S., ALI, S. Folate contents of some selected Fijian foods using tri-enzyme extraction method. **Food Chemistry**, v. 106, p.1100 - 1104, 2008.
- DOHERTY, R. F.; BEECHER, G. R. A Method for the Analysis of Natural and Synthetic Folate in Foods. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 354-361, 2003.
- DONG, W.; CHENG, Z.; WANG, X.; WANG, B.; ZHANG, H.; SU, N.; YAMAMARO, C.; LEI, C.; WANG, J.; WANG, J.; ZHANG, X.; GUO, X. Determination of folate content in rice germplasm (*Oryza sativa* L.) using tri-enzyme extraction and microbiological assays. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 62, n. 5, p. 537–543, 2011.
- FINGLAS, M. P.; WRIGHT, J. A. A. Folate bioavailability and health. **Phytochemistry Reviews** 1, p. 189–198, 2002.
- FINGLAS, P. M.; FAURE, U.; SOUTHGATE, D. A. T. First BCR – intercomparison on the determination of folates in food. **Food Chem**, v. 46, p. 199-213, 1993.
- HYUN, T. H.; TAMURA, T. Trienzyme Extraction in Combination with Microbiologic Assay in Food Folate Analysis: An Updated Review. **Experimental Biology and Medicine**, v. 230, p. 444-454, 2005.
- IWATANI, Y.; ARCOT, J.; SHRESTHA, A. K. Determination of folate contents in some Australian vegetables. **J. Food Comp. Anal.**, v.16, p. 37-48, 2003.
- IYER, R.; TOMAR, S. K. Folate: A Functional Food Constituent. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 9, 2009.

- JASTREBOVA, J.; WITTHO, C.; GRAHN, A.; SVENSSON, U.; GERSTAD, M. HPLC determination of folates in raw and processed beetroots. **Food Chemistry**, v. 80, p. 579–588, 2003.
- JOHNSTON, K. E.; DIRIENZO, D. B.; TAMURA, T. Folate Content of Dairy Products Measured by Microbiological Assay with Trienzyme Treatment. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 2, 2001.
- JOHNSTON, K. E.; LOFGREN, P. A. TAMURA, T. Folate concentrations of fast foods measured by trienzyme extraction method. **Food Research International**, v. 35, p.565–569, 2002.
- KONINGS, E. J. M. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver, and flour. **Journal of AOAC International**, v. 82, n.1, 1999.
- KONINGS, E. J. M.; ROOMANS, H. H.; DORANT, E.; GOLDBOHN, R. A.; SARIS, W. H.; VAN DEN BRANDT, P. A. Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. **Am J Clin Nutr**, v. 73, p.765–76, 2001.
- LIM, H. S.; MACKEY, A. D.; TAMURA, T.; WONG, S. C.; PICCIANO, M. F. Measurable human milk folate is increased by treatment with α -amylase and protease in addition to folate conjugase. **Food Chemistry**, v. 63, n. 3, p. 401-407, 1998.
- MARTIN, J. I.; LANDEN, W. O.; SOLIMAN, A. G. M.; EITENMILLER, R. R. Application of a tri-enzyme extraction for total folate determination in foods. **J Assoc Off Anal Chem**, v. 3, p. 805–808, 1990.
- PFEIFER, C. M.; ROGERS, L. M.; GREGORY, J. F. Determination of Folate in Cereal - Grain Food Products Using Trienzyme Extraction and Combined Affinity and Reversed-Phase Liquid Chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, p. 407-413, 1997.
- QUIRÓS, A. R. B.; RON, C. C.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J.; LAGE-YUSTY, M. A. Determination of folates in seaweeds by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p. 135–139, 2004.
- RUGGERI, S.; AGUZZI, A.; CARNOVALE, E. Folate nutritional importance and evaluation of different method for their determination in food. **La Rivista di scienza dell'alimentazione**, v. 28, n. 3, p. 45–54, 1999.
- RYCHLIK, M.; ENGLERT, K.; KAPFERA, S.; KIRCHHOFF, E. Folate contents of legumes determined by optimized enzyme treatment and stable isotope dilution assays. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 411–419, 2007.
- SCOTT, J.; RÉBEILLE, F.; FLETCHER, J. Review: Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **J. Sci. Food Agric.**, v. 80, p. 795-824, 2000.
- SHRESTHA, A. K.; ARCOT, J.; PATERSON, J. Folate assay of foods by traditional and tri-enzyme treatments using cryoprotected *Lactobacillus casei*. **Food Chemistry**, v. 71, p. 545-552, 2000.
- TAMURA, T.; MESSING, B. Bioavailability of acid folic in fortified food. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, n. 6, p. 1299 -1300, 1997.
- YON, M.; HYUN, T. H. Folate content of foods commonly consumed in Korea measured after trienzyme extraction. **Nutrition Research**, v. 23, p. 735–746, 2003.

“ANÁLISE DE FOLATOS EM DIFERENTES VARIEDADES DE
FEIJÕES UTILIZANDO TRATAMENTO TRI-ENZIMÁTICO”

Elenice C. E. Cunha e Helena T. Godoy *

Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), CEP 13083-862,
Campinas-SP, Brasil.

