

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**AMIDO RESISTENTE E COMPOSTOS VOLÁTEIS EM DIFERENTES
VARIEDADES DE FEIJÃO. DESENVOLVIMENTO DE UMA BOLACHA À
BASE DE FARINHA DE FEIJÃO**

Verónica Silva Correia

Dissertação orientada pela Professora Doutora Maria Rosário Bronze e,
coorientada pela Doutora Carlota Vaz Patto

Mestrado em Controlo de Qualidade e Toxicologia dos Alimentos

Lisboa 2017

RESUMO

Em 2016 celebrou-se o Ano Internacional das Leguminosas. Esta iniciativa da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* foi uma chamada de atenção para a importância do consumo de leguminosas. O feijão (*Phaseolus vulgaris L.*), em particular, constitui uma parte importante da dieta em diversas culturas. No entanto, o seu consumo *per capita* tem vindo a diminuir, bem como, a sua produção.

Numa amostra seca, o feijão possui elevada quantidade de amido, fibra dietética, sais minerais e vitamina, e possui também um conteúdo elevado de flavonóides, bem como, alguns não flavonóides. Estes compostos quando ingeridos numa alimentação equilibrada são benéficos para a saúde com grande potencial como ingrediente funcional e nutracêutico, possuindo propriedades antioxidantes e anticancerígenas.

A introdução de amido, nomeadamente amido resistente em diversos alimentos, tais como pão, biscoitos, bolachas e massas, para obter produtos comerciais com benefícios para a saúde começa a surgir, sendo que também vão contribuir para uma melhor aparência e textura desses alimentos na degustação.

O feijão, como qualquer alimento, possui características sensoriais que podem ser fatores decisórios no momento de compra por parte dos consumidores. Logo, a identificação de compostos voláteis desempenha um papel essencial na qualidade sensorial do produto a consumir. Esses compostos na farinha estão associados a características genéticas e vão ser os precursores dos odores que caracterizam amostras que vão ser consumidas cozidas.

Este trabalho pretende contribuir para um maior conhecimento das variedades nacionais de feijão tendo-se procedido à avaliação de dois parâmetros importantes na aceitação do produto pelo consumidor: a qualidade nutricional e a qualidade organolética.

Na primeira fase do trabalho foi determinado o teor em amido resistente em diferentes variedades nacionais de feijão e desenvolvida uma bolacha em que a farinha de feijão foi adicionada como ingrediente. Posteriormente, foi feita a avaliação da resposta glicémica e percepção da saciedade quando o produto foi consumido por um grupo de voluntários saudáveis. Numa segunda fase foi avaliada a composição volátil de amostras de farinha de feijão cru através da técnica de microextração em fase sólida e cromatografia em fase gasosa associada a espectrometria de massa.

Os resultados obtidos para os valores de amido resistente na farinha de feijão cru, comum aos dois anos do projeto (n=48), encontram-se entre os 24,00g/100g e os 43,27g/100g expresso em matéria seca. Foi possível verificar que não há diferenças significativas entre os teores em amido resistente determinados e as diferentes

variedades analisadas. No entanto, existem diferenças significativas entre os valores de amido resistente do primeiro e do segundo ano (dois ambientes diferentes), bem como, uma interação significativa entre o fator variedade e o fator ambiente. Verificou-se ainda que o teor em amido resistente não é influenciado pela cor e padrão da semente das variedades comerciais de feijão.

Quanto às bolachas formuladas, bolacha à base de farinha de feijão e bolacha à base de farinha de trigo, estas são semelhantes quanto à sua composição nutricional, e ambas tiveram uma boa aceitação a nível sensorial. O teor em amido resistente era vinte vezes superior na bolacha de feijão (11,24g/100g) em relação à bolacha de trigo (0,24g/100g). A análise dos compostos voláteis de ambas as bolachas permitiu identificar compostos específicos da bolacha de feijão com descritores aromáticos associados a cacau, assado, noz, verde, cremoso, gorduroso, sulfuroso e queimado. Por sua vez, os compostos identificados especificamente na bolacha de trigo estão associados aos descritores aromáticos verde, gorduroso, especiarias, floral, queijo. Estes podem ser alguns dos compostos decisórios na percepção sensorial. Com o processo de preparação das bolachas (180°C) verifica-se que os valores de fenóis totais, atividade antioxidante e inibidores da atividade da tripsina diminuem, à exceção da massa da bolacha de trigo que teve um valor médio de fenóis totais mais elevado que a bolacha de trigo.

O ensaio *in vivo* realizado permitiu concluir que a bolacha de feijão revelou uma resposta glicémica significativamente inferior à bolacha de trigo e que simultaneamente induziu maior saciedade que esta última. Estes resultados sugerem que o amido resistente influencia a digestibilidade da fração de amido disponível.

A determinação do índice glicémico das amostras em estudo mostrou que a bolacha de feijão possui um índice glicémico de 31, associado a alimentos com um baixo índice glicémico, enquanto que, a bolacha de trigo apresentou um valor de 75, valor associado a alimentos com um elevado índice glicémico. Logo, o amido resistente pode ser o responsável pela diminuição do índice glicémico na bolacha de feijão.

Os resultados da composição volátil da farinha de feijão cru do segundo ano do projeto (n=91) mostraram que há uma aparente dispersão das variedades por quadrantes. As variedades presentes nos quadrantes 1 e 2 têm descritores aromáticos específicos, o que pode justificar a projeção obtida. É ainda possível inferir que em ambos os quadrantes é evidente a dominância de variáveis da família química dos álcoois.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L.; compostos voláteis; amido resistente; bolacha de feijão; resposta glicémica; saciedade; índice glicémico

ABSTRACT

In 2016 the International Year of Legumes was celebrated. This initiative of the Food and Agriculture Organisation of the United Nations was a call for attention to the importance of the consumption of legumes. Beans (*Phaseolus vulgaris L.*), in particular, are an important part of the diet in several cultures. However, their *per capita* consumption has been declining as well as their production.

In a dry sample, beans have a high amount of starch, dietary fiber, mineral salts and vitamin, and they also have a high flavonoid content, as well as some non-flavonoids. These compounds, when ingested in a balanced diet are beneficial to health with great potential as a functional and nutraceutical ingredient, with antioxidant and anticancer properties.

The introduction of starch, namely resistant starch, in foods such as bread, biscuits, cookies and pasta, allows to obtain products with not only an improved appearance and texture but also with health benefits.

Beans, like any food, have sensory characteristics that can be critical factors in the moment of purchasing, with the volatile components playing an essential role in the sensory quality of the products to be consumed. These compounds are associated with genetic characteristics and will be precursors of the characteristic odours of cooked beans.

This work aims to contribute to a better knowledge of the national varieties of beans, evaluating two important parameters in the acceptance of the product by the consumer: nutritional and organoleptic quality.

Primarily, the aim was to determine the resistant starch values in different national varieties of beans and develop a cookie in which the bean flour was added as an ingredient. Subsequently, the evaluation of the glycaemic response and satiety perception was retrieved when the product was consumed by a group of healthy volunteers. In a second phase, the aim was to evaluate the volatile composition of raw bean flour samples which was performed using Solid Phase Microextraction – Gas Chromatography/Mass Spectrometry.

The results obtained for RS values in raw bean flour, in both years of the project (n=48), were between 24,00g/100g and 43,27g/100g expressed as dry matter. It was possible to verify that there were no significant differences between the resistant starch values and the varieties analysed. However, there were significant differences between the resistant starch values of the first and second year (two different environments), as well

as a significant interaction between the variety factor and the environment factor. It was also verified that resistant starch values were not influenced by the colour and pattern of the seeds of commercial bean varieties.

Regarding the cookies, some formulated with bean flour and others with wheat flour, they were similar in terms of nutritional composition, and both have been well accepted at the sensory level. The resistant starch values were twenty times higher in the cookie with bean flour (11,24g/100g) than in the one with wheat flour (0,24g/100g). The analysis of the volatile compounds of both cookies allowed to identify specific compounds in the cookie with bean flour associated with aromatic descriptors like cocoa, roasted, walnut, green, creamy, greasy, sulfurous and burned. On the other hand, the compounds specifically identified in the cookie with wheat flour are associated with the aromatic descriptors of green, greasy, spice, floral, cheese. These may be some of the decision-making compounds in sensory perception. With the preparation of the cookies (180°C) it was verified that the values of total phenolic content, antioxidant activity and trypsin inhibitors activity decreased, except for the dough of the wheat cookie that had a mean value of total phenolic content higher than the dough of the bean cookie.

The *in vivo* assay showed that the cookie with bean flour revealed a glycaemic response significantly lower than the cookie with wheat flour, and simultaneously induced greater satiety than the cookie with wheat flour. These results suggest that resistant starch influences the digestibility of the available starch fraction.

The determination of the glycaemic index in the studied samples showed that the cookie with bean flour has a glycaemic index of 31, associated with low glycaemic index foods, whereas the cookie with wheat flour presented a value of 75, associated with high glycaemic index foods. Therefore, resistant starch can be the responsible for the decrease in the glycaemic index in the cookie with bean flour.

The results for the volatile composition of the raw bean flour for the second year of the project (n=91) showed that there was a dispersion of the varieties by quadrants. The varieties present in quadrants 1 and 2 have specific aromatic descriptors, which may justify the projection obtained. It is possible to conclude that in both quadrants the dominant chemical family of the variables is alcohols.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L.; volatile compounds; resistant starch; bean cookie; glycaemic response; satiety; glycaemic index

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria do Rosário Bronze pela orientação, encorajamento, apoio, conhecimentos científicos e valiosas críticas construtivas e sugestões para a realização deste trabalho. Um muito obrigado.

À Doutora Carlota Vaz Patto pela sua orientação, contribuição imprescindível e apoio durante o trabalho.

Às minha colegas do *Food Functionality and Bioactives Lab* por serem o apoio incondicional durante todo este processo, por serem uma segunda família ao longo deste tempo todo e por todos os momentos partilhados, foram essenciais. Um muito obrigado por tudo, Ana Bárbara Pereira, Elsa Brito e Andreia Silva, e um obrigado especial à “companheira do feijão”, Elsa Mecha.

Ao grupo *Nutraceuticals and Bioactives Process Technology*, especialmente à Doutora Teresa Serra, pelo seu apoio tanto a nível de disponibilização de material como pela transmissão de conhecimentos durante a realização de todo este trabalho.

Ao Eng. António Ferreira por estar sempre disponível, pelo seu apoio, paciência e conhecimentos científicos que transmitiu, o meu obrigado.

À Doutora Carla Brites pela sua disponibilidade, material cedido e conhecimentos transmitidos na elaboração deste trabalho.

À Susana Leitão pela ajuda com as variedades de feijão e pelas fotos disponibilizadas. Obrigada novamente.

À Professora Doutora Maria Eduardo Figueira, que além de ser a coordenadora do mestrado que frequento, foi essencial em parte do trabalho aqui desenvolvido, o meu obrigado, mais uma vez.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) que financiou o projeto nacional BEGEQA - Exploração da genética do feijoeiro para a inovação na qualidade e atratividade alimentar, PTDC/AGR-TEC/3555/2012, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À minha família, pelo seu apoio, mesmo à distância, pelas palavras de incentivo e por sempre acreditarem nas minhas capacidades, mesmo quando eu própria não o fazia. Muito obrigado mesmo.

Aos meus amigos que me acompanharam ao longo desta fase do meu percurso académico, aos meus “preferidos” da RAMA, que sempre me apoiaram e sempre acreditaram em mim. Um especial obrigado.

A todos, o meu muito obrigado, por fazerem com que esta etapa fosse concretizada.

ÍNDICE

RESUMO.....	I
ABSTRACT	III
AGRADECIMENTOS	V
ÍNDICE.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XV
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Leguminosas	3
1.1.1 Relevância ecológica e económica	3
1.2. O feijão.....	5
1.2.2. A composição em amido resistente do feijão.....	7
1.2.2.1. <i>Fontes alimentares de amido resistente</i>	10
1.2.2.2. <i>Teor de fibras e o índice glicémico: importância na saúde</i>	11
1.2.2.3. <i>O amido resistente e a sua utilização comercial</i>	13
1.2.1. A composição volátil do feijão	14
2. OBJETIVOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	17
3. METODOLOGIA	19
3.1 Amostragem	19
3.2 Materiais e métodos	19
3.2.1 Materiais	19
3.2.2 Métodos	21
3.2.2.1. Determinação do teor em amido resistente na farinha de feijão cru	21
3.2.2.2. Desenvolvimento de uma bolacha à base de farinha de feijão	22
a) <i>Formulação da bolacha</i>	22
b) <i>Caracterização química das bolachas desenvolvidas</i>	23

i.	Extração de compostos fenólicos.....	23
ii.	Análise do teor de fenóis totais pelo método de <i>Folin-Ciocalteu</i>	24
iii.	Análise da atividade antioxidante pelo método de ORAC.....	24
iv.	Determinação do teor de inibidores da atividade da tripsina	24
c)	<i>Estudo do efeito da ingestão de bolachas à base de farinha de feijão</i> ...	26
3.2.2.3.	Identificação de compostos voláteis em farinha de feijão cru por microextração em fase sólida e cromatografia em fase gasosa associada a espectrometria de massa (SPME-GC/MS)	29
a)	<i>Preparação da amostra</i>	29
b)	<i>Equipamento</i>	29
c)	<i>Condições de análise</i>	29
3.2.3	Tratamento estatístico dos resultados.....	30
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1	Determinação do teor em amido resistente na farinha de feijão cru.....	33
4.2	Desenvolvimento de uma bolacha à base de farinha de feijão	35
4.2.1	Caracterização química das bolachas desenvolvidas	35
a)	<i>Composição nutricional</i>	35
b)	<i>Determinação do teor em amido resistente</i>	38
c)	<i>Identificação de compostos voláteis por microextração em fase sólida e cromatografia em fase gasosa associada a espectrometria de massa (SPME-GC/MS)</i>	39
d)	<i>Análise do teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu</i>	46
e)	<i>Análise da atividade antioxidante pelo método de ORAC</i>	47
f)	<i>Determinação do teor de inibidores da atividade da tripsina</i>	47
4.2.2	Estudo do efeito da ingestão de bolachas com farinha de feijão na resposta glicémica.....	48
a)	<i>Caracterização da população do estudo</i>	48
b)	<i>Resposta glicémica</i>	49
c)	<i>Percepção da saciedade</i>	51

d) <i>Determinação do índice glicémico da bolacha de feijão e da bolacha de trigo</i>	54
4.3 Identificação de compostos voláteis em farinha de feijão cru por microextração em fase sólida e cromatografia em fase gasosa associada a espectrometria de massa (SPME-GC/MS).....	55
5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	61
6. BIBLIOGRAFIA.....	63
7. ANEXOS.....	71
Anexo 1. <i>Identificação das amostras de feijão analisadas</i>	71
Anexo 2. <i>Documento de informação ao participante do ensaio in vivo</i>	75
Anexo 3. <i>Consentimento informado</i>	79
Anexo 4. <i>Ficha individual do participante do ensaio in vivo</i>	81
Anexo 5. <i>Questionário sobre a avaliação da sensação de apetite</i>	83
Anexo 6. <i>Teores de amido resistente em feijão cru (matéria seca)</i>	85
Anexo 7. <i>Identificação de compostos voláteis nas bolachas e massas desenvolvidas analisadas por SPME-GC/MS</i>	95
Anexo 8. <i>Identificação de compostos voláteis em amostras de farinha de feijão cru analisadas por SPME-GC/MS</i>	99
Anexo 9. <i>Cromatograma referente à análise da solução padrão de alcanos C8-C20</i>	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – A pirâmide da dieta mediterrânea (Associação Portuguesa de Nutricionistas – APN). Adaptado de: referência (6).	1
Figura 2 – Estruturas básicas da semente de feijão. Adaptado de: referência (35).	6
Figura 3 – Estrutura química da amilose (A) e da amilopectina (B) Adaptado de: referência (58)	8
Figura 4 – Representação da taxa de controle da digestão (taxa rápida e taxa lenta) e da respetiva reação glicémica. Adaptado de: referência (55).	12
Figura 5 – Esquema que sumariza o desenho experimental do ensaio <i>in vivo</i>	28
Figura 6 – Algumas variedades de feijão estudadas, organizadas por cor e padrão da semente.	34
Figura 7 – Composição nutricional da BF (A) e da BT (B).	36
Figura 8 – Comparação dos perfis cromatográficos obtidos após análise das amostras BF (a laranja) e BT (a verde) por SPME-GC-MS.	40
Figura 9 – Comparação dos perfis cromatográficos obtidos após análise das amostras MF (a laranja) e MT (a verde) por SPME-GC/MS.	41
Figura 10 – Comparação dos perfis cromatográficos obtidos após análise das amostras BF (a laranja) e MF (a verde) por SPME-GC/MS.	42
Figura 11 – Comparação dos perfis cromatográficos obtidos após análise das amostras BT (a laranja) e MT (a verde) por SPME-GC/MS.	43
Figura 12 – Variação do valor de glicémia após a ingestão da bolacha de feijão (BF) e da bolacha de trigo (BT) para o conjunto de voluntários do estudo; média \pm desvio padrão da média, n=16; para cada tempo, letras diferentes significam que as amostras são significativamente diferentes.	50
Figura 13 – Perceção da saciedade relativamente aos 4 parâmetros avaliados para as duas amostras (BF e BT), n=16; para cada tempo, para cada tempo, letras diferentes significam que as amostras são significativamente diferentes.	52
Figura 14 – Cromatograma tipo referente ao perfil cromatográfico da amostra 654 do bloco 3 (segundo ano do projeto).	56