RESUMO

As leguminosas, como o feijão, constituem excelentes fontes de carboidratos, proteínas, fibras, minerais e vitaminas do complexo B, principalmente os folatos. No entanto, o teor de folatos é influenciado, entre outros fatores, pelo genótipo da planta, assim diferentes tipos de feijão podem apresentar diferentes teores de composição de folatos. Outro fator importante a ser considerado é a estabilidade das várias formas de folatos ao processamento, principalmente térmico, aos quais os feijões são submetidos antes do consumo. Contudo, o objetivo deste trabalho foi determinar o teor de folatos em cinco variedades de feijão (carioca, preto, vermelho, branco e de corda), crus e cozidos/liofilizados, pelo método desenvolvido por Cunha (2013) (capítulo 2), e avaliar a perda de processamento. Para a extração dos folatos foram tomados 2 g de feijão e 20 mL de tampão fosfato. Do extrato, 5 mL seguiram para a hidrólise tri-enzimática, foram aquecidos, centrifugados e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). No processo cromatográfico utilizou-se coluna C₁₈ e sistema de eluição gradiente, sendo a fase móvel composta por tampão acetato e acetonitrila, em 20 minutos de corrida. A detecção foi feita a λ_{exc} 290 nm e λ_{emis} 360 nm e a quantificação por padronização externa. Ao contrário da literatura, o congênera majoritário encontrado em todos os feijões foi o THF, cujos valores variaram de 20,3 a 1484 $\mu\text{g}/100\text{g}$ nas amostras cruas e de 15,3 a 1207 $\mu\text{g}/100\text{g}$ nas amostras cozidas. E o 5-MTHF, em menor concentração, variou de não determinado a 60,3 $\mu\text{g}/100\text{g}$ nas amostras cruas e de não determinado a 31,3 $\mu\text{g}/100\text{g}$ nas amostras cozidas. Houve perda de folatos durante o cozimento, principalmente do 5-MTHF, e, além disso, a análise entre lotes demonstrou diferenças significativas entre si, que pode ser devido à diversidade das condições de cultivo e variação de genótipos do feijão. Contudo, o feijão cultivado no Brasil, fonte barata, acessível e muito consumida pela maioria da população, demonstrou ser uma excelente fonte da vitamina.

Palavras-chave: Teor de folatos, feijões crus, feijões cozidos/liofilizados, perda de processamento, tetraidrofolato.

ABSTRACT

Legumes, such as beans, are excellent sources of carbohydrates, protein, fiber, minerals and B vitamins, especially folates. However, the folates are influenced, among other factors, by the genotype of the plant thus, different types of beans may have different amounts of folates composition. Another important factor to be considered is the stability of the different forms of folates during processing, especially heat, to which the beans are submitted before consumption. The aim of this study was to determine the levels of folates in five varieties of raw and cooked/lyophilized beans (carioca, black, red, white and cowpea), by the method developed by Cunha (2013) (Chapter 2), as well as evaluate the loss of folates during the processing. For the extraction of folates, 2 g of beans were used and then 20 mL of phosphate buffer were added. From the extract, 5 mL were used for the tri-enzymatic hydrolysis, they were heated, centrifuged and analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). For the chromatographic process was used a C18 column and gradient elution system, and the mobile phase were consisted of acetate buffer and acetonitrile, totaling 20 minutes of running. The absorbance was read made at λ_{exc} . 290 nm and 360 nm λ_{emis} and quantified by external standardization. Contradicting previous reports, the major congener found in all beans was THF, with values ranging from 20.3 to 1484 $\mu\text{g}/100\text{g}$ for the raw samples and from 15.3 to 1207 $\mu\text{g}/100\text{g}$ for the cooked samples. The 5-MTHF, present in a small concentration, ranged from 60.3 $\mu\text{g}/100\text{g}$ to not determined in the raw samples and from 31.3 $\mu\text{g}/100\text{g}$ to cooked samples. Were observed loss of folate during cooking, especially for 5-MTHF, in addition, the analysis showed significant differences between batches, which can be due to the different growing conditions and variation bean genotypes. However, the beans grown in Brazil, a cheap source, accessible and very consumed by the majority of the population, proved to be an excellent source of vitamin.

Keywords: Levels of folates, raw beans, cooked/lyophilized beans, processing loss, tetrahydrofolate.

1. Introdução

O feijão é um alimento tradicional na mesa dos brasileiros, cultivado por pequenos e grandes produtores, e apresenta consumo médio de 17,6 kg/hab/ano (IBGE, 2013). Os feijões mais consumidos no Brasil são do gênero *Phaseolus vulgaris* L., chamados feijões comuns, e do gênero *Vigna unguiculata* Walp., conhecido como feijão de corda (CONAB, 2013). Segundo o Regulamento Técnico do Feijão (2008), os gêneros citados são classificados como feijão preto, branco, cores e misturado, de acordo com a cor do tegumento.

A leguminosa é uma excelente fonte de proteínas (18-25%), é rica em fibras dietéticas (3-7%) e apresenta baixo teor de gordura (1-4%). Além disso, feijões secos contêm altos níveis de carboidratos (61-76%) e não contêm colesterol (DURANTI, 2006). Em relação aos micronutrientes, são uma boa fonte de minerais como ferro, cálcio e zinco e vitaminas do complexo B, destacando-se os folatos (HEFNI et al., 2010).