Figura 15 – Projeção das variedades de feijão (n=91) e variáveis medidas (n=24) no plano definido pelas componentes principais 1 e 2. As variáveis estão identificadas como: A4, A8, ..., A132. 59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Balanços de provisionamento das leguminosas secas; unidade: 10 ³ t. Adaptado de: referência (8).	2
Tabela 2 – Multiplicidade de utilizações de diferentes espécies de leguminosas. Adaptado de: referência (15).	4
Tabela 3 – Conteúdo de amido total e AR de algumas fontes alimentares (g/100 g de alimento). Adaptado de: referência (57).	10
Tabela 4 – Compostos voláteis identificados em amostras de feijão cru/cozido.	15
Tabela 5 – Ingredientes e respetivas quantidades, utilizados na formulação da bolacha de feijão (BF) e na bolacha de trigo (BT).	22
Tabela 6 – Esquema de volumes a pipetar para a determinação do teor de inibidores da atividade da tripsina (TIA).	25
Tabela 7 – Resultados obtidos no tratamento estatístico (<i>Two-way ANOVA</i>).	34
Tabela 8 – Resumo das análises efetuadas e amostras em que foram realizadas.	35
Tabela 9 – Composição nutricional das bolachas em estudo (BF e BT).	36
Tabela 10 – Resumo das respostas dos voluntários às questões colocadas sobre as bolachas testadas (BF e BT).	38
Tabela 11 – Resumo dos resultados da determinação do teor em AR nas bolachas (BF e BT) (n=2).	38
Tabela 12 – Resumo dos resultados da determinação do teor em fenóis totais nas amostras de BF, BT, MF e MT (n=4).	46
Tabela 13 – Resumo dos resultados da análise da atividade antioxidante na BF, BT, MF e MT (n=4).	47
Tabela 14 – Resumo dos resultados da determinação do teor de inibidores da tripsina na FC e na BF (n=2).	48
Tabela 15 – Caracterização dos voluntários (n=16) que participaram no ensaio <i>in vivo</i>	49
Tabela 16 – Valores médios da glicémia (mmol/l) em jejum (0min) e após ingestão das amostras (BF e BT).	50

Tabela 17 – Valores médios da AUC da glicémia (mmol*min/l) após ingestão da bolacha de feijão e da bolacha de trigo para o conjunto dos indivíduos do estudo, n=16.....	51
Tabela 18 – Valores médios da AUC (mm*min) dos parâmetros de avaliação da percepção de saciedade após ingestão das amostras (BF e BT).	53
Tabela 19 – Resultados obtidos no tratamento estatístico (Two-way ANOVA).....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	microlitro
μM	micromolar
ACP	Análise por componentes principais
AG	Ácido gálico
AGCC	Ácidos gordos de cadeia curta
AR	Amido resistente
AUC	Área incremental abaixo da curva
BF	Bolacha de feijão
BT	Bolacha de trigo
CAR	Carboxeno
Da	Dalton
DGA	<i>Dietary Guidelines for Americans</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DVB	Divinilbenzeno
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FC	Farinha de feijão crua
g	Gramas
GC/MS	Cromatografia em fase gasosa associada a espectroscopia de massa
GLP-1	Peptídeo 1 semelhante ao glucagon
GOPOD	Reagente de glicose oxidase/peroxidase
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HS-SPME	<i>Headspace</i> com microextração em fase sólida (do inglês <i>Headspace – Solid Phase Microextraction</i>)
iBET	Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica
IBPGR	<i>International Board for Plant Genetic Resources</i>
IG	Índice glicémico
INE	Instituto Nacional de Estatística
IRL	Índice de retenção linear

IS	Índice de semelhança
ISO	Organização Internacional para Padronização (do inglês <i>International Organization for Standardization</i>)
ITQB	Instituto de Tecnologia Química e Biológica
kcal.g ⁻¹	Quilocaloria por grama
K-RSTAR	<i>Resistant Starch Assay Kit</i>
L	Litro
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> -
MF	Massa da bolacha de feijão
mg	miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	milímetro
MT	Massa da bolacha de trigo
mM	milimolar
nm	nanómetro
°C	grau Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
PDMS	Polidimetilsiloxano
PTR-MS	Transferência de prótons associada a espectroscopia de massa
r^2	Coefficiente de determinação
ROS	Espécies reativas de oxigénio
rpm	rotações por minuto
s	segundo
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
SPME	Microextração em fase sólida
SPME -GC/MS	Microextração em fase sólida e cromatografia em fase gasosa associada a espectrometria de massa (do inglês <i>Solid Phase Microextraction – Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i>)
t	tonelada
TCA	Tabela da Composição de Alimentos

TIA	Inibidores da atividade da tripsina
v/v	Relação volume/volume
VAS	Escala Visual Analógica

1. INTRODUÇÃO

Cada vez mais a procura por uma alimentação saudável, um estilo de vida saudável, é uma preocupação por parte da população. Uma alimentação com base essencialmente em frutas e legumes frescos e pobre em carne, como a dieta mediterrânica, tem sido considerada, a nível mundial, como uma das mais saudáveis. Sendo uma dieta pobre em açúcar, sal e ácidos gordos saturados, vários estudos realizados confirmam uma relação entre o bem-estar, a longevidade e as características da dieta dos países mediterrânicos (*Figura 1*) (1–6).

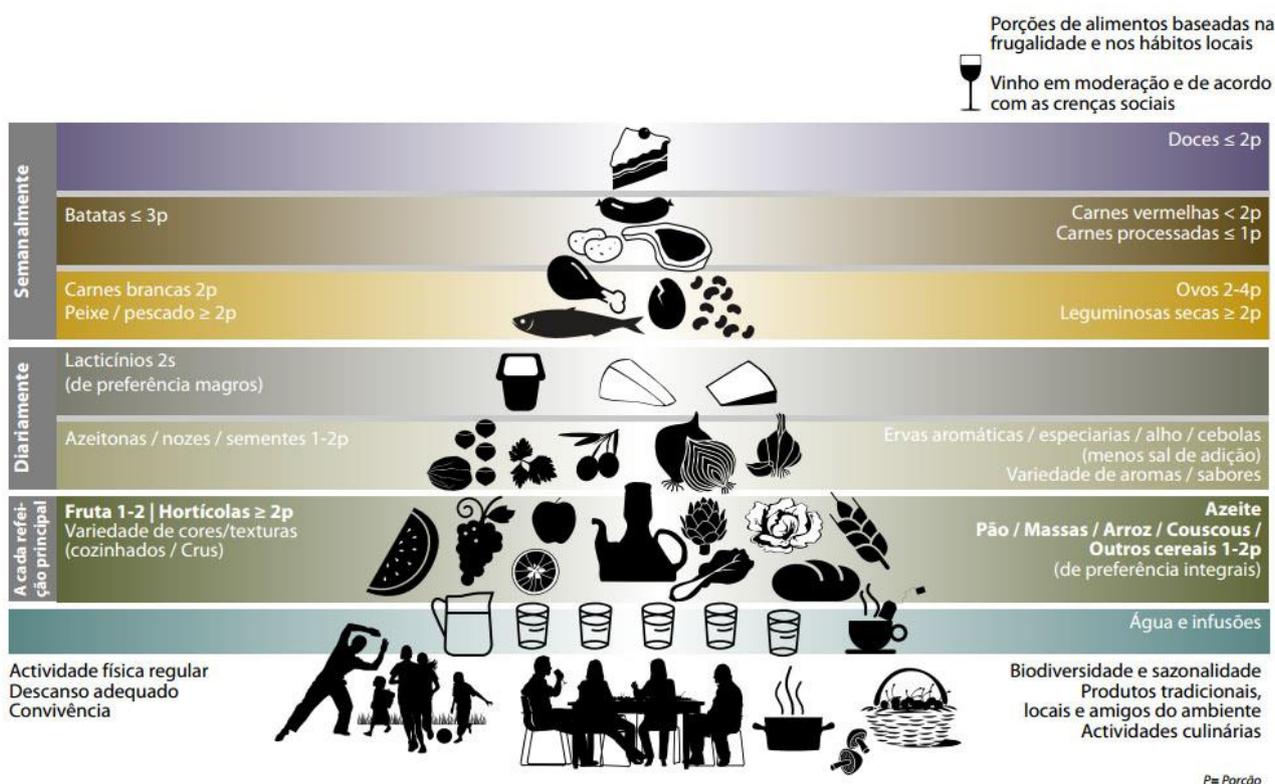


Figura 1 – A pirâmide da dieta mediterrânea (Associação Portuguesa de Nutricionistas – APN). Adaptado de: referência (6).

Um grupo alimentar que representa uma parte essencial na alimentação, tanto humana como animal, e que tem vindo a ser negligenciado ao longo dos anos, são as leguminosas (7). Através de dados adquiridos pelo Instituto Nacional de Estatística (INE) é possível verificar que, entre 2005 e 2012, ocorreu de facto uma diminuição tanto da produção como do consumo de leguminosas secas por parte da população portuguesa, sendo ainda possível confirmar que a produção é bastante inferior ao consumo (*Tabela 1*) (8). No entanto, em 2016 celebrou-se o Ano Internacional das Leguminosas. Esta foi uma das muitas iniciativas que a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) realizou para chamar a atenção para a importância do consumo de leguminosas. O objetivo foi comunicar a riqueza a nível de

proteínas, aminoácidos e fibra que as leguminosas podem trazer à alimentação da população, contribuindo para uma dieta mais saudável e preventiva em doenças, tais como, a diabetes, doenças cardiovasculares e cancro. Para além disso, as leguminosas têm propriedades fixadoras de azoto que podem contribuir para o aumento da fertilidade do solo e, como tal, têm um impacto positivo no ambiente (7,9,10).

Tabela 1 – Balanços de aprovisionamento das leguminosas secas; unidade: 10³ t. Adaptado de: referência (8).

Rubricas	Produção utilizável	Comércio internacional		Recursos disponíveis	Variação de existências	Utilização interna			Capitação	Grau de auto-aprovisionamento
		Entrada	Saída			Total	Da qual:			
							Alimentação animal	Consumo humano	kg	%
Total de leguminosa secas										
2005/2006	7	73	14	66	2	64	17	46	4,4	10,9
2006/2007	10	71	15	66	-1	67	21	45	4,2	14,9
2007/2008	8	72	18	62	3	59	12	46	4,3	13,6
2008/2009	7	75	19	63	2	61	13	47	4,4	11,5
2009/2010	6	72	25	53	-2	55	11	43	4,0	10,9
2010/2011	7	74	20	61	5	56	13	42	3,9	12,5
2011/2012 Po	5	53	14	44	-4	48	11	36	3,4	10,4
Feijão seco										
2005/2006	3	41	7	37	1	36	//	36	3,4	8,3
2006/2007	4	39	9	34	-1	35	//	35	3,3	11,4
2007/2008	4	46	11	39	3	36	//	36	3,4	11,1
2008/2009	3	46	12	37	1	36	//	36	3,4	8,3
2009/2010	2	44	14	32	-1	33	//	33	3,1	6,1
2010/2011	2	43	11	34	2	32	//	32	3,0	6,3
2011/2012 Po	2	31	9	24	-2	26	//	26	2,5	7,7
Grão-de-bico										
2005/2006	1	13	3	11	1	10	//	10	1,0	10,0
2006/2007	1	12	3	10	e	10	//	10	0,9	10,0
2007/2008	1	12	3	10	e	10	//	10	0,9	10,0
2008/2009	1	14	3	12	1	11	//	11	1,0	9,1
2009/2010	1	13	5	9	-1	10	//	10	0,9	10,0
2010/2011	1	16	4	13	3	10	//	10	0,9	10,0
2011/2012 Po	1	10	3	8	-2	10	//	10	0,9	10,0
Outras leguminosas secas										
2005/2006	3	19	4	18	e	18	17	//	//	16,7
2006/2007	5	20	3	22	e	22	21	//	//	22,7
2007/2008	3	14	4	13	e	13	12	//	//	23,1
2008/2009	3	15	4	14	e	14	13	//	//	21,4
2009/2010	3	15	6	12	e	12	11	//	//	25,0
2010/2011	4	15	5	14	e	14	13	//	//	28,6
2011/2012 Po	2	12	2	12	e	12	11	//	//	16,7

Assim, nos últimos anos, surge um aumento do interesse em investigar este grupo de alimentos, sendo que a qualidade nutricional, sensorial e a presença de compostos que podem contribuir para efeitos benéficos para a saúde, são aspetos a considerar. A qualidade nutricional, as suas características sensoriais e mais recentemente a evidência científica relativamente à contribuição de compostos minoritários para efeitos benéficos para a saúde, são fatores que influenciam a sua escolha por parte do consumidor.

1.1. Leguminosas

As leguminosas pertencem à família Leguminosae, também denominada de Fabaceae, sendo a terceira maior família de Angiospermas (plantas com flores e sementes protegidas por frutos) (11). Esta família é formada por uma grande variedade de plantas, incluindo algumas espécies destinadas ao uso culinário, agronómico e até mesmo ornamental (9). Uma característica típica das leguminosas é a ocorrência do fruto do tipo legume, também conhecido como vagem, exclusivo desta família. A família das leguminosas compreende cerca de 727 géneros e 19 325 espécies, dentre elas, espécies herbáceas e arbóreas, distribuídas em quase todas as regiões do mundo (11).

Com a crescente globalização das culturas e das atividades comerciais, começa a surgir um aumento do consumo de leguminosas, um elemento fundamental dos sistemas alimentares e das dietas um pouco por todo o mundo (12), uma vez que, são essenciais na dieta de uma grande porção da população mundial e muitas vezes complementada com cereais (9).

Outro aspeto relevante a mencionar sobre as leguminosas é o seu conteúdo rico em nutrientes, sendo que são uma excelente fonte de proteína, fibra, hidratos de carbono, vitaminas e sais minerais (Ca, Fe, K, Mg e Zn), ácidos gordos essenciais, saponinas, fitosteróis, e em alguns casos isoflavonas (9). É sabido também que alguns dos constituintes das leguminosas são potenciais agentes terapêuticos e preventivos de diversas doenças, como por exemplo, os hidratos de carbono e fibras alimentares, que contribuem para um baixo índice glicémico (IG), os oligossacáridos pré-bióticos, que exercem um papel importante na modelação da flora microbiana do cólon humano, os minerais, que são importantes na redução do risco de hipertensão e as isoflavonas, que oferecem inúmeros benefícios para a saúde, tais como, a redução do risco de cancro e osteoporose (9,13).

1.1.1 Relevância ecológica e económica

As leguminosas têm como características ecológicas mais relevantes o facto de terem uma relação de simbiose com bactérias do género *Rhizobium*, bem como, outras bactérias semelhantes que fixam o azoto da atmosfera. É nos nódulos radiculares que se concentram as colónias de bactérias, e são essas estruturas que tornam o processo de fixação de azoto mais eficiente, possibilitando o aporte de grandes quantidades de azoto ao ecossistema (14). Por terem uma grande capacidade de fixar azoto, algumas espécies de leguminosas são utilizadas para a melhoria de solos agrícolas. Assim, as leguminosas têm uma grande importância económica, sendo muito comum a multiplicidade de usos de uma única espécie, como é indicado na *Tabela 2* (15).

Tabela 2 – Multiplicidade de utilizações de diferentes espécies de leguminosas. Adaptado de: referência (15).

Utilização de leguminosas	Espécies
produção de grãos	soja (<i>Glycine max</i>)
	ervilha (<i>Pisum sativum</i>)
	feijão (<i>Phaseolus spp.</i>)
	amendoim (<i>Arachis hypogaea</i>)
	grão-de-bico (<i>Cicer arietinum</i>)
	fava (<i>Vicia faba</i>)
	tremoço (<i>Lupinus albus</i>)
	lentilha (<i>Lens culinaris</i>)
produção de forragem para animais	alfafa (<i>Medicago sativa</i>)
	gliricídia (<i>Gliricidia sepium</i>)
	leucena (<i>Leucaena leucocephala</i>)
	tremoço amarelo (<i>Lupinus luteus</i>)
pastagem	<i>Desmodium spp.</i>
	<i>Stylosanthes spp.</i>
	siratro (<i>Macroptilium atropurpureum</i>) trevo das pastagens (<i>Trifolium spp</i>)
ornamentação	flamboyant (<i>Delonix regia</i>)
	pata-de-vaca (<i>Bauhinia variegata</i>)
	sombreiro (<i>Clitoria fairchildiana</i>)
	ervilha de cheiro (<i>Lathyrus odoratus</i>)
madeira	jacarandá (<i>Dalbergia nigra</i>)
	cerejeira (<i>Amburana cearensis</i>)
	jatobá (<i>Hymenaea spp</i>)
	angelim (<i>Hymenolobium spp</i>)
	sucupira (<i>Pterodon emarginatus</i>)
extração de taninos	acácia-negra (<i>Acacia decurrens</i>)
adubo verde biológico	<i>Crotalaria spp.</i>
	<i>Mucuna spp.</i>
	<i>Canavalia spp.</i>
	<i>Gliricidia sepium,</i>
	<i>Leucaena leucocéfala</i> <i>Flemingia macrophylla</i>

recuperação de áreas degradadas

Mimosa spp.

Acacia spp.

Albizia spp.

Clitoria spp.

Enterolobium contortisiliquum

1.2. O feijão

As leguminosas, e em particular o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), constituem uma parte importante da dieta em diversas culturas (16). Originária no Novo Mundo (17), pensa-se que esta leguminosa tenha sido domesticada algures na América Latina há aproximadamente 7000 anos atrás (18), sendo que atualmente é uma das principais fontes de proteína na dieta um pouco por toda a América Latina e na África Oriental, e fundamental para a dieta vegetariana (19). No entanto, o seu consumo *per capita* tem vindo a diminuir, bem como, a sua produção.

Além do seu elevado teor proteico, o feijão é também um excelente fornecedor de outros nutrientes essenciais, tais como, ferro, cálcio, magnésio, zinco, vitaminas (principalmente do complexo B), hidratos de carbono e fibras (20). Por ser um alimento tão completo faz parte da alimentação da população com baixos recursos financeiros, verificando-se que constitui um produto de grande importância nutricional, económica e social (18,20). No entanto, é relevante mencionar que o valor nutritivo da proteína do feijão é baixo quando utilizado como única fonte proteica, mas quando combinado com arroz, por exemplo, forma uma mistura de proteínas mais nutritiva. Tal acontece porque o feijão é pobre em aminoácidos sulfurados, e rico em lisina e, por sua vez, o arroz é pobre em lisina e relativamente rico em aminoácidos sulfurados. Quando cru, o feijão possui baixa digestibilidade que é atribuída à atividade dos inibidores da protease, que diminuem a atividade das enzimas digestivas, podendo causar indisposição ao consumidor. Durante o tratamento térmico do feijão, no processo de preparação, por exemplo, ocorre inativação dos inibidores da protease, promovendo um efeito benéfico na digestibilidade (19,21).

Numa amostra seca, o conteúdo do feijão possui elevada quantidade de amido, fibra dietética, sais minerais e vitaminas (22,23), e possui também um conteúdo elevado em flavonóides, incluindo flavonóis, antocianinas, proantocianidinas e isoflavonas, bem como, alguns não flavonóides, como os ácidos fenólicos (24–26). Estes compostos designados por fitoquímicos são benéficos para a saúde por apresentarem um papel ativo na melhoria do estado de indivíduos doentes, tendo também grande potencial como ingrediente funcional e

nutracêutico, possuindo propriedades antioxidantes e anticancerígenas (27,28). Um desses compostos benéficos são os compostos fenólicos, que estão presentes maioritariamente no revestimento da semente, ou tegumento, sendo que também podem ser encontrados compostos nutracêuticos, ou seja, compostos que contêm um ou mais componentes biologicamente ativos, tais como, vitaminas, minerais e ácidos gordos, nos cotilédones, mas apenas em pequenas quantidades (Figura 2).

O teor de compostos fenólicos totais no feijão é influenciado por fatores genéticos e ambientais (18,29), e é responsável pela cor do revestimento da semente, uma vez que, possui uma grande diversidade quanto à sua composição em procianidinas, flavonóis e antocianidinas (26,30–34).

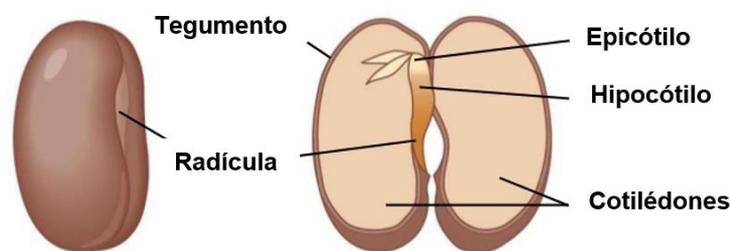


Figura 2 – Estruturas básicas da semente de feijão. Adaptado de: referência (35).

Em 2006, Luthria e Pastor-Corrales observaram diferentes teores de ácidos fenólicos em todas as variedades de feijão estudadas. O ácido ferúlico foi o ácido fenólico predominante em todas as variedades de feijão numa quantidade média de 17,8 mg/100 g de amostras de feijão seco em comparação com 6,3 e 7,0 mg/100 g de ácido *p*-cumárico e ácido sinápico, respetivamente (36). Dois anos depois, em 2008, Boateng, *et al* detetou proantocianidinas, ácido gálico e flavonóides em diferentes amostras de feijão seco, com teores que variavam entre 0,51-3,13, 3,42-7,21 e 0,61-0,84 mg/g, respetivamente (37).

O feijão ao ser introduzido na dieta, meio copo (130g) de feijão ou outras leguminosas como recomendado pela *Dietary Guidelines for Americans* (38), é considerado benéfico para indivíduos saudáveis, bem como, para indivíduos condicionados com síndromes metabólicas, uma vez que, diminui os valores de colesterol total sérico e colesterol LDL que em doenças cardiovasculares estão em valores elevados (18,39). Num ensaio epidemiológico, 2941 indivíduos, homens e mulheres, consumiram leguminosas quatro vezes ou mais por semana, numa porção de aproximadamente 98,6g, e o risco de contraírem doença coronária e doença cardiovascular diminuiu cerca de 22% e 11%, respetivamente, comparando com aqueles que consumiram leguminosas apenas uma vez por semana (18,40). Outro ensaio epidemiológico, realizado em 2008 por Maruyama, *et al* revelou que a suplementação de sumo de feijão *azuki*

a mulheres jovens resultou na diminuição significativa de triglicérides, sem alteração nas concentrações no colesterol HDL e LDL, prevenindo a hipercolesterolemia (18,41,42).

O consumo de alimentos como o feijão e outras leguminosas além de possuir um papel protetor na diabetes, é também considerado benéfico no controlo da população que sofre de diabetes *mellitus* tipo 2 (43). Ensaio epidemiológicos mostraram que o consumo de três ou mais refeições onde leguminosas estão presentes por semana levam a uma diminuição do risco de diabetes *mellitus* em 20-35%, em comparação com um menor consumo (44). Vários estudos indicam que o consumo de alimentos com baixo IG, como é o caso do feijão, é importante na redução da diabetes *mellitus* e da obesidade (45,46), sendo que foi observado que uma diminuição de 10% no IG resulta num aumento de cerca de 30% na sensibilidade à insulina (46).

É também sabido que a incidência de cancro pode ser reduzida através da alteração dos padrões alimentares (47). O stress oxidativo ao causar modificações extracelulares de macromoléculas origina espécies reativas de oxigénio (ROS) que, por sua vez, induzem a desnaturação proteica, a peroxidação lipídica e DNA *cross linking*, e são as principais causas das doenças crónicas degenerativas, em particular o cancro (48,49). Assim sendo, existem evidências significativas que sugerem uma relação entre uma dieta rica em feijão com a redução do risco de inúmeros tipos de cancro (47,50). Ensaio epidemiológicos sugerem que o consumo de feijão reduz a incidência do cancro do cólon, da mama e da próstata. Em 1981, Correa, *et al* examinou os dados de 41 países e verificou que os países com maior utilização de feijão apresentavam menor incidência de cancro da mama, cólon e próstata (51). Sing e Fraser, já em 1998, concluíram que consumir feijão mais de 2 vezes por semana está associado a uma redução de 47% no risco de cancro do cólon, em comparação com um consumo de menos de uma vez por semana (52). Do mesmo modo, Kolonel, *et al* em 2000, também encontraram uma relação inversa entre o consumo de feijão e o cancro da próstata (53).

1.2.2. A composição em amido resistente do feijão

Como já foi discutido anteriormente, a preocupação por parte do consumidor com a sua saúde é algo inquestionável nos dias de hoje, e entre os profissionais de saúde, há um consenso quanto ao facto de o aumento da ingestão de fibra na alimentação, alcançado pelo consumo de frutas, verduras, legumes e cereais integrais, ser uma das formas mais adequadas de controlar o peso e obter benefícios para a saúde. A Organização Mundial de Saúde (OMS) refere a diminuição do risco de obesidade e a provável diminuição do risco de diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares decorrentes do aumento da ingestão de fibra alimentar e cereais

integrais (54). Um componente dos alimentos que está descrito como tendo propriedades semelhantes às das fibras é o amido resistente (AR) (55).

Quimicamente, o amido é um polissacarídeo composto por unidades de glicose unidas por ligações α -D-(1-4) e/ou α -D-(1-6). O amido pode organizar-se em dois tipos de estruturas: a amilose, que consiste em cadeias lineares α -D-(1-4) de aproximadamente 1000 unidades e a amilopectina, que é constituída por cadeias lineares α -D-(1-4) com ramificações α -D-(1-6), e que pode chegar a 4000 unidades de glicose (Figura 3). De uma forma geral, a amilopectina é o maior componente, enquanto a amilose constitui entre 15 a 30% do teor em amido total, no entanto, esta proporção varia nos grânulos de amido (56,57).

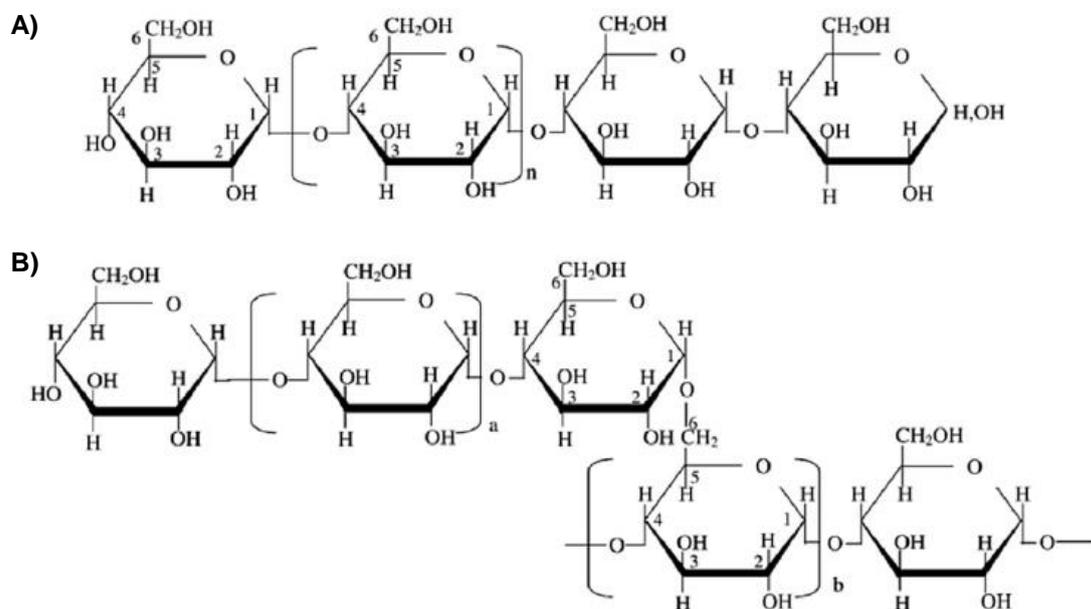


Figura 3 – Estrutura química da amilose (A) e da amilopectina (B) Adaptado de: referência (58)

O amido pode ser classificado de duas formas: (i) de acordo com o tamanho da cadeia de carbonos; e (ii) pela classificação nutricional, diretamente relacionada com a digestão. Quanto à classificação nutricional podemos classificar o amido como:

- (i) *amido rapidamente digerível*, onde a ação enzimática que resulta em glicose inicia-se na boca, com a amilase salivar, e estende-se até ao início do intestino delgado, num período de aproximadamente 20 minutos;
- (ii) *amido lentamente digerível*, no qual a ação enzimática ocorre ao longo de todo o intestino delgado, entre os 20 e os 110 minutos após ingestão;
- (iii) *amido resistente* à ação enzimática, que não é hidrolisado após 120 minutos, sendo, no entanto, fermentado pela microbiota intestinal, daí os alimentos ricos neste composto terem a designação de alimentos pré-bióticos, ou seja, são

substâncias que não são digeridas mas que têm efeitos benéficos para a saúde (55,56).

Sendo um componente natural da dieta, o AR quando atinge o cólon forma um substrato fermentativo para a microbiota intestinal. Os produtos finais desta fermentação são hidrogénio, dióxido de carbono, metano e ácidos gordos de cadeia curta (AGCC), sendo que, estes últimos, principalmente o butirato, contribui para a saúde do cólon, pois inibe o crescimento de células cancerígenas devido à redução do pH no intestino grosso (55).

Diversos estudos mostraram que o AR não possui todo o mesmo tipo de propriedades, e foi por isso classificado em cinco categorias (AR1-AR5), de acordo com as diferentes características que lhe permitem resistir à hidrólise:

- AR1 – é o amido que resiste à digestão, visto estar inacessível na matriz do alimento. É encontrado em estruturas vegetais, parcialmente inteiras ou mal moídas, como grãos e sementes. Devido à espessura das suas paredes celulares as leguminosas são uma fonte de AR1. Este tipo de amido é relativamente estável às temperaturas de confeção dos alimentos (aproximadamente 100°C), mas os processos que conduzem à rutura das paredes celulares, como a moagem ou a mastigação, diminuem a resistência deste tipo de amido (56,57);
- AR2 – consiste nos grânulos de amido não gelatinizados que conservaram a estrutura cristalina, pelo que não são hidrolisados pelas enzimas digestivas. O processamento e a confeção dos alimentos reduzem o teor em AR2. A banana verde, visto ser normalmente consumida crua, é a maior fonte de AR2 da dieta humana. No entanto, enzimas intrínsecas do fruto, durante o processo de amadurecimento, convertem o amido em açúcares, diminuindo o teor em AR2 (56,57);
- AR3 – está presente na maioria dos alimentos amiláceos que sofreram um tratamento térmico (gelatinização) e foram arrefecidos e posteriormente conservados durante algumas horas até vários meses. À medida que a temperatura do amido gelatinizado vai baixando, as cadeias de amido tendem a interagir mais fortemente, estabelecendo entre si pontes de hidrogénio e formando duplas hélices. Alimentos processados como batatas cozinhadas e arrefecidas, leguminosas enlatadas e flocos de milho são bons exemplos de alimentos com teores de AR3 elevados. Por ser tão estável pode ser utilizado como ingrediente numa grande variedade de alimentos (56,57);
- AR4 – são os amidos modificados obtidos por síntese química (ésteres e éteres), assim como, amidos com ligações cruzadas. Estes amidos modificados resistem à hidrólise enzimática e a sua composição química depende do amido-base e do tipo e grau de modificações produzidas. Um exemplo, é o amido de milho fosfatado, que em 2011, a Comissão Europeia aprovou como novo ingrediente alimentar para utilização

em diversos produtos (pão, massas alimentícias, cereais de pequeno-almoço e barras de cereais) (56,57);

- AR5 – este amido consiste em substâncias complexas formadas por amilose e lípidos polares. O AR5 requer altas temperaturas para gelatinizar e é mais suscetível de sofrer retrogradação, ou seja, de dilatar com o aumento da temperatura (56,57).

1.2.2.1. Fontes alimentares de amido resistente

Como já foi mencionado, o AR é um componente natural da dieta, e encontra-se fundamentalmente em alimentos vegetais ricos em amido, sendo que a sua quantidade varia com as espécies, ocorrendo também diferenças entre variedades da mesma espécie. O AR está presente nas folhas, nos tubérculos, nos frutos e nas sementes das espécies vegetais, quer na natureza, quer processados. No entanto, a preparação e o processamento ao qual os alimentos são sujeitos, tanto em casa como industrialmente, vai determinar substancialmente a proporção de amido que vai resistir à digestão (57).

A *Tabela 3* apresenta o teor em amido total e em AR de algumas leguminosas, cereais e derivados que constituem importantes fontes deste componente na alimentação humana.

Tabela 3 – Conteúdo de amido total e AR de algumas fontes alimentares (g/100 g de alimento). Adaptado de: referência (57).

Fonte Alimentar	Amido Total	Amido Resistente
<i>Leguminosas:</i>		
Feijão vermelho	42,6	24,6
Lentilhas	53,3	25,4
Feijão-frade	53,9	17,7
<i>Cereais:</i>		
Cevada	55,2	18,2
Milho	77,9	25,2
Arroz branco	95,1	14,1
Trigo	50,8	13,6
Aveia	43,4	7,2
<i>Farinhas:</i>		
Milho	84,3	11,0
Trigo	68,8	1,7
Arroz	86,9	1,6
Batata	81,0	1,7

Derivados de cereais:

Esparquete	73,0	3,3
Flocos de aveia	56,0	8,5
Tostas	67,4	1,4
Pão branco	46,7	1,9
Flocos de aveia extrudados	57,2	0,2
Cereais de trigo tufado	67,0	1,2
Papas de aveia	9,0	0,3
Esparquete cozido	n/a	2,9
Arroz cozido	n/a	3,7

Como se pode ver na *Tabela 3*, os grãos de cereais completos são ricos em amido, no entanto, o processo de transformação dos grãos em farinha origina alterações químicas, nomeadamente a diminuição do teor em AR, provavelmente devido à diminuição do AR1. Já em relação às leguminosas, estas apresentam uma elevada quantidade de AR que se mantém mesmo após a confeção. Por sua vez, nos frutos, o amido funciona como reserva energética e a sua concentração diminui com o amadurecimento. São bons exemplos a banana e a manga, visto que no estado imaturo (verdes) apresentam elevados teores de AR, 40-50% e 70-80%, respetivamente. No entanto, durante o processo de amadurecimento o teor em AR diminui gradualmente enquanto os açúcares (glicose, frutose e sacarose) têm um comportamento em sentido inverso (57).

Além das fontes naturais de AR, existem atualmente produtos comerciais que contêm concentrações elevadas de AR e que se destinam a enriquecer diversos produtos alimentares neste componente. Esta utilização torna-se particularmente interessante no contexto alimentar atual, em que o consumo de fibra proveniente de frutos, hortícolas e leguminosas é baixo e o excesso de peso e obesidade tomam proporções preocupantes (57,59).

1.2.2.2. *Teor de fibras e o índice glicémico: importância na saúde*

O índice glicémico (IG) é uma medida da resposta da glicose à ingestão de uma quantidade fixa de hidratos de carbono disponíveis no alimento, em comparação com igual quantidade do padrão (glicose anidra) (60).

O IG de um alimento é influenciado por diversos fatores, nomeadamente, o tipo de açúcar (frutose ou glucose), o tipo de amido (amilose ou amilopectina), a gelatinização do amido, o tipo de fibra (solúvel ou insolúvel), o processamento do alimento e a presença de lípidos ou proteína na refeição (61).

Hoje em dia é claro na comunidade científica que alimentos com um IG baixo ou elevado têm efeitos significativamente diferentes no metabolismo, sendo que refeições com IG elevado resultam num aumento rápido dos níveis de glicose no sangue e a insulina responde a esse

comportamento, concentrações elevadas de ácidos gordos livres que conseqüentemente podem causar alterações nas estruturas celulares, entre outros. Assim sendo, as evidências levam a concluir que uma dieta rica em alimentos com IG baixo beneficia o organismo (62). Tal como as fibras, o AR contribui para a diminuição do IG dos alimentos, proporcionando uma menor resposta glicémica e, conseqüentemente, uma menor resposta insulínica, tornando-se mais adequada, auxiliando no tratamento de diabetes, principalmente do tipo 2. Quando são consumidos alimentos ricos em fibra ocorre uma digestão lenta, ou seja, a absorção dá-se no decorrer de todo o intestino delgado, dando origem a uma resposta glicémica que se traduz numa curva mais atenuada (*Figura 4*), o que resultará numa menor libertação de insulina no sangue. Além disso, a presença do AR na alimentação diminui o risco de doenças cardiovasculares e contribui para a perda de peso, visto tratar-se de uma fibra insolúvel, ou seja, esta liga-se a moléculas de gordura e de açúcar que, posteriormente, são eliminadas do organismo, não sendo absorvidas pelo mesmo (55).