Os folatos pertencem à classe de vitaminas do complexo B, são solúveis em água, e também são chamadas de vitamina B_C, B₉ ou M. Previnem problemas de desenvolvimento no tubo neural de fetos, e estão associados à prevenção de doenças cardiovasculares por diminuir o nível de homocisteína plasmática (GREGORY e QUINLIVAN, 2002; IYER e TOMAR, 2009; DONG et al., 2011). Descritos como moléculas sensíveis, podem ser degradadas pelo calor, luz e oxidação, que leva à clivagem em uma pteridina e um ácido para-aminobenzóico permanecendo ligado a uma cadeia poliglutâmica, mas sem função biológica (SCOTT et al., 2000), e devido ao seu caráter hidrofílico, podem ser facilmente eliminados por lixiviação (STEINDAL et al., 2006; LIMA-PALLONE et al., 2008).

Os métodos utilizados para a análise de folatos devem apresentar algumas características indispensáveis, como a separação individual das suas diferentes formas (CATHARINO e GODOY, 2004). Devido ao uso de enzimas amilolíticas, proteolíticas e de conjugases, o método de extração tri-enzimática é o mais amplamente usado para a determinação de folatos em matrizes alimentares. Seguido pela análise por cromatografia, faz com que seja possível obter dados

sobre as várias formas de folatos (ARCOT e SHRESTHA, 2005; HYUN e TAMURA, 2005; STEINDAL et al., 2006).

Assim, o objetivo deste trabalho foi aplicar o tratamento tri-enzimático e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação do teor de folatos em cinco diferentes variedades de feijões, crus e cozidos, bem como quantificar as perdas vitamínicas no processo de cozimento.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostra

Amostras de feijão carioca, feijão preto e feijão branco de uma única marca, foram adquiridos em supermercados da cidade de Campinas (SP). O feijão vermelho foi adquirido em Ubá (MG) e o feijão de corda em Fortaleza (CE). Para cada lote, duas embalagens de 1kg foram homogeneizadas e 200g da amostra foram tomadas para os diferentes tratamentos. As análises foram realizadas em três lotes diferentes, sendo cada lote em triplicata para cada amostra, exceto para o feijão branco, cujo produto só foi encontrado em dois lotes diferentes.

Na análise dos feijões crus, os grãos foram moídos em moinho analítico (IKA® modelo A-11) até obter a farinha do feijão. Posteriormente foram peneirados em peneira de 20 *mesh* para obter um pó homogêneo, acondicionados em plástico laminado e hermeticamente embalados, evitando o contato com a luz e oxigênio. Posteriormente, foram armazenados em temperatura de congelamento (-18°C) até o momento da análise.

Na análise dos feijões cozidos, foi realizada a cocção dos grãos em panela de pressão doméstica (Pressionela® 3L), seguindo as recomendações do fabricante presentes no rótulo de cada marca. Os feijões foram lavados e cozidos em 800 mL de água (proporção 1:4) por 30 minutos. Apenas o feijão branco foi submetido ao remolho por 4h, antes do cozimento, e cozido por 10 min conforme as características dos grãos. Após o cozimento, os grãos e o caldo foram homogeneizados em liquidificador industrial (Colombo®) por 5 minutos, até obter uma consistência uniforme do alimento. Em seguida, foram congelados por 12h e

submetidos à liofilização, utilizando o liofilizador (LS3000 - Terroni®), por 24h. O pó obtido na liofilização foi acondicionado em plástico laminado e embalado hermeticamente para evitar o contato com a luz e oxigênio, sendo armazenado em temperatura de congelamento (-18°C) até o momento da análise.

2.2. Determinação de umidade

O teor de umidade das amostras cruas e liofilizadas foi determinado para verificar o percentual de água e sólidos secos. Utilizou-se o método por secagem em estufa (Nova ética 400/3ND, N° série 0766/00) a temperatura de 105°C, até peso constante (aproximadamente 15h). As determinações foram feitas em triplicata.

2.3. Reagentes

Os padrões de folatos, (6S)-5,6,7,8-tetraidrofolato de sódio (THF) e (6S)-5-metil-5,6,7,8-tetraidrofolato (5-MTHF), foram adquiridos dos laboratórios Dr. Schirck's (Jona, Switzerland). As soluções estoque dos padrões foram preparadas individualmente, na concentração de 200 µg/mL, com diluição em solução extratora (tampão fosfato 0,1 mol/L - Na₂HPO₄ e KH₂PO₄ - contendo 1% de ácido ascórbico e 0,1% de 2-mercaptoetanol). As soluções de trabalho foram preparadas a partir destas soluções estoque.

As enzimas utilizadas foram α-amilase (*Aspergillus oryzae* - Type X-A), protease (*Streptomyces griseus* - Type XIV) e a conjugase (Kidney acetone powder, porcine/ rim de porco) todas adquiridas na Sigma Chemical [St. Louis, MO, USA].

Para o preparo, cada enzima foi pesada separadamente e diluída no mesmo tampão de extração das amostras (tampão fosfato 0,1 mol/L - Na₂HPO₄ e KH₂PO₄ - contendo 1% de ácido ascórbico e 0,1% de 2-mercaptoetanol), e o pH foi ajustado para 5,0 com HCl (2 mol/L) e para 7,0 com KOH (2 mol/L), de acordo com as etapas do tratamento e ponto ótimo da conjugase/α-amilase e protease respectivamente. As soluções das enzimas foram preparadas antes de cada

hidrólise, com 30 a 60 minutos de antecedência nas seguintes concentrações: α -amilase e conjugase (20 mg/mL) e protease (2 mg/mL).