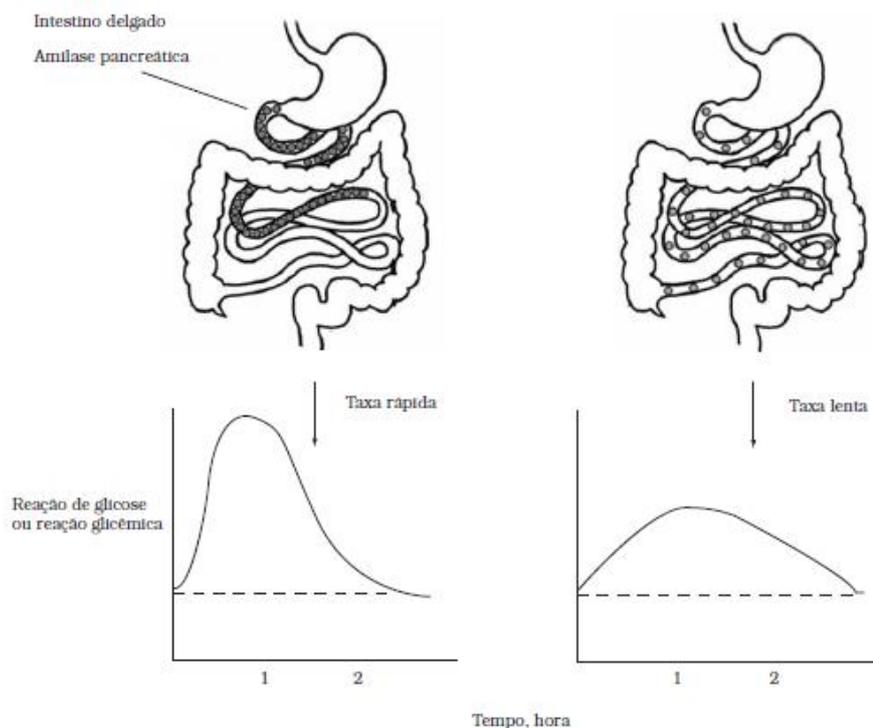


Figura 4 – Representação da taxa de controle da digestão (taxa rápida e taxa lenta) e da respetiva reação glicémica. Adaptado de: referência (55).

Um estudo realizado em 2011 por Basso, *et al* pretendia avaliar se o aumento do teor em AR se reflete na resposta glicémica e se o processo de congelamento influencia esse teor. Ao avaliar alimentos, como arroz, feijão e macarrão, bastante ricos em AR, concluiu que embora o congelamento das amostras tenha elevado os teores de AR, esse acréscimo não foi suficiente para refletir na resposta glicémica dos indivíduos. No entanto, também foi possível concluir que os alimentos congelados apresentaram aceitabilidade a nível sensorial após

descongelamento e aquecimento, mostrando ser possível aumentar o teor em AR sem interferir na qualidade sensorial dos produtos. (63).

1.2.2.3. *O amido resistente e a sua utilização comercial*

O AR está presente em diversos alimentos, como já foi descrito posteriormente, mas sabe-se que processos, como a esterilização ou a secagem a altas temperaturas, aumentam o nível de AR, enquanto que na cozedura ocorre perda de resistência do mesmo (55).

Começam assim a surgir produtos comerciais que contêm concentrações elevadas de AR, e que se destinam a enriquecer diversos produtos alimentares neste componente. Existem assim fórmulas comerciais de AR2 derivadas de amido de milho com elevado teor em amilose e de AR3 que são obtidas a partir da gelatinização e recristalização do amido de milho ou da tapioca. O AR4 também já se encontra disponível como ingrediente, sendo algumas fórmulas obtidas a partir da batata. Existe ainda um AR comercial, que tem a capacidade de resistir a processamentos que outros amidos não conseguiriam, designado de Hi-Maize 260. Este AR quando comparado com as fibras convencionais, apresenta muitas vantagens, por ser branco, possui um sabor suave, ter um tamanho pequeno, entre 10-15 μm , apresentar um teor calórico reduzido ($1,6 \text{ kcal.g}^{-1}$) e poder ser usado como complemento em alimentos/misturas alimentares com valor reduzido ou sem gordura (59).

Existem diversos estudos que demonstram que a presença de AR proporciona uma melhor aparência, textura, e uma melhor sensação na degustação do que determinadas fontes de fibras convencionais, melhorando também a expansão e sensação de crocância em determinados processamentos dos alimentos.

Com a utilização do AR, os biscoitos, por exemplo, tornam-se bastante mais crocantes e a capacidade de expansão do amido melhora a textura em cereais matinais, por exemplo. Estes ingredientes podem ser incorporados numa variedade de produtos alimentares, tais como, pão, biscoitos, bolachas e massas com a vantagem de não alterarem o processo de fabrico, o aspeto, a textura ou o sabor do alimento, tendo melhor paladar e aceitação por parte do consumidor final (59).

1.2.1. A composição volátil do feijão

Além dos benefícios já descritos para a saúde, o feijão, como qualquer alimento, possui características sensoriais que podem ser fatores decisórios no momento de compra por parte dos consumidores. A caracterização organoléptica é feita recorrendo a painéis de provadores treinados, o que requer um considerável dispêndio de tempo e trabalho. Entre as características mais apreciadas está o aroma, que resulta da libertação de compostos voláteis que vão interatuar com recetores ao nível do órgão olfativo.

Os compostos voláteis são os responsáveis pelo aroma dos alimentos, tendo sido já identificados mais de 7000 aromas diferentes. Estes compostos caracterizam-se por ter um baixo peso molecular (<300 Da) (9,64) e são o resultado do metabolismo primário e secundário das plantas (9,65). Este grupo de compostos subdivide-se em três classes principais: i) os compostos terpenóides – também designados por isoprenóides, onde se incluem os hemiterpenos, monoterpenos, diterpenos e sesquiterpenos; ii) os compostos fenilpropanóides e iii) os compostos derivados de ácidos gordos (9,64).

Este grupo de compostos desempenha um papel essencial nas plantas: i) na reprodução, atraindo polinizadores para garantir o sucesso da mesma; ii) na defesa contra fatores abióticos, através da sua ação antioxidante, ou seja, protegendo a planta contra o stress oxidativo induzido pelo ozono; iii) na defesa contra fatores bióticos, afetando direta e fisiologicamente os herbívoros, repelindo-os devido à sua toxicidade; iv) na defesa subterrânea da planta, atuando como agente antimicrobiano, anti herbívoro ou atraindo inimigos naturais do agente patogénico e, ainda, pela possibilidade de transporte de informação para plantas vizinhas ou partes distantes de uma mesma planta (9).

Em 1975, Buttery, *et al* desenvolveram estudos sobre os compostos voláteis presentes no feijão. No trabalho desenvolvido, estes investigadores realizaram destilações atmosféricas e a vácuo de grãos secos e demolhados para determinar os compostos voláteis no feijão cru e no feijão cozido, tendo sido capazes de detetar como compostos principais o 1-octen-3-ol, o 1-hexanol, a (Z)-5-octeno-2-ona, o (Z)-5-octeno-2-ol, o (Z)-3-hexen-1-ol, a (E,E)-3,5-octadien-2-ona, a 2,5-dimetil-pirazina, o benzaldeído e o 2-fenilacetaldeído no feijão cru, sendo que, no feijão cozido os principais componentes detetados foram a tialdina, o *p*-vinilguaiacol, compostos de tiazole, furanos, o 3,5-dimetil-1,2,4-tritriolano e a 2-metil-5-etilpiridina (66). Também Lovegren, *et al* em 1979, realizaram um estudo onde o 2-butanol, o 1-pentanol e o sulfureto de dimetilo foram identificados como os principais compostos voláteis do feijão vermelho, sendo que estes resultados foram obtidos através de cromatografia em fase gasosa associada a espectroscopia de massa (GC/MS) (67).

Já mais recentemente, em 2004, Van Ruth, *et al* usaram um método de reação de transferência de prótons associada a espectroscopia de massa (PTR-MS) para análise *in vitro*

e *in vivo* de compostos aromáticos do feijão vermelho em conserva. Os resultados obtidos indicavam a presença dos valores de m/z 33, 45, 59 e 73 que caracterizavam os compostos voláteis presentes em maior quantidade no feijão. No entanto, foi com a análise por GC/MS que conseguiram identificar os compostos majoritários, tal como o metanol (m/z 33), o 2-metilbutanal (m/z 45), a 2,3-butanodiona (m/z 59), o 2-metil-propanal (m/z 73) e a 2-butanona (m/z 73) (68). Noutro estudo, levado a cabo por Oomah, *et al* em 2007, foram identificados na totalidade 62 compostos a partir de sete variedades de feijão cru usando extração por *headspace* com microextração em fase sólida (HS-SPME). Neste estudo, os autores, com base na análise por componentes principais (ACP) concluíram que a (E, E)-3,5-octadien-2-ona, o 1-penten-3-ol e o benzaldeído são os compostos voláteis marcadores mais importantes no feijão cru. Fazendo uma comparação com os estudos anteriores referidos, o número de compostos identificados por Oomah, *et al* em 2007, utilizando HS-SPME e GC/MS (69), é bastante superior (Tabela 14).

Tabela 4 – Compostos voláteis identificados em amostras de feijão cru/cozido.

Amostra	Família dos compostos	Compostos identificados	Referências bibliográficas
Feijão cru	Álcool	1-Octen-3-ol	Buttery, Seifert e Ling (1975)
Feijão cru	Álcool	1-Hexanol	Buttery, Seifert e Ling (1975)
Feijão cru	Álcool	(Z)-5-Octeno-2-ol	Buttery, Seifert e Ling (1975)
Feijão cru	Álcool	(Z)-3-Hexen-1-ol	Buttery, Seifert e Ling (1975)
Feijão cru	Álcool	2-Butanol	Lovegren, Fisher, Legendre e Schuller (1979)
Feijão cru	Álcool	1-Pentanol	Lovegren, Fisher, Legendre e Schuller (1979)
Feijão cozido	Álcool	Metanol	Van Ruth, Dings, Buhr e Posthumus (2004)
Feijão cru	Álcool	1-Penten-3-ol ¹	Oomah, Liang e Balasubramanian (2007)
Feijão cru	Aldeído	Benzaldeído	Buttery, Seifert e Ling (1975)
Feijão cru	Aldeído	2-Fenilacetaldeído	Buttery, Seifert e Ling (1975)
Feijão cozido	Aldeído	Tialdina	Buttery, Seifert e Ling (1975)
Feijão cozido	Aldeído	2-Metilbutanal	Van Ruth, Dings, Buhr e Posthumus (2004)
Feijão cozido	Aldeído	2-Metil-propanal	Van Ruth, Dings, Buhr e Posthumus (2004)
Feijão cru	Aldeído	Benzaldeído ¹	Oomah, Liang e Balasubramanian (2007)

Feijão cru	Cetona	(Z)-5-Octeno-2-ona	Buttery, Seifert e Ling (1975)
Feijão cru	Cetona	(E,E)-3,5-Octadien-2-ona	Buttery, Seifert e Ling (1975)
Feijão cozido	Cetona	2,3-Butanodiona	Van Ruth, Dings, Buhr e Posthumus (2004)
Feijão cozido	Cetona	2-Butanona	Van Ruth, Dings, Buhr e Posthumus (2004)
Feijão cru	Cetona	(E, E)-3,5-Octadien-2-ona ¹	Oomah, Liang e Balasubramanian (2007)
Feijão cru	Éter	Sulfureto de dimetilo	Lovegren, Fisher, Legendre e Schuller (1979)
Feijão cozido	Hidrocarboneto	<i>p</i> -Vinilguaiacol	Buttery, Seifert e Ling (1975)
Feijão cru	Pirazina	2,5-Dimetil-pirazina	Buttery, Seifert e Ling (1975)
Feijão cozido	Piridina	2-Metil-5-etilpiridina	Buttery, Seifert e Ling (1975)
Feijão cozido	Tiol	3,5-Dimetil-1,2,4-tritriolano	Buttery, Seifert e Ling (1975)

¹ – compostos voláteis mais importantes no feijão cru dos 62 identificados na totalidade.

Em 2016, Mishra, *et al* estudaram diversas variedades de feijão cru e cozido. Do estudo realizado, resultou a identificação de 79 compostos voláteis, tendo sido observado durante a cozedura uma redução significativa no conteúdo de aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos com formação de vários compostos de enxofre, pirazinas, cetonas e álcoois. A avaliação sensorial efetuada, permitiu concluir que todas as variedades estudadas tinham diferentes aromas, ou seja, diferente composição em termos de compostos voláteis. Os dados resultantes da avaliação sensorial, do perfil volátil e os valores do limite de deteção revelaram que compostos, tais como, metanotiol, sulfureto de dietilo, metional e dimetil trissulfeto, podem ser os responsáveis pelo odor do feijão cozido. Neste estudo, concluiu-se essencialmente a importância do papel dos compostos voláteis gerados durante a cozedura do feijão e a sua igual importância na qualidade sensorial do produto a consumir (70).

2. OBJETIVOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este trabalho insere-se no âmbito do projeto nacional BEGEQA – Exploração da genética do feijoeiro para a inovação na qualidade e atratividade alimentar, financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), PTDC/AGR-TEC/3555/2012.

Em termos gerais, este estudo pretende contribuir para um maior conhecimento das variedades nacionais de feijão permitindo desta forma, a par de outras características avaliadas no âmbito de outros trabalhos, a avaliação de dois parâmetros que são importantes na aceitação do produto pelo consumidor: a qualidade nutricional e a qualidade organolética.

Assim os objetivos principais deste trabalho foram:

(i) estudo dos teores em AR em diferentes variedades nacionais de feijão e desenvolvimento de uma bolacha em que a farinha de feijão foi adicionada como ingrediente, posteriormente, fazer a avaliação da resposta glicémica e perceção da saciedade quando o produto foi consumido por um grupo de voluntários saudáveis;

(ii) avaliação da composição volátil de variedades de farinha de feijão cru.

O trabalho foi delineado de modo a cumprir as seguintes metas:

- Determinar o teor em AR em variedades de farinha de feijão cru de diferentes variedades produzidas em condições controladas;
- Estudar *in vivo* o efeito do consumo de uma bolacha enriquecida em farinha de feijão:
 - Desenvolver e formular uma bolacha à base de farinha de feijão;
 - Caracterizar a bolacha de feijão (BF), nomeadamente, quanto à sua composição nutricional, teor em AR, composição volátil, teor de fenóis e atividade antioxidante, e ainda determinação da atividade da tripsina, sempre em comparação com a bolacha de trigo (BT), e amostras de massa das bolachas cruas (MF e MT), ou no caso da atividade da tripsina, com a farinha de feijão crua (FC) utilizada na formulação da bolacha;
 - Realizar um ensaio *in vivo* com vista a determinar: (i) o efeito da ingestão da bolacha à base de farinha de feijão na resposta glicémica de indivíduos voluntários saudáveis; (ii) avaliar a perceção da saciedade após a ingestão das amostras em estudo; e ainda (iii) determinar o IG das bolachas.
- Identificar de compostos voláteis presentes em variedades de farinha de feijão cru.

3. METODOLOGIA

3.1 Amostragem

Foram estudadas 104 variedades de feijão que foram semeadas num campo com *design* de blocos incompletos e aleatorizados, com duas repetições (blocos), em dois ambientes diferentes. O primeiro ambiente, referente ao primeiro ano, foi em Sintra, Portugal, já o segundo ambiente, referente ao segundo ano, foi em Córdoba, Espanha. Todas as variedades provêm do Banco de Germoplasma na Unidade de Pesquisa de Biotecnologia e Recursos Genéticos, INIAV, Oeiras, Portugal.

As sementes foram moídas (Falling nº3100 – Perten, Sweeden) para produzir farinha com uma granulometria de 0,8 mm e posteriormente foram armazenadas a – 20°C até análise.

Neste trabalho foram somente estudadas as variedades provenientes do segundo ano de cultivo, no entanto, na análise da determinação do teor em AR os dados do primeiro ano, determinados por outro grupo do projeto utilizando a mesma metodologia, foram utilizados para comparação.

No *Anexo 1* apresenta-se a identificação de todas as variedades de farinha de feijão cru estudadas no âmbito desta tese, bem como, a descrição da cor e padrão da semente, atribuída de acordo com descritores de dados de *Phaseolus vulgaris* – *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR) (71). A descrição da cor da semente de feijão apenas é atribuída na ausência de um padrão, sendo que esta descrição foi realizada por outro grupo do projeto.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Materiais

Determinação do teor em amido resistente:

Cloreto de cálcio dihidratado obtido na Riedel-DeHäen, Seelze, Alemanha; ácido acético glacial obtido na SAFC, Missouri, EUA; restantes reagentes obtidos na Sigma-Altrich, Missouri, EUA; restantes soluções obtidas no *Resistant Starch Assay Kit (K-RSTAR) da Megazyme International Ireland Ltd.* adquirido na Enzymatic (Portugal).

Preparação de extratos para determinação do teor em amido resistente:

Éter dietílico obtido na Riedel-DeHäen, Seelze, Alemanha; acetato de sódio e o metanol obtidos na Carlo Erba, Val-de-Reuil, França; restantes reagentes obtidos na Sigma-Altrich, Missouri, EUA.

Determinação do teor em fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu:

Carbonato de sódio obtido na Panreac, Barcelona, Espanha; restantes reagentes obtidos na Sigma-Altrich, Missouri, EUA.

Determinação da atividade antioxidante pelo método de ORAC:

Cloreto de sódio obtido na May&Baker, Dagenham, Reino Unido; fosfato monopotássico e fosfato de sódio dihidratado obtidos na Riedel-DeHäen Seelze, Alemanha; restantes reagentes obtidos na Sigma-Altrich, Missouri, EUA.

Determinação do teor de inibidores da atividade da tripsina:

Todos os reagentes utilizados foram adquiridos na Sigma-Altrich, Missouri, EUA.

Determinação do índice glicêmico da bolacha de feijão e da bolacha de trigo:

Glicose anidra adquirida na Sigma-Altrich, Missouri, EUA.

Identificação de compostos voláteis em farinha de feijão cru por microextração em fase sólida e cromatografia em fase gasosa associada a espectrometria de massa (SPME-GC/MS):

Solução padrão de alcanos C8-C20 obtida na Sigma-Altrich, Missouri, EUA; fibras do tipo divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) para microextração em fase sólida (SPME) da marca Supelco adquirida na Sigma-Altrich, Missouri, EUA.

A água utilizada neste trabalho foi purificada num sistema Milli-Q-Millipore, 0,22µm, EUA.

3.2.2 Métodos

3.2.2.1. Determinação do teor em amido resistente na farinha de feijão cru

O amido resistente (AR) foi quantificado segundo o método oficial AACC 32-40.01 (126) e AOAC 2002.02 (127). O método foi realizado utilizando o *Resistant Starch Assay Kit (K-RSTAR)*. Sumariamente, a amostra foi descongelada, homogeneizada e pesada, em duplicado, numa toma de amostra de 100 ± 5 mg. Foi adicionada solução tampão de maleato de sódio (pH 6,0) contendo as enzimas α -amilase pancreática e amiloglucosidade, e após homogeneização procedeu-se à incubação das amostras num banho de água com agitação horizontal (100 rpm) a 37°C, durante 16 h. Com este procedimento pretendeu-se simular o processo digestivo, sendo que o amido não resistente foi dissolvido e hidrolisado a glicose por ação combinada das duas enzimas, ficando dissolvido na fração líquida. Após as 16h de incubação, a reação foi interrompida pela adição de etanol (99% v/v) e as duas fases foram separadas por centrifugação a 3000 rpm durante 10 min, obtendo-se o AR no resíduo sólido (*pellet*) e o amido não resistente na fração líquida. O resíduo sólido foi lavado mais duas vezes com solução de etanol (50% v/v) seguido de centrifugação. A fração aquosa foi rejeitada e o resíduo sólido (contendo o AR) foi dissolvido em solução de hidróxido de potássio (2M) com agitação contínua em banho de água e gelo durante 20 min. Após este tempo a solução foi neutralizada com solução tampão de acetato de sódio (pH 3,8) e o amido foi hidrolisado a glicose pela ação da enzima amiloglucosidade em banho de água a 50°C durante 30 min. Todo o AR da amostra foi, nesta fase, transformado em glicose. As amostras foram novamente centrifugadas e foi retirada uma alíquota de 0,1 mL da fração líquida, em duplicado. Em simultâneo foi preparado um ensaio branco com 0,1 mL de solução tampão de acetato de sódio 0,1M (pH=4,5) e quatro padrões de glicose com 0,1 mL de solução de glicose (1 mg/mL). Para o doseamento da glicose por método espectrofotométrico foram adicionados 3 mL de reagente de glicose oxidase/peroxidase (GOPOD) a todos os tubos, seguido de incubação a 50°C durante 20 min e leitura da absorvância de cada solução a 510 nm contra o ensaio branco. A média dos valores do teor de glicose das duas repetições de cada amostra corresponde à concentração de AR da amostra ensaiada quando comparada com os valores dos padrões de glicose.

3.2.2.2. Desenvolvimento de uma bolacha à base de farinha de feijão

a) Formulação da bolacha

A escolha da variedade de feijão moleiro para o desenvolvimento das bolachas e delineamento do ensaio *in vivo* foi feita por esta ser a única, dentro da coleção de variedades do projeto BEGEQA, que se encontrava na quantidade necessária para a formulação das bolachas em questão.

Os ingredientes para a preparação das bolachas confeccionadas de acordo com a receita descrita por Sparvoli, *et al* em 2016 incluem: 540 g de farinha (240 g de farinha de trigo, 150 g de farinha de milho, 150 g de farinha de feijão), 300 g de cana de açúcar, 300 g de manteiga, 2 ovos médios (aproximadamente 110 g), 2 g de sal, 14 g de fermento e extrato de baunilha (72). Com base neste trabalho e após várias tentativas, onde foram testadas diferentes proporções das farinhas utilizadas, adição de mais ovos à massa, remoção do extrato de baunilha, chegou-se à formulação final das bolachas de feijão. A *Tabela 5* apresenta os ingredientes finais utilizados e as respectivas proporções.

Tabela 5 – Ingredientes e respectivas quantidades, utilizados na formulação da bolacha de feijão (BF) e na bolacha de trigo (BT).

Ingredientes	Quantidade (g)/6bolachas	
	Bolacha de Feijão	Bolacha de Trigo
Farinha de Trigo tipo 55	30	135
Farinha de Milho tipo 70	30	0
Farinha de Feijão	75	0
Ovo cru	55	55
Açúcar Branco	75	75
Manteiga	50	50
Sal	2	2
Fermento	4	4

Para a quantidade de bolachas necessária para o ensaio foi necessário multiplicar a quantidade de ingredientes a utilizar. Assim, na formulação das bolachas os ingredientes sólidos foram misturados primeiro (farinha, açúcar, sal e fermento) e após esse processo,

foram introduzidos os ovos e a manteiga, previamente derretida, e voltou a misturar-se tudo até à obtenção da consistência desejada. De seguida, a massa foi estendida em forma de bolacha em diversos tabuleiros que foram ao forno a 180°C durante, aproximadamente, 10-15 minutos. Todos os ingredientes utilizados foram adquiridos no supermercado Pingo Doce, sendo todos da própria marca Pingo Doce, à exceção da farinha de Trigo tipo 55, que foi da marca Branca de Neve, e da Farinha de Milho, que foi da marca Nacional.

b) Caracterização química das bolachas desenvolvidas

Para a caracterização das bolachas em estudo foram realizadas as seguintes análises: composição nutricional das bolachas (valor energético, proteínas, hidratos de carbono e açúcares, lípidos incluindo os ácidos gordos saturados, ácidos gordos monoinsaturados e ácidos gordos polinsaturados, fibra alimentar e sal), quantificação do teor em AR¹, identificação e quantificação relativa de compostos voláteis¹, teor em compostos fenólicos totais², atividade antioxidante² e determinação da atividade dos inibidores da tripsina².

i. Extração de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos presentes nas amostras de bolacha de feijão e de trigo bem como nas amostras da massa de ambas as bolachas, foram extraídos de acordo com o procedimento descrito por Zilic, *et al* (73). De uma forma resumida, as amostras, previamente liofilizadas, foram sujeitas a uma hidrólise alcalina. A amostra foi pesada em duplicado e, às 500 mg de amostra, foram adicionados 10 mL de hidróxido de sódio (4 mol/L). Após um período de espera de 4 horas, foi ajustado o pH de todas as amostras para 2,0 com cloreto de hidrogénio (6 mol/L). Posteriormente, 4 mL do hidrolisado foram extraídos com 5 mL de acetato de etilo e éter dietilo (1:1), sendo repetido o processo três vezes e entre cada extração a amostra foi centrifugada (1000 rpm; 5 min). De seguida, 5 mL do extrato foram evaporados até à secura no *SpeedVac* e os resíduos redissolvidos em 1,5 mL de metanol. Por fim, as amostras foram filtradas com filtros PVDF (0,22 µm).

¹ Método já descrito;

² Método descrito no seguimento da Metodologia.

ii. Análise do teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu

O teor em fenóis totais foi determinado pelo método de *Folin-Ciocalteu*, seguindo uma metodologia interna do laboratório e já descrita em Figueira, *et al* (74). Sumariamente, numa placa de 96 poços foram colocados 230 μL de água Mili-Q e 10 μL de amostra, ou água Mili-Q, no caso do branco, ou ainda padrão de ácido gálico (AG) (solução mãe 1000 mg/L). De seguida, foram adicionados 15 μL de reagente de *Folin-Ciocalteu* e, após alguns segundos de espera, foram pipetados 45 μL de carbonato de sódio (35%). Posteriormente, a placa foi incubada à temperatura ambiente, protegida da luz, durante 1h e após esse período foi medida a absorvância a 765 nm no leitor de placas Spark™ 10M da Tecan, Suíça. As concentrações utilizadas na reta de calibração de AG foram compreendidas entre os 0 mg/L e os 240 mg/L ($r^2=0,9944$).

iii. Análise da atividade antioxidante pelo método de ORAC

A atividade antioxidante foi determinada através do método de ORAC, seguindo uma metodologia interna do laboratório e já descrita em Figueira, *et al* (74). Para a realização desta metodologia foi necessário utilizar uma placa preta de 96 poços. Primeiramente, adicionou-se aos 36 poços externos 175 μL de água destilada, de forma a prevenir a possível evaporação das amostras existentes nos poços internos. Nos poços interiores foi adicionado 25 μL de amostra ou de padrão de Trolox (no caso da reta de calibração), sendo que, como controlo foi utilizada uma solução de PBS (75 mM). Posteriormente, foi adicionado a todos os poços 150 μL de Fluoresceína (3×10^{-4} mM). A solução de PBS foi utilizada na diluição das amostras e da solução mãe de Trolox (5000 μL). De seguida, a placa ficou a incubar a 37°C, sem exposição à luz, durante 10 minutos. Após este período, prosseguiu-se à medição da placa no fluorímetro, durante 40 minutos com leituras em intervalos de 1 minuto. As concentrações finais utilizadas na reta de calibração de Trolox foram compreendidas entre os 0 μM e os 40 μM ($r^2=0,9843$). O software de análise de dados foi o BioTEK Gen5 da Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EUA.

iv. Determinação do teor de inibidores da atividade da tripsina

O teor de inibidores da atividade da tripsina (TIA) foi determinado através do método descrito na ISO14902:2001(E) *Animal feeding stuffs – Determination of trypsin inhibitor activity of soya products* (75). Foram analisadas amostras de bolacha de feijão (BF) e farinha de feijão cru (FC). Sumariamente, procedeu-se à extração de $1,000 \pm 0,001\text{g}$ de amostra em hidróxido de sódio (0,01M), e posteriormente armazenou-se no frigorífico durante a noite (15-24h). Após

esse período foi necessário reconstituir os extratos com 50 mL de água e diluir, também com água, à temperatura ambiente. Para estimar o valor dos TIA, procedeu-se a 3 diluições diferentes, sendo que, pelo menos uma das diluições, deveria estar no intervalo entre 40 – 60% de inibição. Na *Tabela 6* é indicado como se procedeu em relação à preparação das soluções para a determinação do teor de TIA de uma amostra.

Tabela 6 – Esquema de volumes a pipetar para a determinação do teor de inibidores da atividade da tripsina (TIA).

Reagentes	Branco	Tripsina	Branco amostra	Amostra	
L-BAPA	5	5	5	5	
Amostra diluída	0	0	1	1	
H ₂ O	3	3	2	2	
Ácido acético	1	0	1	0	
Solução de tripsina	1	1	1	1	→ 37 ± 0,25 °C (10min)
Ácido acético	0	1	0	1	→ 37 ± 0,25 °C (10min ± 5 seg)
V _{final} (mL)	10	10	10	10	

Como é possível verificar na *Tabela 6*, após a adição do ácido acético, as amostras foram incubadas a 37 ± 0,25 °C, durante 10 minutos, sendo que, após a adição de tripsina foram incubadas novamente nas mesmas condições. Quando a sequência de pipetagens foi terminada procedeu-se à centrifugação das soluções e, de seguida, foi realizada a medição da absorvância, em relação à água, a 410 nm. De registar que as soluções são estáveis apenas durante 2h.

Os cálculos para a obtenção do teor de TIA (percentagem de inibição) foram feitos utilizando a *Equação 1*:

$$\text{Equação 1} \quad I (\%) = \frac{(A_r - A_{br}) - (A_s - A_{bs})}{A_r - A_{br}} \times 100$$

Na fórmula apresentada, A_r é a absorvância da solução de tripsina, A_{br} é a absorvância do branco com tripsina, A_s é a absorvância da amostra e A_{bs} é a absorvância do branco com amostra.

Neste método é recomendado que se proceda à medição da atividade enzimática da tripsina bovina, para perceber se a sua atividade se mantém estável durante o tempo em que decorre o ensaio. Assim, e realizando o procedimento acima descrito, é aceitável se os valores de absorvância da tripsina forem de $0,380 \pm 0,050$.

c) Estudo do efeito da ingestão de bolachas à base de farinha de feijão

Foi realizado um ensaio *in vivo* com dezasseis indivíduos voluntários saudáveis. As amostras testadas foram a bolacha de feijão, com elevado teor em AR, e uma bolacha de trigo, com baixo teor em AR, que representa o controlo. Para avaliação do IG das duas bolachas testadas os voluntários ingeriram glicose anidra.

População em estudo

A população alvo de estudo foi selecionada de entre um grupo de voluntários, sendo que estes para participarem tiveram que preencher os seguintes requisitos (59):

- Idade compreendida entre 18 e 36 anos;
- Peso estável nos últimos 3 meses;
- Não ter diagnóstico médico de diabetes ou outras doenças endócrinas;
- Não ter história clínica de doença gastrointestinal ou distúrbios endócrinos;
- Não estar a tomar medicamentos que interfiram com o metabolismo glicídico ou lipídico (antidiabéticos orais, insulina, estatinas, fibratos, corticosteróides, antibióticos, antiretrovirais, entre outros);
- Não ter estado internado nos últimos 3 meses;
- Não estar grávida ou a amamentar;
- Não ser fumador;
- Efetuar regularmente a refeição do pequeno-almoço.

Todos os indivíduos que participaram no ensaio foram informados oralmente e por escrito (*Anexo 2*) de todos os procedimentos e assinaram um documento de consentimento informado (*Anexo 3*).

A cada voluntário foi também pedido que preenchesse uma ficha individual (*Anexo 4*) com contactos pessoais (*e-mail*, número de telemóvel), data de nascimento, peso, altura e se preenchiam os requisitos para participar no estudo.

Orientações e procedimentos pré-intervenção

Os voluntários foram orientados para que no dia antes de cada ensaio evitassem exercício físico intenso, ingestão de álcool e ingestão de alimentos especialmente ricos em fibra na refeição do jantar (cereais integrais e hortícolas em abundância). Foi também recomendado que na véspera dos dias dos ensaios a refeição do jantar fosse o mais semelhante possível ao habitual, realizada por volta das 20 horas, e que não ingerissem alimentos ou bebidas desde o jantar até ao momento do ensaio.

Desenho experimental

Na totalidade participaram 16 voluntários. No dia do ensaio, a chegada dos voluntários, em jejum, deu-se entre as 8h00 e as 9h30. De seguida, foi realizada a leitura da glicémia capilar (tempo 0 min; jejum), utilizando um glicosímetro (GLUCOCARD™ SM), e logo depois foi entregue um questionário, tipo Escala Visual Analógica (VAS) (*Anexo 5*), para avaliação da percepção da saciedade. Após o seu preenchimento, o questionário foi recolhido, não sendo possível o voluntário ter de novo acesso ao mesmo. Após aproximadamente 12 a 15 minutos, os voluntários consumiram a amostra a ser testada. Em diferentes tempos (15, 30, 45, 60 e 120 min), e após o consumo da bolacha, foi feita a determinação da glicémia capilar e foi pedido que fosse preenchido o questionário VAS, tal como se tinha feito no tempo 0 min. Um esquema do desenho experimental é apresentado na *Figura 5* para uma mais fácil percepção do que foi realizado.

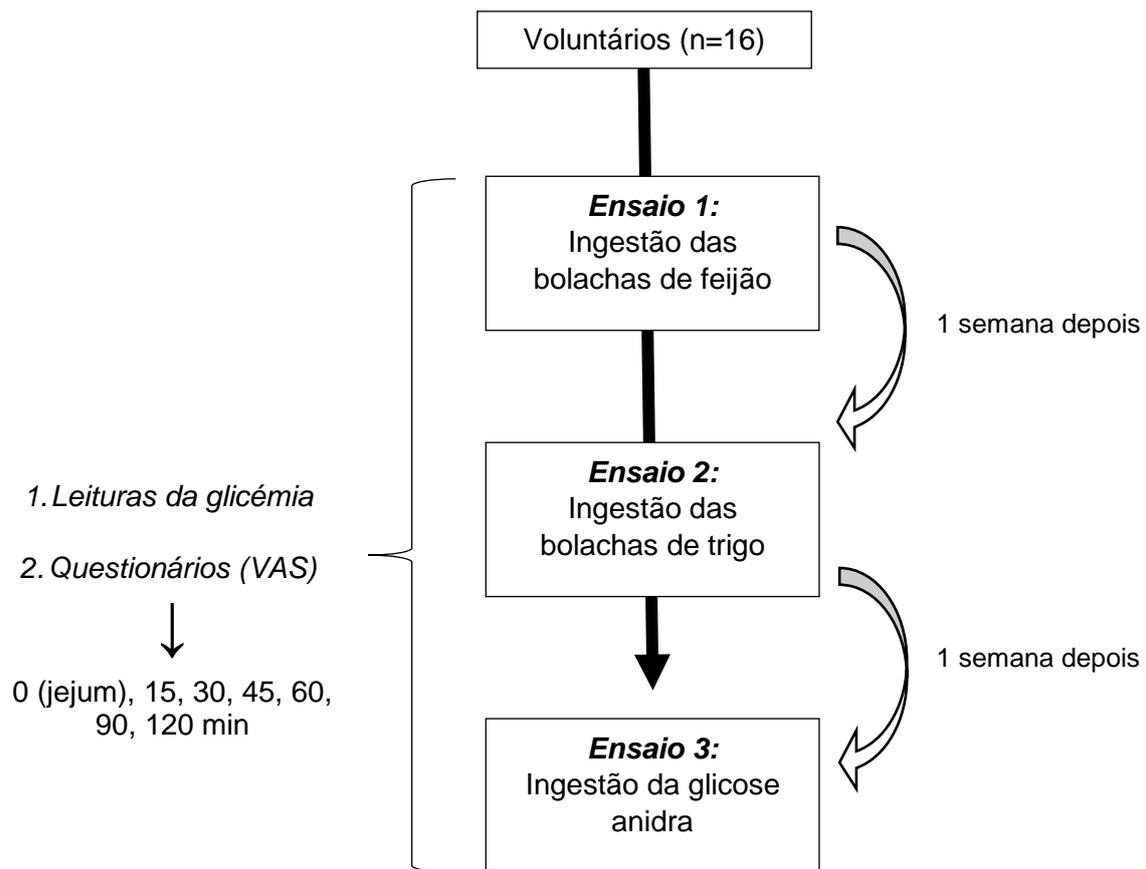


Figura 5 – Esquema que sumariza o desenho experimental do ensaio *in vivo*.