Para a fase móvel, foi utilizada acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker Chemical Co.), ácido acético grau HPLC (J.T. Baker Chemical Co.) e água purificada no sistema Milli-Q (Millipore®) para o tampão acetato. Os reagentes foram fosfato de sódio monobásico anidro (Nuclear, Brasil); fosfato de potássio monobásico anidro (Synth, Brasil); hidróxido de potássio (Synth, Brasil); ácido clorídrico (Chemco, Brasil); ácido ascórbico (Mallinckrodt Chemicals); 2-mercaptoetanol (Sigma, Brasil); todos com grau de pureza para análise. As fases móveis foram filtradas em filtros Millipore® de PVDF, com poros de 0,45 μ m de diâmetro.

2.4. Extração e Hidrólise da Amostra

A metodologia de extração utilizada foi desenvolvida por Cunha (2013) (capítulo 2) para a amostra estudada.

Para a análise tanto do feijão cru como cozido, 2g de feijão foram pesados em tubos de centrífuga de 50 mL, utilizando balança analítica (Sartorius® BP221S), e adicionou-se 20 mL de tampão de extração (tampão fosfato 0,1 mol/L - Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 - contendo 1% de ácido ascórbico e 0,1% de 2-mercaptoetanol). Os tubos de centrífuga foram protegidos com papel alumínio para evitar o contato do extrato com a luz. Em seguida, os extratos foram homogeneizados durante 30 segundos em homogeneizador do tipo vortex (Phoenix®) e depois submetidos à atmosfera de nitrogênio por 3 minutos, e vedados com tampa.

Os tubos foram colocados em água em ebulição (98°C – 100°C), por 10 minutos, e agitados por duas vezes nesse intervalo. Posteriormente, foram resfriados em água gelada (5°C) até alcançar a temperatura ambiente (30°C). Após esta etapa, seguiu-se para a centrifugação durante 1,5 minutos a 4000g (4°C) (Centrífuga SANYO/ Harrier 18/80). Do líquido sobrenadante, tomou-se 5 mL, que foi transferido para um novo tubo, onde foi realizada a etapa de hidrólise.

O tratamento tri-enzimático (α -amilase, conjugase e protease) foi aplicado, visto que este foi o melhor método de detecção das formas de folatos estudadas (CUNHA, 2013).

Os 5 mL do extrato foram transferidos para um novo tubo de centrífuga e tiveram o pH ajustado para 5,0 usando HCl (2 mol/L). Foram então adicionados 1,5 mL da solução de conjugase (20 mg/mL) e 1,5 mL da solução de α -amilase (20 mg/mL). A solução foi incubada no banho metabólico (Marconi®), com temperatura mantida a 37°C, sob agitação durante 3 horas. Após a incubação, os tubos foram retirados e o pH ajustado a 7,0 usando KOH (2 mol/L). Foi adicionado ao tubo 1,5 mL de solução de protease (2mg/mL) e os tubos foram novamente incubados no banho a 37°C, sob agitação por 1 hora. Por fim, foi submetido ao banho quente (98-100°C) por 5 minutos para inativação das enzimas, e posteriormente arrefecidos em banho frio (5°C) por 3 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada durante 20 minutos a 4000g (4°C), o sobrenadante foi recolhido e filtrado em filtros de membrana de PVDF (Millipore®) de poro de 0,22 μ m de diâmetro e injetado imediatamente no cromatógrafo líquido.

2.5. Condições Cromatográficas

Para a determinação dos folatos foi utilizada a metodologia desenvolvida por Catharino e Godoy (2004), avaliada para a matriz.

Após a injeção de 30 μ L do extrato hidrolisado de feijão, os folatos foram separados em um cromatógrafo líquido HP (HELWETT PACKARD) série 1100, com degaseificador, bomba quaternária, sistema de injeção automática, detectores de arranjo de diodos (DAD) (UV-Visível) e de fluorescência dispostos em série. Foi utilizada uma coluna cromatográfica C₁₈ com partículas de 3 μ m, 10 mm x 4,6 mm d.i. (Acer®, Scotland) e sistema de eluição por gradiente com vazão de 0,5 mL/min, desenvolvido com 100% de solução acidificada (2% de ácido acético; pH ajustado para 2,8 com KOH) no início, chegando em 15 min a 76% de solução acidificada e 24% de acetonitrila (v/v). A partir desse ponto voltou-se às condições iniciais (100% fase móvel acidificada), mantendo-se por 5 minutos para condicionamento da coluna. As duas formas de folatos (THF e 5-MTHF) foram

detectadas utilizando-se a fluorescência natural desses compostos (λ_{exc} . 290 nm e λ_{emis} 360 nm). Todo o sistema foi controlado pelo programa Chemstation-HP, que também gerencia o sistema de aquisição e tratamento de dados.

A identificação dos folatos foi feita por comparação entre os tempos de retenção, obtidos com os padrões analisados nas mesmas condições, por co-cromatografia e pelos espectros obtidos com a utilização do detector de fluorescência. A quantificação foi realizada por padronização externa através da construção de curva analítica com sete níveis de concentração, sendo cada ponto injetado em triplicata. As faixas de concentração das curvas foram de 5,4 a 350 ng/mL para o THF e de 4,2 a 35 ng/mL para o 5-MTHF.