Os voluntários realizaram três ensaios:

- (i) consumo de 2 bolachas (aproximadamente 85 g no total), que contêm na sua composição farinha de feijão (bolacha teste) e beberam 250 mL de água;
- (ii) consumo de 2 bolachas (aproximadamente 85 g no total), que contêm na sua composição farinha de trigo (bolacha controlo) e beberam 250 mL de água;
- (iii) consumo de 50 g de glicose anidra dissolvida em 250 mL de água.

Cada ensaio foi realizado com uma semana de intervalo. O ensaio (iii) foi realizado com o objetivo de determinar o IG das duas bolachas em estudo. O IG reflete o potencial de aumento da glicémia de um alimento em comparação com o padrão, a glicose anidra. Este índice é uma propriedade do alimento, não devendo ser confundido com resposta glicémica. A Equação 2 mostra como se calcula o IG (76):

$$\text{Equação 2} \quad IG = \frac{\sum_{x=1}^n 100 \times F_x \div \bar{G}_x}{n}$$

Na equação apresentada, F_x é o incremento da área incremental abaixo da curva da glicémia (AUC) no sujeito x provocado por uma dose de alimento testado que contenha 50 g de hidratos

de carbono disponíveis e $G\bar{x}$ corresponde à AUC média no sujeito x provocado por 50 g de glicose. O IG corresponde à média destes valores em n sujeitos, que deve ser de pelo menos 10 participantes.

3.2.2.3. Identificação de compostos voláteis em farinha de feijão cru por microextração em fase sólida e cromatografia em fase gasosa associada a espectrometria de massa (SPME-GC/MS)

a) Preparação da amostra

As 91 variedades de farinha de feijão cru foram analisadas por microextração em fase sólida (SPME) em *vials* de 10 mL. Cada amostra foi pesada, aproximadamente 500 mg, e à farinha foram adicionados 2 mL de água Milli-Q, sendo posteriormente agitados no vortex, durante 1 min.

b) Equipamento

O estudo da composição volátil das variedades foi efetuado por cromatografia em fase gasosa associada a espectrometria de massa (GC/MS). A análise dos compostos voláteis foi executada utilizando um cromatógrafo de fase gasosa associado a um espectrómetro de massa – GC/MS QP 2010 Plus da Shimadzu. Foi utilizada uma coluna polar DB-WAX (60m x 0,25 μ m x 0,25 μ m), J&W Scientific Inc. A este equipamento está também associado um amostrador automático AOC-5000 (Shimadzu). Nas variedades sujeitas a SPME foi utilizada uma fibra do tipo DVB/CAR/PDMS.

A metodologia utilizada para este método foi a utilizada em trabalhos realizados anteriormente (77).

c) Condições de análise

Microextração em fase sólida (SPME):

As condições da extração foram as seguintes: a temperatura de incubação utilizada foi 40°C, agitação do *vial* a uma velocidade de 250 rpm. O tempo de extração da amostra foi de 40 min e o tempo de dessorção no injetor a 250°C foi de 3 min.

Cromatografia em fase gasosa associada a espectrometria de massa (GC/MS):

A análise das variedades por cromatografia em fase gasosa associada a espectroscopia de massa (GC/MS) foi realizada nas seguintes condições: injetor a 250°C, no modo *splitless* (1,5min), com uma razão de *split* 1/50; os compostos foram analisados numa coluna capilar DB-WAX (60 m x 0,25 µm x 0,25 µm), com o seguinte programa de temperaturas: 40°C durante 5 min, seguindo-se um aumento gradual de 5°C/min até à temperatura 170 °C e por fim houve um incremento de 30°C/min até à temperatura final de 230°C, sendo o tempo total de análise 37 min. O espectrómetro de massa foi utilizado no modo de impacto de eletrões (EI), gerados a 70eV e foi coberta a gama de *m/z* de 29 a 300. A fonte de ionização estava a uma temperatura de 245°C.

3.2.3 Tratamento estatístico dos resultados

O tratamento estatístico dos dados foi efetuado utilizando o *programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS)*, versão 24.0.

Os resultados da determinação do teor em AR do feijão e do desenvolvimento de uma bolacha à base de farinha de feijão foram apresentados como média ± desvio padrão.

Para analisar os resultados da determinação do teor em AR foi utilizada uma *Two-way ANOVA*. Na comparação das variedades divididas em grupos de acordo com a cor e padrão da semente foi utilizado uma *One-way ANOVA*.

Para analisar os dados da glicémia e percepção da saciedade foram utilizados testes não paramétricos, sendo que nos dados da glicémia foi utilizado o teste de *Mann-Whitney*, e no caso da saciedade foi utilizado o teste de *Wilcoxon*. O cálculo da área incremental abaixo da curva da glicémia (AUC) foi efetuado geometricamente por aplicação do método trapezoidal e ignorando as áreas abaixo da linha do jejum. A análise desses dados em relação à glicémia foi feita através da *One-way ANOVA*, sendo que em relação à percepção da saciedade foi feita através do teste não paramétrico de *Wilcoxon*.

Os pressupostos para aplicação destes tratamentos estatísticos, nomeadamente a normalidade das distribuições e a homogeneidade de variâncias foram avaliados, respetivamente com o teste de *Shapiro-Wilk* e com o teste de *Levene*. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados onde o *p-value* foi inferior ou igual a 0,05.

O software utilizado na identificação dos compostos voláteis foi o *GCMSolutions* versão 2.10 – *LabSolutions*, também da *Shimadzu*. O espectrómetro de massa dispunha das seguintes bibliotecas de massas: NIST 12, NIST 27, NIST 62, NIST 107, NIST 147 e WILEY 229.

De forma a reduzir o número de entradas na projeção da análise por componentes principais (ACP) foi realizada uma *Two-way* ANOVA e uma correlação das variáveis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação do teor em amido resistente na farinha de feijão cru

A determinação do teor em AR foi feita nas 91 variedades de farinha de feijão cru referentes ao segundo ano do projeto, ou seja, ao bloco 3 e bloco 4, e os resultados obtidos encontram-se apresentados no *Anexo 6*. Os teores correspondentes ao primeiro ano do projeto, bloco 1 e bloco 2, foram determinados por outra equipa do projeto, utilizando a mesma metodologia. A comparação dos resultados teve como objetivo avaliar se haveria influência ambiental nos teores em AR das variedades, uma vez que o primeiro ano foi cultivado em Sintra, Portugal e o segundo ano em Córdoba, Espanha. Para estudar este efeito foram apenas consideradas as variedades que tinham sido analisadas em ambos os anos do projeto (n=48).

Para as 48 variedades cultivadas em ambos os anos, os valores de AR encontram-se entre os 24,00g/100g e os 43,27g/100g expresso em matéria seca (*Anexo 6*) e estão de acordo com os descritos na literatura (78–80).

Para verificar se existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois ensaios de campo do projeto (dois ambientes testados) foi realizada uma análise *Two-way ANOVA* (*Tabela 7*). Com este teste foi possível verificar que não existem diferenças significativas entre os teores em AR determinados e as diferentes variedades analisadas ($P=0,149$). Foi possível confirmar que existem diferenças significativas entre os teores em AR e o ambiente onde as variedades foram cultivadas ($P<0,001$). Os teores em AR estão assim dependentes do local onde as variedades de feijão são cultivadas, no primeiro ano do projeto em Sintra, Portugal, e no segundo ano em Córdoba, Espanha.

Utilizando a *Two-way ANOVA* foi possível testar se havia interação significativa entre o fator variedade e o fator ambiente, verificando-se com esta análise que a interação acontece ($P<0,001$). Os resultados obtidos mostram que as variedades com elevado teor em AR no primeiro ano não são necessariamente as mesmas no segundo ano do projeto.

Tabela 7 – Resultados obtidos no tratamento estatístico (*Two-way ANOVA*).

	<i>p-value</i>
<i>Variedade</i>	0,149
<i>Ambiente</i>	0,000
<i>Variedade x Ambiente</i>	0,000

Posteriormente, as 48 variedades foram divididas em grupos de acordo com a cor e padrão da semente. Esta divisão foi feita para perceber, do ponto de vista comercial, se existiria alguma relação entre o teor em AR e as classes comerciais de feijão estudadas, tendo em conta apenas a cor e padrão da semente e não o seu tamanho.

As variedades foram agrupadas da seguinte forma: às riscas (n=15), vermelho (n=1), colorido à volta do *hilum* (n=1), rosa (n=5), branco (n=5), vermelho arroxeadado (n=6), castanho (n=4), preto (n=1), castanho claro (n=3), manchado com cor marginal (n=4), bicolor às pintas (n=2) e amarelo (n=1). Na *Figura 6* estão representadas algumas das variedades de feijão estudadas, sendo possível observar diferenças quanto à cor e padrão de cada uma.



Figura 6 – Algumas variedades de feijão estudadas, organizadas por cor e padrão da semente.

Assim, foi realizada uma *One-way ANOVA* para perceber se de facto existiria alguma relação entre o teor em AR e as classes comerciais de feijão estudadas (fator cor). Os resultados obtidos mostram que o teor em AR não é influenciado pela cor e padrão da semente ($P=0,388$).

4.2 Desenvolvimento de uma bolacha à base de farinha de feijão

4.2.1 Caracterização química das bolachas desenvolvidas

A bolacha de feijão (BF) e a bolacha de trigo (BT) foram analisadas com vista à sua caracterização, nomeadamente no que se refere a composição nutricional (valor energético, proteína total, hidratos de carbono, açúcares, matéria gorda, ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados, fibra alimentar e sal), quantificação do teor em AR, composição volátil, teor em fenóis totais e determinação da atividade antioxidante, e ainda determinação do teor de inibidores da atividade da tripsina. A *Tabela 8* apresenta todas as análises realizadas e respetivas amostras.

Tabela 8 – Resumo das análises efetuadas e amostras em que foram realizadas.

	<i>BF</i>	<i>BT</i>	<i>MF</i>	<i>MT</i>	<i>FC</i>
<i>Composição nutricional</i>	x	x			
<i>AR</i>	x	x			
<i>Compostos voláteis</i>	x	x	x	x	
<i>Fenóis totais</i>	x	x	x	x	
<i>Atividade antioxidante</i>	x	x	x	x	
<i>Inibidores da tripsina</i>	x				x

BF – bolacha de feijão; BT – bolacha de trigo;
MF – massa da bolacha de feijão; MT – massa da bolacha de trigo;
FC – farinha de feijão crua.

a) *Composição nutricional*

Os resultados obtidos na análise nutricional dos dois tipos de bolacha que foram formuladas no âmbito deste trabalho (BF e BT) são apresentados na *Tabela 9*.

Tabela 9 – Composição nutricional das bolachas em estudo (BF e BT).

	<i>Bolacha de feijão</i>		<i>Bolacha de trigo</i>	
	<i>Por 100 g</i>	<i>Por dose (85g)</i>	<i>Por 100 g</i>	<i>Por dose (85g)</i>
Valor energético (kJ/kcal)	1751/417	1488/354	1881/448	1599/381
Proteínas (g)	10,10g	8,59g	7,96g	6,77g
Hidratos de carbono (g)	57,80g	49,13g	66,90g	56,87g
<i>dos quais</i>				
Açúcares (g)	34,00g	28,90g	33,80g	28,73g
Lípidos (g)	14,90g	12,67g	16,10g	13,69g
<i>dos quais</i>				
Ácidos gordos saturados (g)	8,90g	7,57g	9,60g	8,16g
Ácidos gordos monoinsaturados (g)	3,64g	3,09g	3,98g	3,38g
Ácidos gordos poliinsaturados (g)	1,12g	0,95g	1,12g	0,95g
Fibra alimentar (g)	5,70g	4,85g	1,60g	1,36g
Sal (g)	1,48g	1,26g	0,97g	0,82g

Para uma mais fácil perceção da percentagem representativa de cada constituinte são apresentadas as representações da *Figura 7*.

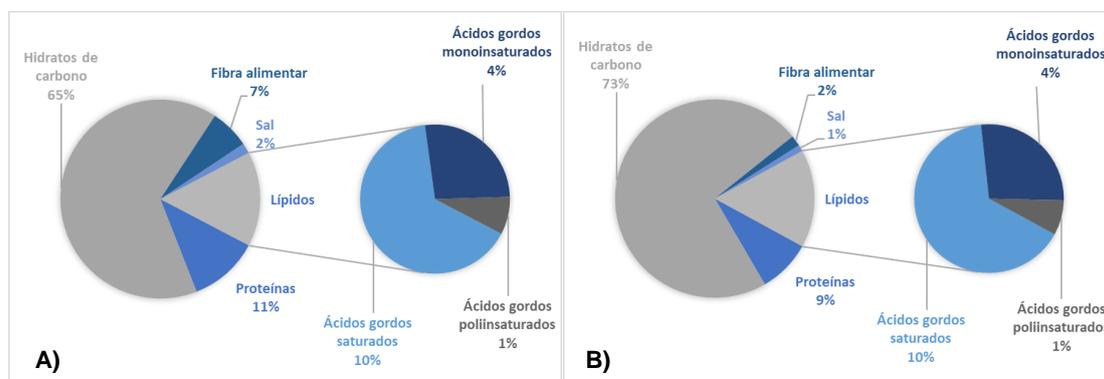


Figura 7 – Composição nutricional da BF (A) e da BT (B).

Os resultados mostram que a composição nutricional para as bolachas BF e a BT são semelhantes. Verifica-se que:

- (i) a BF tem um **valor energético** menor que a BT, 1751kJ/417kcal por 100g e 1881kJ/448kcal por 100g, respetivamente. Estes valores, em ambas as bolachas, vão de acordo com os valores encontrados no rótulo nutricional de qualquer bolacha, sendo que, por exemplo, a bolacha Maria da marca Continente tem um valor energético de 1871kJ/444kcal por 100g;

- (ii) a quantidade de **proteína** presente na BF é cerca de 10,1g/100g, ou seja 11% da sua composição, e é superior à BT cerca de 7,96g/100g, ou seja 9% da sua composição nutricional;
- (iii) quanto ao teor em **hidratos de carbono**, na BF, por cada 100g, existem cerca de 57,8g de hidratos de carbono, dos quais 34g são açúcares, ou seja, cerca de 65% do total da composição da BF, enquanto na BT por cada 100g existem cerca de 66,9g de hidratos de carbono, dos quais 33,8g são açúcares, correspondente a cerca de 73% do total da composição da BT;
- (iv) os **lípidos** representam cerca de 15% da composição nutricional total da BF, cerca de 14,9g por cada 100g. Já na BT o valor foi de 16,1g/100g, e tal como na BF, corresponde a 15% da composição da bolacha. Ainda, observa-se que na BF os ácidos gordos saturados são os compostos maioritários (8,9g/100g, o equivalente a 10% na BF), logo seguidos dos ácidos gordos monoinsaturados (3,64g/100g, o que equivale a 4% na BF) e por último os ácidos gordos polinsaturados (1,12g/100g, o que equivale a 1% na BF). A BT apresenta resultados semelhantes, assim os teores encontrados são 9,6g/100g de ácidos gordos saturados (10%), 3,98g/100g de ácidos gordos monoinsaturados (4%) e 1,12g/100g de ácidos gordos polinsaturados (1%). Esta proporção entre ácidos gordos deve-se provavelmente à utilização de manteiga na formulação das bolachas, uma vez que, é sabido que esta é uma gordura maioritariamente saturada (81);
- (v) quanto à **fibra alimentar**, na BF esta corresponde a 5,7g/100g, cerca de 7% da sua composição e na BT o valor desce, para cerca de quatro vezes menos, 1,6g/100g, ou seja, cerca de 2% da sua composição;
- (vi) também a quantidade de **sal** das duas bolachas varia ligeiramente. Na BF o valor de sal é de 1,48g/100g, cerca de 2% da sua composição, enquanto na BT é de 0,97g/100g, ou seja, cerca de 1% da sua composição total.

Os 16 voluntários foram questionados se achavam a BF saborosa, sendo que 7 deles responderam que concordavam fortemente, outros 8 voluntários responderam que concordavam e 1 manteve-se neutro em relação a esta questão. Quando questionados se a bolacha era agradável na sua boca, 3 responderam que concordavam fortemente, enquanto 13 responderam que concordavam. Já em relação à BT e se esta era saborosa, 2 voluntários responderam que concordavam fortemente, 11 responderam que concordavam e 3 mantiveram-se neutros em relação a esta questão. Na questão se acharam a bolacha agradável na sua boca, 1 voluntário respondeu que concordava fortemente, 14 responderam que concordavam e 1 manteve-se neutro em relação a essa questão. Na *Tabela 10* são apresentadas as respostas dadas pelos voluntários às questões colocadas.

Tabela 10 – Resumo das respostas dos voluntários às questões colocadas sobre as bolachas testadas (BF e BT).

		<i>Concordo fortemente</i>	<i>Concordo</i>	<i>Não concordo, nem discordo</i>
BF	A bolacha é saborosa?	7	8	1
	A bolacha é agradável na boca?	3	13	0
BT	A bolacha é saborosa?	2	11	3
	A bolacha agradável na boca?	1	14	1

Podemos inferir que ambas as bolachas tiveram uma boa aceitação a nível sensorial por parte dos voluntários e que a BF teve mais voluntários a responderem “concordo fortemente”, em ambas as questões colocadas, logo obteve uma aceitação ligeiramente superior à BT.

b) Determinação do teor em amido resistente

O teor em AR foi determinado nas amostras de BF e BT, utilizando a mesma metodologia referida para as amostras de farinha de feijão cru. Na *Tabela 11* são apresentados os resultados obtidos nesta determinação.

Tabela 11 – Resumo dos resultados da determinação do teor em AR nas bolachas (BF e BT) (n=2).

	<i>Feijão(BF)</i>	<i>Trigo(BT)</i>
<i>Bolacha</i>	11,24 ± 0,36	0,43 ± 0,03

Todos os valores representam a média ± desvio padrão.

Os resultados mostram que a BF tem cerca de vinte vezes mais AR do que a BT. Estes valores vão de encontro com o esperado, ou seja, foi conseguido com sucesso a formulação de uma bolacha com elevado teor em AR. Este tipo de desenvolvimento, não é inédito já que Aparicio-Saguilán, *et al* desenvolveram uma bolacha à base de amido proveniente da banana e obtiveram valores de AR de 8,42 ± 0,30% (82). A formulação desenvolvida neste trabalho não foi apenas bem-sucedida, como obteve melhores resultados quanto ao teor em AR que a bolacha criada por Aparicio-Saguilán, *et al*.

c) *Identificação de compostos voláteis por microextração em fase sólida e cromatografia em fase gasosa associada a espectrometria de massa (SPME-GC/MS)*

A técnica de SPME-GC/MS foi usada na análise das amostras de BF (bolacha de feijão), BT (bolacha de trigo), MF (massa da bolacha de feijão) e MT (massa da bolacha de trigo), seguindo a mesma metodologia que as 91 variedades de farinha de feijão cru analisadas. No entanto, na preparação da amostra foram utilizados 500 mg de amostra e adicionados 2 mL de água Milli-Q aos *vials* de 10 mL. Os perfis cromatográficos das amostras referidas são apresentados na *Figura 8, Figura 9, Figura 10 e Figura 11*, estando organizadas de forma a que seja possível compará-las.

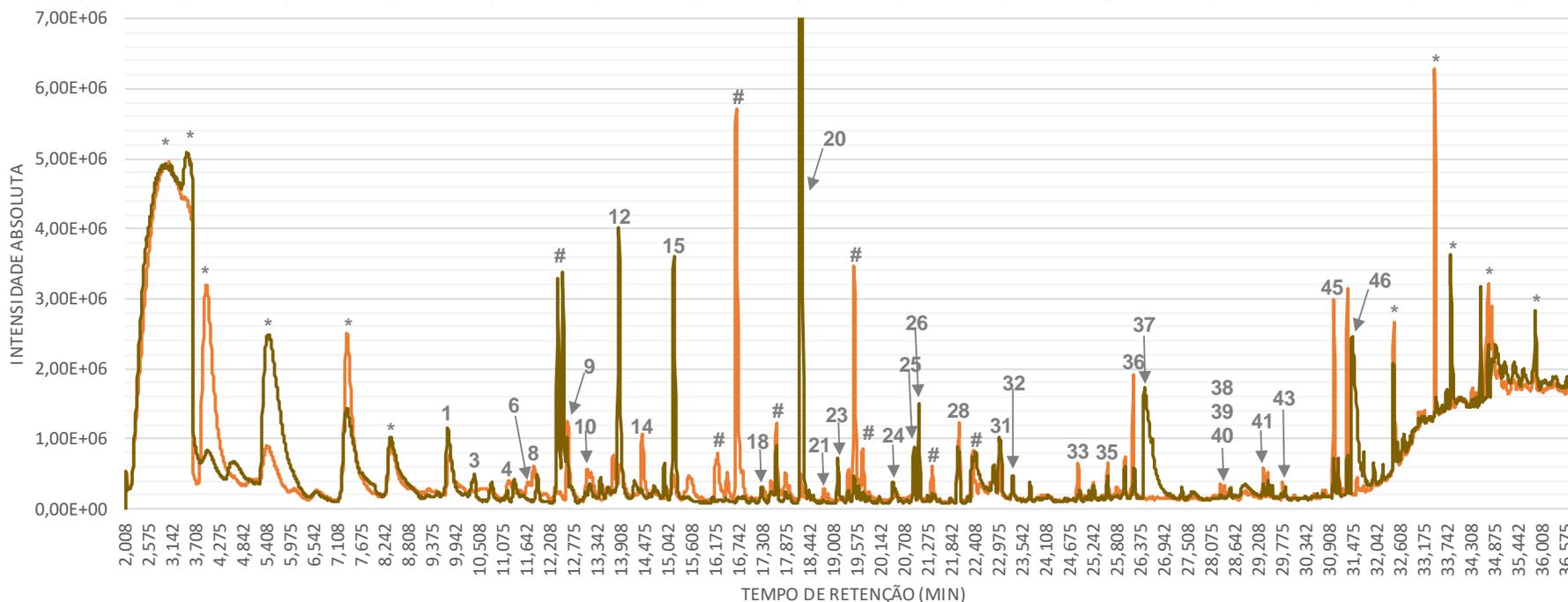


Figura 8 – Comparação dos perfis cromatográficos obtidos após análise das amostras BF (a laranja) e BT (a verde) por SPME-GC-MS.

Legenda: * – Siloxanos; # – Não Identificado (NI); 1 – tolueno; 3 – 2-metilpropanol; 4 – 2-pentanol; 6 – o-xileno; 8 – 1-butanol; 9 – 1-penten-3-ol; 10 – 2-heptanona; 12 – (E)-2-hexenal; 14 – 2-pentilfurano; 15 – 1-pentanol; 18 – 2-heptanol; 20 – 1-hexanol; 21 – 1-hidroxi-2-butanona; 23 – 2-nonanona; 24 – 3-furaldeído; 25 – 1-octen-3-ol; 26 – 1-heptanol; 28 – 2-etil-1-hexanol; 31 – benzaldeído; 32 – (E)-2-nonenal; 33 – 2-undecanona; 35 – butirrolactona; 36 – 1-nonanol; 37 – ácido butanoico; 38 – naftaleno; 39 – acetamida; 40 – 2-undecenal; 41 – tetrahidro-6-metil-2H-piran-2-ona; 43 – 2-tridecanona; 45 – álcool benzílico; 46 – dimetilsulfona

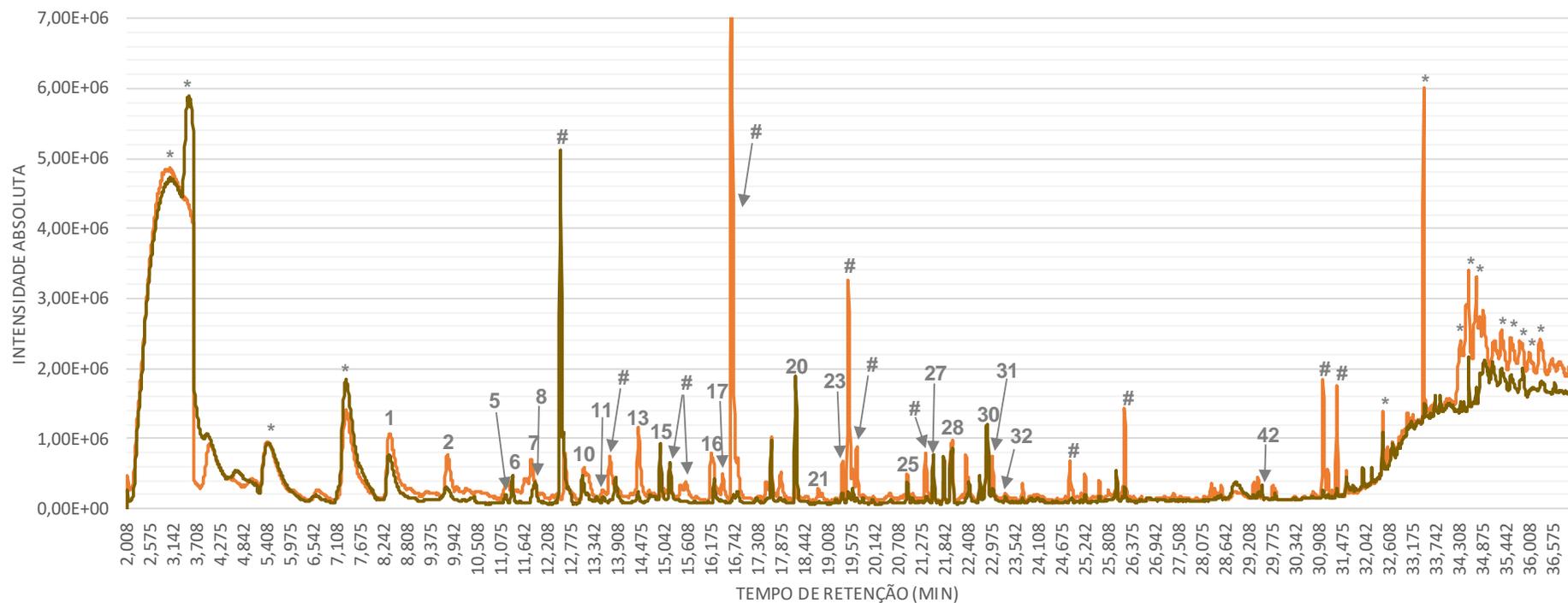


Figura 9 – Comparação dos perfis cromatográficos obtidos após análise das amostras MF (a laranja) e MT (a verde) por SPME-GC/MS.

Legenda: * – Siloxanos; # – Não Identificado (NI); 1 – tolueno; 2 – hexanal; 5 – 1-metoxi-2-propanol; 6 – o-xileno; 7 – 2-propilfurano; 8 – 1-butanol; 10 – 2-heptanona; 11 – L-limoneno; 13 – 2-etoxibutano; 15 – 1-pentanol; 16 – 1,2,3-trimetilbenzeno; 17 – 3-hidroxi-2-butanona; 20 – 1-hexanol; 21 – 1-hidroxi-2-butanona; 23 – 2-nonanona; 25 – 1-octen-3-ol; 27 – éter metílico de dipropilenoglicol; 28 – 2-etil-1-hexanol; 30 – 1-(2-metoxipropoxi)-2-propanol; 31 – benzaldeído; 32 – (E)-2-nonenal; 42 – 3,7,11,15-tetrametil-1-hexadecanol.

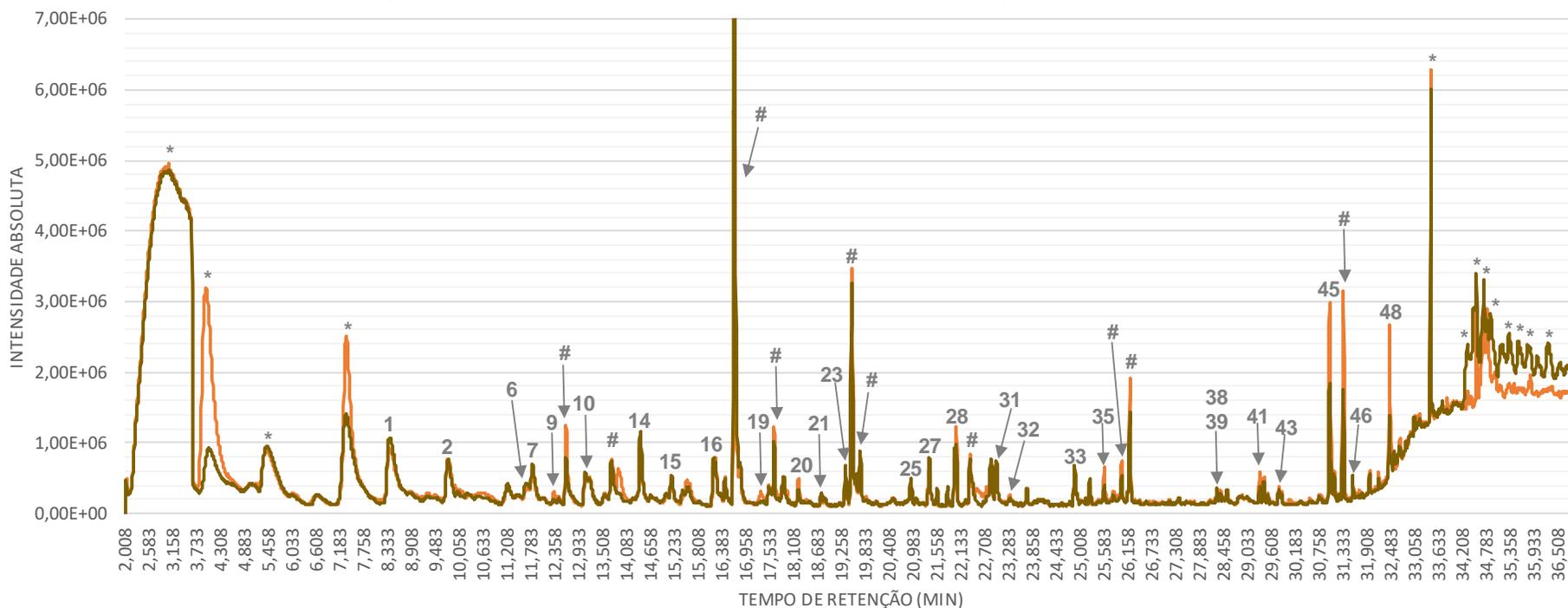


Figura 10 – Comparação dos perfis cromatográficos obtidos após análise das amostras BF (a laranja) e MF (a verde) por SPME-GC/MS.

Legenda: * – Siloxanos; # – Não Identificado (NI); **1** – tolueno; **2** – hexanal; **6** – *o*-xileno; **7** – 2-propilfurano; **9** – 1-penten-3-ol; **10** – 2-heptanona; **14** – 2-pentilfurano; **15** – 1-pentanol; **16** – 1,2,3-trimetilbenzeno; **19** – 2,5-dimetilpirazina; **20** – 1-hexanol; **21** – 1-hidroxi-2-butanona; **23** – 2-nonanona; **25** – 1-octen-3-ol; **27** – éter metílico de dipropilenoglicol; **28** – 2-etil-1-hexanol; **31** – benzaldeído; **32** – (E)-2-nonenal; **33** – 2-undecanona; **35** – butirrolactona; **38** – naftaleno; **39** – acetamida; **41** – tetrahidro-6-metil-2H-piran-2-ona; **43** – 2-tridecanona; **45** – álcool benzílico; **46** – dimetilsulfona; **48** – Tetrahidro-6-propil-2H-piran-2-ona.

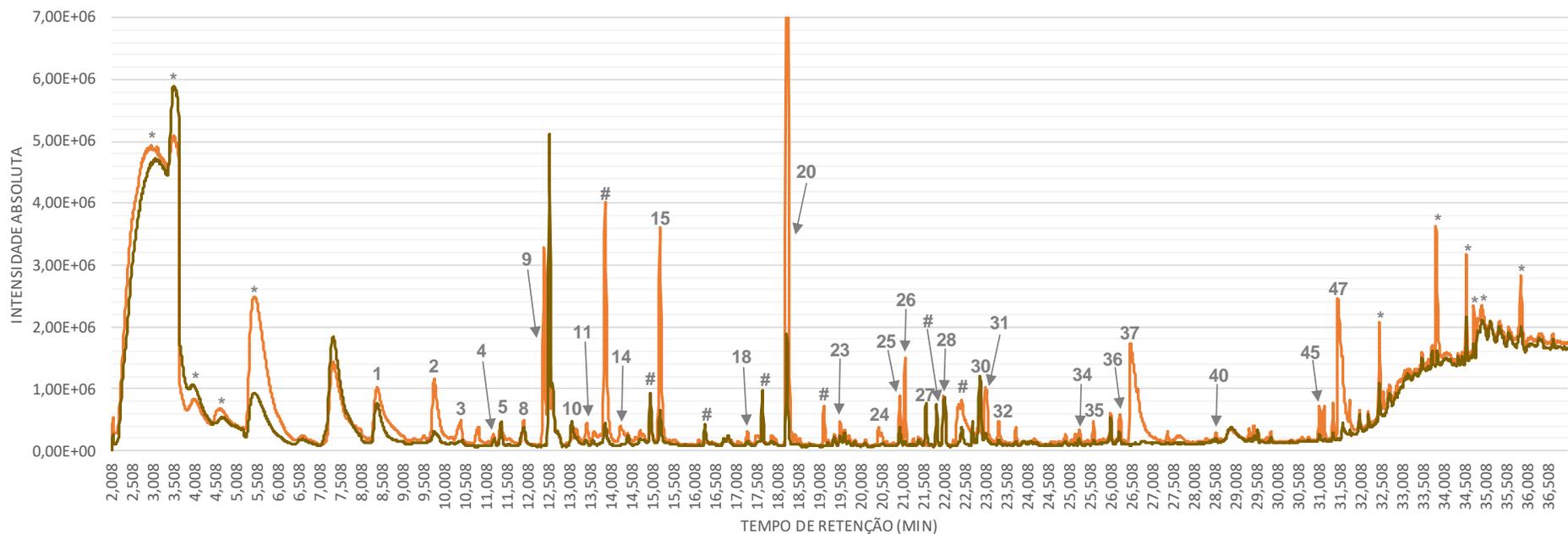


Figura 11 – Comparação dos perfis cromatográficos obtidos após análise das amostras BT (a laranja) e MT (a verde) por SPME-GC/MS.

Legenda: * – Siloxanos; # – Não Identificado (NI); 1 – tolueno; 2 – hexanal; 3 – 2-metilpropanol; 4 – 2-pentanol; 5 – 1-metoxi-2-propanol; 8 – 1-butanol; 9 – 1-penten-3-ol; 10 – 2-heptanona; 11 – L-limoneno; 14 – 2-pentilfuranol; 15 – 1-pentanol; 18 – 2-heptanol; 20 – 1-hexanol; 23 – 2-nonanona; 24 – 3-furaldeído; 25 – 1-octen-3-ol; 26 – 1-heptanol; 27 – éter metílico de dipropilenoglicol; 28 – 2-etil-1-hexanol; 30 – 1-(2-metoxipropoxi)-2-propanol; 31 – benzaldeído; 32 – (E)-2-nonenal; 34 – dihidro-5-metil-2(3H)-furanona; 35 – butirolactona; 36 – 1-nonanol; 37 – ácido butanoico; 40 – 2-undecenal; 45 – álcool benzílico; 47 – álcool feniletílico.

O Anexo 7 apresenta a compilação de todos os resultados referentes aos compostos voláteis identificados nas amostras de bolacha (BF, BT) e respectivas massas (MF e MT). Para além da identificação dos compostos, incluiu-se informação acerca da família química a que pertencem, os índices de semelhança obtidos através da comparação do espectro de massa com a biblioteca de espectros do software, índices de retenção linear e os correspondentes valores na literatura, bem como os descritores aromáticos do composto.