3. Análise Estatística

A análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey foram aplicados usando o software Statistica (versão 7.0) para identificar possíveis diferenças significativas ($p < 0,05$) no teor de folatos entre as diferentes variedades de feijões, bem como as diferenças entre os lotes.

4. Resultados e Discussão

Os dados sobre o teor de folatos no feijão cru e cozido foram expressos em base seca para efeito de comparação, e, portanto, a umidade foi determinada (Tabela 1). Com base na média da umidade das variedades de feijões, observou-se que para amostras cruas os valores variaram de 12 a 12,9%, e encontra-se de acordo com o estabelecido pelo Regulamento Técnico do Feijão (2008), que prevê o máximo de 14% de umidade para os grãos. Já para as amostras cozidas/liofilizadas, houve uma variação de 2 a 5,4% no teor de umidade.

Tabela 1. Determinação de umidade (g/100g) nas amostras de feijões crus e cozidos.

FEIJÕES	LOTES	TRATAMENTO	
		CRU	COZIDO/ LIOFILIZADO
Feijão Carioca (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	1	11,9 ± 0,06	6,7 ± 0,00
	2	12,0 ± 0,01	4,8 ± 0,00
	3	12,2 ± 0,05	2,5 ± 0,07
	Média	12,0 ± 0,1	4,6 ± 1,8
Feijão Preto (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	1	12,0 ± 0,16	2,9 ± 0,04
	2	12,0 ± 0,03	7,0 ± 0,01
	3	12,9 ± 0,04	4,5 ± 3,9
	Média	12,3 ± 0,5	4,1 ± 3,2
Feijão Vermelho (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	1	12,7 ± 0,08	5,9 ± 0,12
	2	13,2 ± 0,06	6,4 ± 0,01
	3	12,9 ± 0,07	3,8 ± 0,01
	Média	12,9 ± 0,2	5,4 ± 1,2
Feijão Branco (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	1	13,6 ± 1,6	6,3 ± 0,03
	2	11,9 ± 1,6	4,2 ± 0,45
	Média	12,8 ± 1,6	5,2 ± 1,5
Feijão de Corda (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	1	12,0 ± 0,05	2,1 ± 0,06
	2	12,3 ± 0,33	2,3 ± 0,02
	3	14,1 ± 0,13	1,7 ± 0,06
	Média	12,9 ± 1,0	2,0 ± 0,2

Valores são médias de determinações em triplicatas.

M ± DP: média dos valores ± estimativa do desvio padrão.

Os resultados dos teores de tetraidrofolato (THF) e 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF) em base seca estão apresentados na Tabela 2. Foram consideradas as cinco variedades de feijão analisadas e as formas de tratamento (cru e cozido). Após o tratamento enzimático, os teores de folatos obtidos para os feijões variaram de 20,3 a 1484 µg/100g para THF nas amostras cruas e de 15,3 a 1207 µg/100g nas amostras cozidas. Em relação ao 5-MTHF, os resultados variaram de não determinado a 60,3 µg/100g nas amostras cruas e de não determinado a 31,3 µg/100g nas cozidas.

O tetraidrofolato (THF) foi encontrado em todas as variedades de feijões como composto majoritário, e o 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF) apenas não foi encontrado no feijão de corda. De acordo com Rychlik et al. (2007) a abundância das isoformas de folatos pode ser bastante diferenciada nas leguminosas, por exemplo, em ervilhas congeladas, lentilhas secas, feijão verde o 5-MTHF foi a

forma mais abundante. Já em feijões frescos e em soja o THF foi predominante, o que corrobora os dados deste trabalho.

Comparando os resultados encontrados neste estudo com os valores de folatos da base de dados USDA (2013) (394 µg/100g para feijão seco e 130 µg/100g para feijão cozido), observa-se que, no geral, os teores de folatos foram mais altos para os feijões brasileiros, com exceção do feijão branco.

Ruggeri et al. (1999) compararam o teor de folatos de alguns itens alimentares consumidos na Itália, dentre eles o feijão cozido, que continha 18,5 µg/100g de folatos totais. Para feijão verde cru, Melse-Boonstra et al. (2002) encontraram uma concentração de folato total correspondente a 380 µg/100g. Han e Tyler (2003) obtiveram como resultados para feijões crus 117 - 506 µg/100g, lentilha 68 - 433 µg/100g e ervilha seca 21 - 274 µg/100g. Yon e Hyun (2003) encontraram valores de folatos totais de 238 µg/100g para feijões consumidos na Coreia. Devi et al. (2008) analisaram alguns alimentos da dieta da população Fiji (Austrália), dentre eles, grãos longos (*Vigna sesquipedalis* L.), que apresentou 130 µg/100g de folato. Hefni et al. (2010) avaliaram 24 itens alimentares em relação ao conteúdo de folatos da dieta comumente consumida no Egito. Dentre os alimentos, o feijão apresentou 106 µg/100g de folato.

Paiva et al. (2012) determinaram o teor de folatos para diferentes alimentos, dentre eles o feijão verde cru cultivado no Brasil, utilizando o tratamento di-enzimático (conjugase e protease) e identificação das diferentes formas por cromatografia líquida. O valor encontrado foi 357 µg/100g e a única forma identificada na amostra foi o 10-formiltetraidrofolato (10-FTHF). Em relação ao conteúdo de folatos, os valores são bastante semelhantes aos encontrados para o feijão carioca.

Os diferentes lotes dos feijões crus do tipo carioca, branco e de corda não apresentaram diferenças estatísticas a um nível de 95% de significância para o THF. Já os feijões crus, preto e vermelho, apresentaram diferenças entre os lotes, no mesmo nível de confiança. Em relação aos feijões cozidos, a única amostra que não apresentou variação entre lotes foi do feijão branco, os demais tiveram diferenças estatísticas significantes (95%) para o THF. Em relação ao 5-MTHF,

Tabela 2. Comparação entre teores de folatos ($\mu\text{g}/100\text{g}$) em feijão de diferentes variedades e tratamentos.

Teor de Folatos em µg/100g de feijão em base seca						Média de perda (%)	
FEIJÕES	LOTES	TRATAMENTO					
		CRU		COZIDO		THF	5-MTHF
		THF	5MTHF	THF	5MTHF		
Feijão Carioca (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	1	374,8 ± 12,6 ^a	35,5 ± 2,7 ^a	351,2 ± 6,7 ^a	29,3 ± 2,8 ^a	7	30
	2	320,5 ± 30,0 ^a	13,9 ± 1,1 ^b	339,9 ± 16,1 ^{ab}	10,9 ± 0,9 ^c		
	3	371,1 ± 22,7 ^a	36,5 ± 1,6 ^a	304,6 ± 26,7 ^b	19,6 ± 2,7 ^b		
	Média	355,5 ± 32,9 ^{x, F, G}	28,6 ± 11,2 ^{y, B, C}	331,9 ± 26,4 ^{x, G}	20,0 ± 8,1 ^{y, A, C}		
Feijão Preto (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	1	488,0 ± 27,2 ^b	23,0 ± 1,7 ^b	502,8 ± 0,1 ^a	19,0 ± 0,9 ^b	17	37
	2	477,0 ± 6,2 ^b	22,0 ± 2,1 ^b	479,3 ± 13,1 ^a	31,3 ± 3,1 ^a		
	3	715,0 ± 15,9 ^a	60,3 ± 2,6 ^a	407,5 ± 16,8 ^b	16,6 ± 0,9 ^b		
	Média	560,0 ± 112,8 ^{x, C, E}	35,0 ± 19,0 ^{x, B}	463,0 ± 45,5 ^{y, E, F, G}	22,0 ± 7,0 ^{x, B, C}		
Feijão Vermelho (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	1	601,0 ± 16,8 ^b	24,3 ± 1,0 ^b	501,6 ± 15,8 ^b	11,2 ± 0,7 ^a	27	77
	2	609,0 ± 16,0 ^b	33,8 ± 1,1 ^a	559,0 ± 4,0 ^a	5,0 ± 0,4 ^b		
	3	811,1 ± 30,2 ^a	24,3 ± 1,0 ^b	420,9 ± 12,5 ^c	2,1 ± 0,0 ^c		
	Média	673,8 ± 105,0 ^{x, C}	27,0 ± 5,0 ^{y, B, C}	494,0 ± 61,2 ^{y, E, F}	6,2 ± 4,0 ^{x, D}		
Feijão Branco (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	1	20,3 ± 1,6 ^a	3,5 ± 0,3 ^b	17,8 ± 1,4 ^a	1,8 ± 0,2 ^a	24	83
	2	23,0 ± 0,8 ^a	8,6 ± 0,2 ^a	15,3 ± 1,4 ^a	0,2 ± 0,0 ^b		
	Média	21,7 ± 1,9 ^{x, D}	6,0 ± 2,8 ^{x, A, D}	16,5 ± 1,8 ^{y, D}	1,0 ± 0,8 ^{y, D}		
Feijão de Corda (<i>Vigna unguiculata</i> Walp.)	1	1420,0 ± 46,0 ^a	nd*	851,0 ± 77,3 ^b	nd	34	nd
	2	1484,0 ± 78,0 ^a	nd	1207,0 ± 103,5 ^a	nd		
	3	1474,0 ± 109,0 ^a	nd	843,0 ± 38,0 ^b	nd		
	Média	1458,0 ± 34,0 ^{x, A}	nd	966,0 ± 209,0 ^{y, B}	nd		

Resultados expressos em base seca como média $\pm$ desvio padrão de análises realizadas em triplicata.

Médias de cada lote (n=3) seguidas pela mesma letra minúscula, nas colunas, para o mesmo feijão, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias de cada lote (n=9) seguidas pela mesma letra minúscula (itálico), nas linhas, para as mesmas formas de folatos de um mesmo feijão, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

Médias dos três lotes (n = 9) seguidas pela mesma letra maiúscula, nas colunas, para as diferentes variedades de feijão, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (95%).

nd (não determinado).

% de perda (valor do composto na amostra cozida/valor na amostra crua x 100).

todas as variedades de feijões e formas de tratamento analisadas apresentaram diferenças significativas (95%) entre os lotes, sendo que no feijão de corda não foi possível determinar o composto.

Essas diferenças entre lotes podem ser explicadas por uma série de fatores que afetam o nível de folatos, já que a síntese em vegetais é dependente de fatores como incidência de luz e presença de minerais no solo, do genótipo de cada espécie, além da própria metodologia empregada na sua determinação (LIMA-PALLONE et al., 2008; HEFNI et al., 2010).

Em relação às perdas de processamento, houve uma grande variação entre os diferentes tipos de feijão. Os feijões carioca, preto e vermelho foram submetidos às mesmas condições de processamento, e obtiveram valores muito diferentes de perda, que provavelmente pode estar relacionada às características intrínsecas dos grãos. Em relação ao feijão branco, as condições de processamento indicam que as perdas foram maiores e devido à lixiviação. Embora o tratamento térmico tenha sido mais brando, o feijão foi colocado de molho por 4h e a água descartada antes do cozimento. Por pertencer a uma espécie diferente, pode-se explicar o fato de no feijão de corda as perdas desse composto ser maior quando comparadas às variedades da outra espécie, e o fato de ter sido encontrado apenas o THF.

McKillop et al. (2002) observaram depois de ter submetido o feijão verde e espinafre ao vapor, que a degradação pelo calor não foi o principal mecanismo de perda durante o cozimento, mas sim a perda por lixiviação. Em concordância com esse estudo, Delchier et al. (2013) analisando feijão verde fresco, obtiveram perdas significativas de folatos que foram difundidos para o líquido de cozimento, que continha 1/5 da quantidade inicial da vitamina.

Xue et al. (2011) avaliaram as perdas de folatos em feijão branco submetido ao remolho antes do cozimento, e as perdas por métodos de processamento com e sem o uso de pressão. Os resultados mostraram que as perdas de folatos foram maiores em feijões que foram submetidos ao remolho antes da cocção e em relação ao processamento, houve redução de 16,3 a 84,9% no conteúdo de folatos dos feijões cozidos sem uso de pressão, e redução de 45,6 a 93,5% para

feijões submetidos à pressão. Portanto, a perda de folato foi ainda maior quando o feijão ficou de molho e foi cozido sob pressão. Em concordância com o estudo, neste trabalho o feijão branco reduziu em até 83% o teor de 5-MTHF após ser submetido à maceração (4h) e cocção sob pressão (10 min).

Embora a perda por lixiviação seja a mais ressaltada na literatura, é importante destacar que as leguminosas, são consumidas com o aproveitamento do caldo, onde se concentram as maiores perdas vitamínicas no cozimento (DELCHIER et al., 2013). Por isso, o feijão ainda matém grande parte dos folatos devido ao consumo do grão e do caldo, representando uma boa fonte da vitamina para grande parte da população.

Na Tabela 3 foram apresentados os teores de folatos para as diferentes variedades de feijão, bem como o percentual (%) das necessidades atingido com o consumo de uma porção da preparação.

Tabela 3. Representação do consumo de uma porção de feijão cozido (grão e caldo) de diferentes variedades, no suprimento das necessidades diárias de um indivíduo adulto.

Feijões	Teor de folato (µg/100g)		Ingestão diária recomendada para adultos (µg/dia)			
	Base seca	Base úmida	ANVISA (2005)	% atingida	USDA (2013)	% atingida
Feijão Carioca	350	122		51		31
Feijão Preto	485	204		85		51
Feijão Vermelho	500	238		99		60
Feijão Branco	17	9	240 µg	< 1	400 µg	< 1
Feijão de Corda	965	353		147		88

Fonte: ANVISA (2005) e USDA (2013).

Dados do IBGE (2011) mostram que no Brasil são consumidos em média 182,9 g de feijão/pessoa/dia, portanto, considerando a média dos teores de folatos encontrados nesse trabalho para as diferentes variedades de feijão cozidos, pode-se concluir que o consumo de feijão pode suprir mais de 50% das necessidades diárias de um indivíduo adulto de acordo com as recomendações da ANVISA (2005).

5. Conclusões

Os feijões cultivados e consumidos no Brasil apresentam teores expressivos de folatos. Estes variam de acordo com as espécies e cultivares, sendo os maiores teores encontrados no feijão de corda, em relação às outras espécies mais comumente consumidas. Dessa forma, mesmo após o processamento, o feijão ainda representa uma boa fonte de folatos na dieta.

6. Referências Bibliográficas

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais**. Diário oficial da união, Brasília, 23 de setembro de 2005. Disponível em <www.anvisa.gov.br>. Acesso em 11/07/2013.
- ARCOT, J.; SHRESTHA, J. Folate: methods of analysis. **Trends Food Sci Technol**, v. 16, p. 253–266, 2005.
- CATHARINO, R. R. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de folatos em alimentos**. 2004. 96f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2004.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, quarto levantamento, janeiro 2013**. Brasília. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_01_09_17_44_20_boletim_graos_janeiro_2013.pdf. Acesso em: 11/03/2013.
- DELCHIER, N.; RINGLING, C.; GRANDOIS, J. L.; WERNER, D. A.; GALLAND, R.; GEORGÉ, S.; RYCHLIK, M.; RENARD, C. M. G. C. Effects of industrial processing on folate content in green vegetables. **Food Chemistry**, v. 139, p. 815–824, 2013.
- DEVI, R., ARCOT, J., SOTHEESWARAN, S., ALI, S. Folate contents of some selected Fijian foods using tri-enzyme extraction method. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1100–1104, 2008.
- DONG, W.; CHENG, Z.; WANG, X.; WANG, B.; ZHANG, H.; SU, N.; YAMAMARO, C.; LEI, C.; WANG, J.; WANG, J.; ZHANG, X.; GUO, X. Determination of folate content in rice germplasm (*Oryza sativa* L.) using tri-enzyme extraction and microbiological assays. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 62, n. 5, p. 537–543, 2011.
- DURANTI, M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. **Fitoterapia**, v. 77, p. 67–82, 2006.
- GREGORY, J. F.; QUINLIVAN, E. P. In vivo kinetics of folate metabolism. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 22, p. 199–220, 2002.
- HAN, J. Y.; TYLER, R. T. Determination of Folate Concentrations in Pulses by a Microbiological Method Employing Trienzyme Extraction. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 5315–5318, 2003.

- HEFNI, M.; VERONICA, O.; MOHAMED, T.; CORNELIA, W. Folate content in foods commonly consumed in Egypt. **J. Food Chem**, v. 121, p. 540-545, 2010.
- HYUN, T. H.; TAMURA, T. Trienzyme Extraction in Combination with Microbiologic Assay in Food Folate Analysis: An Updated Review. **Experimental Biology and Medicine**, v. 230, p. 444-454, 2005.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003 e 2008-2009**. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em 06 mai. 2013.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Tabelas de composição nutricional dos alimentos consumidos no Brasil**. Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009. Rio de Janeiro, 2011.
- IYER, R.; TOMAR, S. K. Folate: A Functional Food Constituent. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 9, 2009.
- LIMA-PALLONE, J. A.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Folatos em brócolis convencional e orgânico e perdas no processo de cocção em água. **Quim. Nova**, v. 31, n. 3, p. 530-535, 2008.
- MCKILLOP, D. J.; PENTIEVA, K.; DALY, D.; MCPARTLIN, J. M.; HUGHES, J.; STRAIN, J. J.; SCOTT, J. M.; MCNULTY, H. The effect of different cooking methods on folate retention in various foods that are amongst the major contributors to folate intake in the UK diet. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 681–688, 2002.
- MELSE-BOONSTRA, A.; VERHOEF, P.; KONINGS, E. J. M.; DUSSELDORP, M. V.; MATSER, A.; HOLLMAN, P. C. H.; MEYBOOM, S.; KOK, F. J.; WEST, C. E. Influence of Processing on Total, Monoglutamate and Polyglutamate Folate Contents of Leeks, Cauliflower, and Green Beans. **J. Agric. Food Chem**, v. 50, p. 3473-3478, 2002.
- PAIVA, E. P.; FILHO, C. A. A.; FERREIRA, S. G.; TAMFORDS, T. L. M.; PAIXAO, J. A. Investigation of protocols to extraction and quantification of folates in vegetables matrices split into liquor and fiber fraction using factorial design. **Journal of Chromatography A**, v. 1260, p. 33– 41, 2012.
- REGULAMENTO TÉCNICO DO FEIJÃO. **Instrução normativa nº 12, de 28 de março/2008**. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis>>. Acesso em: 07/05/2012.
- RUGGERI, S.; AGUZZI, A.; CARNOVALE, E. Folate nutritional importance and evaluation of different method for their determination in food. **La Rivista di scienza dell'alimentazione**, v. 28, n. 3, p. 45–54, 1999.
- SCOTT, J.; RÉBEILLE, F.; FLETCHER, J. Review: Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. **J. Sci. Food Agric.**, v. 80, p. 795-824, 2000.
- STEINDAL, A. H.; JUZENIENE, A.; JOHNSON, A.; MOAN, J. Photodegradation of 5-methyltetrahydrofolate: Biophysical Aspects. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, p. 1651-1 655, 2006.
- USDA - **NATIONAL NUTRIENT DATABASE REFERENCE**. Disponível em :<<https://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/SR24/nutrlist/sr24255>>: Acesso em: 12/04/2013.
- XUE, S.; YE, X.; SHI, J.; JIANG, Y.; LIU, D.; CHEN, J.; SHI, A.; KAKUDA, Y. Degradation kinetics of folate (5-methyltetrahydrofolate) in navy beans under various processing conditions. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 231-238, 2011.
- YON, M.; HYUN, T. H. Folate content of foods commonly consumed in Korea measured after trienzyme extraction. **Nutrition Research**, v. 23, p. 735–746, 2003.

CONCLUSÕES GERAIS

A metodologia de hidrólise tri-enzimática demonstrou ser fundamental para a determinação de folatos em feijões. Apenas duas formas foram determinadas, o tetraidrofolato (THF) e o 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF), sendo o THF majoritário em todas as variedades.

O teor de folatos variou de acordo com a espécie e tipo de feijão, sendo no feijão de corda encontrada a maior concentração de THF e no feijão branco, uma concentração muito reduzida de folatos.

Em relação às perdas por processamento, de modo geral, todos os feijões reduziram o teor vitamínico após o cozimento, sendo o 5-MTHF mais susceptível à degradação térmica e perdas por lixiviação.

Assim, o feijão, alimento típico da cultura da brasileira, representa uma fonte acessível e barata de folatos e deve ser priorizado na dieta do brasileiro como forma de atingir as necessidades diárias do nutriente, desse modo, evitando as doenças causadas pela sua carência.