Os resultados mostram que existem algumas diferenças quanto aos compostos identificados para cada amostra. Assim:

(i) compostos como o **tolueno** e o **hexanal**, ambos com um descritor aromático verde, folhagem, floral, estão presentes em todas as amostras numa percentagem que varia entre os 17,39 e os 8,45% para o tolueno, e entre os 6,91 e os 1,78% para o hexanal. O **1-pentanol** e o **1-hexanol**, ambos associados a descritores de combustível, etéreo, oleoso, álcool, também estão presentes em todas as amostras analisadas, entre os 6,80 e os 1,82% no caso do 1-pentanol, e entre os 35,42 e os 0,77% no caso do 1-hexanol. A **2-nonanona**, o **1-octen-3-ol**, o **1-heptanol** e o **2-etil-1-hexanol**, que possuem um descritor aromático associado a verde, ceroso, oleoso, têm percentagens entre 3,62-0,32%, entre 1,59-1,05%, entre 1,84-0,26% e entre 4,58-0,33%, respetivamente, sendo que, estão igualmente presentes em todas as amostras analisadas. O **(E)-2-nonenal** também está presente em todas as amostras, numa percentagem entre 0,66-0,22%, e possui um descritor aromático a gorduroso, verde, oleoso. O facto de estes compostos estarem associados a aromas característicos não significa que eles estejam a contribuir para o aroma global do produto, dado que essa contribuição vai depender do seu limiar de perceção olfativo e da concentração em que se encontra presente na amostra.

(ii) nas amostras onde se utilizou a farinha de feijão, amostras BF e MF, foram identificados o **o-xileno**, que possui um aroma floral, o **2-propilfurano** e o **1-hidroxi-2-butanona**, que possui um aroma doce, café, mofo. O o-xileno está presente nas amostras numa percentagem de 0,71% na BF e 1,08% na MF, o 2-propilfurano estava numa percentagem de 2,43% na BF e 2,62% na MF e o 1-hidroxi-2-butanona estava numa percentagem de 0,35% na BF e 0,20% na MF.

(iii) nas amostras onde se utilizou a farinha de trigo, amostras BT e MT, foram identificados em comum os seguintes compostos voláteis: **2-metilpropanol**, **2-pentanol**, **2-heptanol** e **2-undecenal**. No caso do 2-metilpropanol, este possui um descritor aromático associado a etéreo, vínico e foi encontrado numa percentagem de 1,05% na BT e 0,54% na MT. Já o 2-pentanol, que possui um aroma verde, combustível, oleoso, fermentado, estava presente numa percentagem de 0,31% na BT e 0,69% na MT. O 2-heptanol possui um descritor aromático associado a mofo, folhagem, violeta, herbal, verde, doce, madeira, floral (peônia) e encontra-se numa percentagem de 0,45% na BT e 0,34% na MT. Por último, o 2-undecenal,

que possui um aroma fresco, frutado, casca de laranja, estava presente nestas amostras numa percentagem de 0,15% na BT e 0,20% na MT.

(iv) nas amostras não processadas, ou seja, na MF e MT, foram identificados o **L-limoneno** e o **éter metílico de dipropilenoglicol** como sendo compostos específicos destas amostras. O L-limoneno que é um terpeno tem como descritores aromáticos, pinho, herbal, apimentado, e estava presente numa percentagem de 0,70% na MF e 0,50% na MT. Por sua vez, o éter metílico de dipropilenoglicol encontrava-se presente numa percentagem de 0,81% na MF e 2,80% na MT.

(v) nas amostras BF e BT, ou seja, nas amostras processadas, o **1-penten-3-ol**, o **2-pentilfurano**, o **naftaleno** e o **álcool benzílico** foram compostos comumente identificados. O 1-penten-3-ol estava numa percentagem de 1,12% no caso da BF e de 5,45% no caso da BT, sendo que este composto volátil tem como descritor aromático ser picante, verde, frutado. Por sua vez, o 2-pentilfurano, que possui um aroma frutado, verde, terroso, feijão, vegetal, metálico, estava presente numa percentagem de 0,32% na BF e 0,08% na BT. O naftaleno possui um descritor aromático associado a picante, seco e resinoso e está presente numa percentagem de 0,86% na BF e 0,06% na BT. Já o álcool benzílico possui um descritor aromático associado a floral, rosa, fenólico, balsâmico, frutado, químico, e na amostra BF está presente numa percentagem de 1,13% e na BT numa percentagem de 0,57%.

Assim podemos inferir que compostos voláteis como o **tolueno**, o **1-pentanol**, **2-nonanona**, **1-octen-3-ol**, **1-heptanol**, **o-xileno**, **1-penten-3-ol**, **2-pentilfurano**, **álcool benzílico**, **2-heptanona**, **(E)-2-hexenal** e **3-hidroxi-2-butanona** surgem nas amostras analisadas na sequência deste ensaio, como também são característicos e encontrados na farinha de feijão cru. Dos compostos encontrados em comum é relevante mencionar que nas amostras processadas, BF e BT, surgem o **1-penten-3-ol**, **2-pentilfurano** e o **álcool benzílico**, sugerindo assim que estes compostos voláteis característicos da farinha de feijão cru permaneceram nas bolachas mesmo após o processo de preparação a 180°C. Ao encontrar compostos voláteis comuns a todas as amostras analisadas, tal como, o **tolueno**, **hexanal**, **1-pentanol**, **1-hexanol**, **2-nonanona**, **1-octen-3-ol**, **1-heptanol**, **2-etil-1-hexanol** e **(E)-2-nonenal**, pode-se inferir que estes também permanecem nas bolachas após o processo de preparação.

Dos resultados obtidos foram identificados compostos voláteis específicos do tipo de bolacha:

- (i) na BF, compostos como a **2,5-dimetilpirazina**, cujo descritor aromático está associado a cacau, assado, noz, bife, madeira, erva, medical, o **(Z)-3-hexen-1-ol**, que está associada a fresco, verde, erva, folhagem, vegetal, herbal, oleoso, a **2-undecanona**, associada a ceroso, frutado, cremoso, gorduroso, floral (lírio), a **2-tridecanona**, associada a gorduroso, ceroso, lacticínios, coco, noz, herbal, terroso, a **dimetilsulfona**, a sulfuroso e queimado, e a **tetrahidro-**

6-propil-2H-piran-2-ona, que é associada a doce, gorduroso, coco, tropical, laticínios.

- (ii) na BT, compostos como o **(E)-2-hexenal**, que possui um descritor aromático associado a verde, banana, aldeído, gorduroso, queijo, o **3-furaldeído**, o **2,4 heptadienal**, associado a verde, picante, frutado, especiarias, a **dihidro-5-metil-2(3H)-furanona**, o **1-Nonanol**, que está associado a fresco, limpo, gorduroso, floral, rosa, laranja, poeirento, molhado, oleoso e o **ácido butanoico**, que se encontra associado a forte, acético, queijo, amanteigado, frutado.

Como estes compostos voláteis são apenas encontrados na BF ou na BT, pode-se concluir que estes são compostos que podem estar a contribuir para o seu conteúdo aromático e para a distinção entre as amostras analisadas.

d) *Análise do teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu*

O método de *Folin-Ciocalteu* foi usado para determinar o teor em fenóis totais nas amostras de BF, BT, MF e MT (*Tabela 12*).

Tabela 12 – Resumo dos resultados da determinação do teor em fenóis totais nas amostras de BF, BT, MF e MT (n=4).

	<i>Feijão</i>	<i>Trigo</i>
<i>Bolacha</i>	83,27 ± 1,62	19,44 ± 0,24
<i>Massa</i>	88,50 ± 1,28	18,53 ± 4,99

Todos os valores representam a média ± desvio padrão.

Os resultados mostram que as amostras que contêm farinha de feijão são mais ricas em fenóis totais, cerca de quatro vezes mais, do que as que apenas têm farinha de trigo. Verifica-se ainda que a MF possui um teor fenólico de 88,50 mg eq AG/100g, enquanto que a BF possui um valor mais baixo, 83,27 mg eq AG/100g (*Tabela 12*). Resultados semelhantes foram obtidos no trabalho desenvolvido em 2015 por Jan, *et al*, em que foi possível verificar que havia uma diferença no teor de fenóis totais entre as diferentes formulações de farinhas testadas e as bolachas processadas a partir dessa farinha (83).

Assim, os resultados obtidos mostram que o processamento da bolacha afetou o teor de fenóis totais fazendo com que este diminuísse, à exceção da MT que teve um valor médio de fenóis totais mais elevado que a BT.

e) *Análise da atividade antioxidante pelo método de ORAC*

Também foi determinada a atividade antioxidante das bolachas (BF e BT), e das massas correspondentes (MF e MT), pelo método de ORAC (*Tabela 13*).

Tabela 13 – Resumo dos resultados da análise da atividade antioxidante na BF, BT, MF e MT (n=4).

	<i>Feijão</i>	<i>Trigo</i>
<i>Bolacha</i>	3073,45 ± 575,06	1158,39 ± 91,16
<i>Massa</i>	3471,42 ± 510,33	1318,77 ± 145,00

Todos os valores representam a média ± desvio padrão.

Foi observado que as amostras que contêm farinha de feijão são aquelas que apresentam maior atividade oxidante em relação às que apenas têm farinha de trigo na sua composição. A atividade antioxidante determinada na amostra MF foi de 3471,42 mM CAET/100g, enquanto que na BF esse valor baixa para 3073,45 mM CAET/100g. Esta diminuição também é verificada entre MT (1318,77 mM CAET/100g) e BT (1154,39 mM CAET/100g). Em 2009, Anton, *et* desenvolveu um trabalho onde compara a atividade antioxidante do feijão cru e do feijão cozido, concluindo que esta diminuía com o processamento. Tal como nesse trabalho, podemos inferir que após o processamento das amostras testadas ocorreu uma diminuição da atividade antioxidante do produto com ou sem feijão (84).

f) *Determinação do teor de inibidores da atividade da tripsina*

A determinação do teor de inibidores da atividade da tripsina (TIA) foi realizada com o objetivo de despistar potenciais indisposições que possam ter sido causadas pela ingestão das amostras em teste. Neste parâmetro foi apenas analisada a BF em comparação com a farinha de feijão cru (FC), utilizada na formulação da bolacha. Os resultados obtidos são apresentados na *Tabela 14*.

Tabela 14 – Resumo dos resultados da determinação do teor de inibidores da tripsina na FC e na BF (n=2).

	<i>Feijão</i>
<i>Farinha</i>	0,25 ± 0,01
<i>Bolacha</i>	0,02 ± 0,0004

Todos os valores representam a média ± desvio padrão.

Os resultados mostram que os valores determinados são bastante baixos, tanto na FC, 0,25 ± 0,01 mg/g, como na BF, 0,02 ± 0,0004 mg/g, e que o valor de TIA para a FC está de acordo com a literatura (85). Assim pode inferir-se que com o processo de preparação das bolachas ocorreu uma diminuição do teor de TIA, sendo que, o valor de BF é cerca de dez vezes inferior ao de FC. Estes resultados estão de acordo com os resultados de Anton, *et al* que verificaram que ao formular tortilhas a partir de farinha de feijão o teor de TIA diminui cerca de duas vezes em relação ao da farinha de feijão (86).

Para a bolacha testada, os teores de TIA determinados estão bastante abaixo do que seria necessário para causar efeitos de indisposição após o seu consumo. Normalmente, valores de 4 mg/g ou superiores vão causar aproximadamente 95% de inibição da tripsina (87). No entanto, é possível que pessoas que não estejam habituadas a consumir leguminosas possam sentir algum desconforto intestinal.

4.2.2 Estudo do efeito da ingestão de bolachas com farinha de feijão na resposta glicêmica

a) Caracterização da população do estudo

A população que participou no estudo é constituída por pessoas de ambos os sexos, sendo na sua maioria voluntários do sexo feminino (68,8%), e com idades compreendidas entre os 21 e os 36 anos. A *Tabela 15* apresenta informações dos voluntários e ainda detalhes do seu historial clínico. Nesta tabela, também é possível verificar com que frequência os voluntários praticam exercício físico e qual é habitualmente o seu consumo de leguminosas. Todos os indivíduos que participaram no estudo possuem um IMC normal ($18,5\text{kg/m}^2 \leq \text{IMC} \leq 24,9\text{kg/m}^2$).

Tabela 15 – Caracterização dos voluntários (n=16) que participaram no ensaio *in vivo*.

	Voluntários
Sexo (F/M)	11/5
Idade	27,4 ± 4,2
Peso	64,4 ± 1,7
Altura	1,67 ± 0,1
Prática de exercício físico	2 ± 1 vezes por semana
Peso estável nos últimos 3 meses	✓
Não ter diagnóstico médico de diabetes ou outras doenças endócrinas	✓
Não ter história clínica de doença gastrointestinal ou distúrbios endócrinos	✓
Não estar a tomar medicamentos que interfiram com o metabolismo glicídico ou lipídico	✓
Não ter estado internado nos últimos 3 meses	✓
Não estar grávida ou a amamentar	✓
Não ser fumador	✓
Efetuar regularmente a refeição do pequeno-almoço	✓
Consumo de leguminosas	1 ± 1 vezes por semana

✓ – todos os voluntários cumprem a condição.

b) Resposta glicémica

A avaliação da glicémia capilar foi efetuada em jejum (0 min) e aos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min após a ingestão das duas bolachas em estudo (BT, BF). Para o conjunto dos indivíduos do estudo, a *Tabela 16* representa os valores médios da glicémia e o *Figura 12* representa a variação da glicose capilar ao longo do tempo, até aos 120 min.

Tabela 16 – Valores médios da glicémia (mmol/l) em jejum (0min) e após ingestão das amostras (BF e BT).

Tempo (min)	BF	BT
0	4,82 ± 0,35	4,60 ± 0,32
15	6,24 ± 0,40	6,26 ± 0,67
30	5,67 ± 0,52	6,47 ± 0,71
45	5,49 ± 0,58	6,06 ± 0,89
60	5,07 ± 0,41	5,75 ± 0,69
90	4,73 ± 0,35	5,38 ± 0,77
120	4,92 ± 0,36	5,29 ± 0,44

BF – bolacha de feijão; BT – bolacha de trigo;
 Todos os valores representam a média ± desvio padrão; n =16.

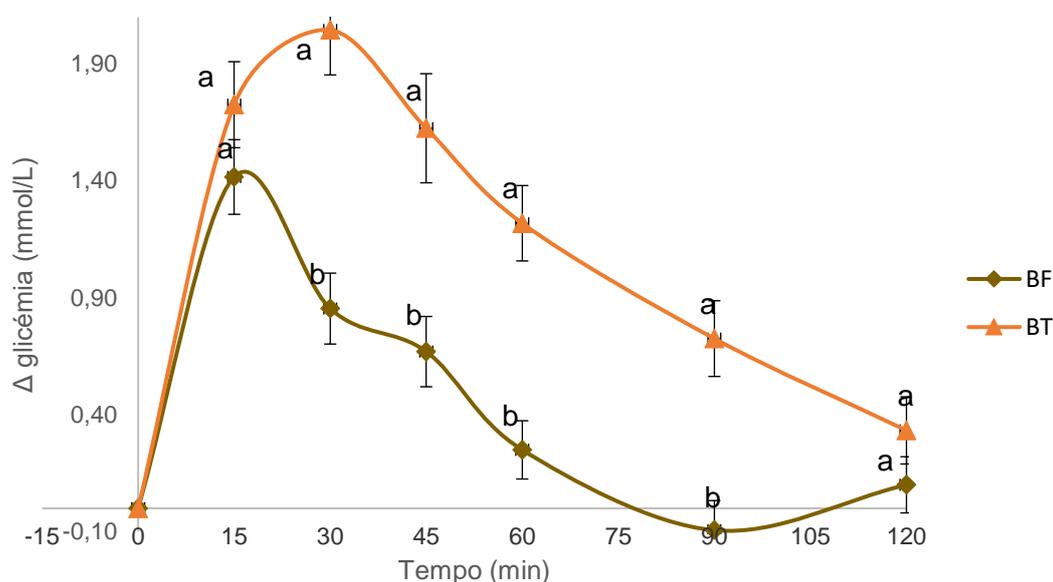


Figura 12 – Variação do valor de glicémia após a ingestão da bolacha de feijão (BF) e da bolacha de trigo (BT) para o conjunto de voluntários do estudo; média ± desvio padrão da média, n=16; para cada tempo, letras diferentes significam que as amostras são significativamente diferentes.

Para o total dos participantes (n=16) observou-se que o valor máximo alcançado é superior no caso da BT (2,05) e ocorreu aos 30 min, a partir deste momento diminuiu de forma rápida e acentuada. No caso da BF, o valor máximo foi atingido aos 15 min (1,73) e depois tem um comportamento semelhante ao de BT, no entanto com uma intensidade muito menor. Aos 90 min o valor verificado (-0,90) é inferior ao inicial, sendo este valor geralmente explicado pelo facto de alimentos ricos em açúcar serem mais suscetíveis a que a curva de glicémia decresça mais rapidamente (60 e 75 min), uma vez que, na sua constituição os açúcares simples, como a sacarose, lactose e frutose, contribuem com menos unidades de glucose do que a mesma

quantidade de amido (88). No entanto, não é o que acontece nas amostras testadas, visto terem, aproximadamente, a mesma quantidade de açúcares, podendo a resposta para estes valores estar na quantidade total de hidratos de carbono que é menor na BF do que na BT. Na literatura não foram encontrados estudos sobre o facto do feijão poder ser um alimento exceção quanto à resposta glicémica, como é o caso da batata no trabalho desenvolvido por Brand-Miller, *et al* (88).

A comparação das médias entre as duas amostras em cada um dos tempos de avaliação da glicémia capilar foi feita utilizando o teste não paramétricos de *Mann-Whitney*. Foi possível observar diferenças estatisticamente significativas nos momentos 30 min ($P < 0,001$), 45 min ($P = 0,004$), 60 min ($P < 0,001$) e 90 min ($P = 0,001$), sendo que nos restantes tempos as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas (*Figura 12*).

Foi calculada a AUC para cada indivíduo. Os valores médios obtidos após a ingestão das amostras testadas (BF e BT) estão representados na *Tabela 17*.

Tabela 17 – Valores médios da AUC da glicémia (mmol*min/l) após ingestão da bolacha de feijão e da bolacha de trigo para o conjunto dos indivíduos do estudo, n=16.

	BF	BT
AUC (mmol*min/l)	47,21 ± 9,02	112,60 ± 11,58

BF – bolacha de feijão; BT – bolacha de trigo (controlo);
 Todos os valores representam a média ± desvio padrão, n=16.

Para cada uma das amostras, as diferenças observadas pelo teste *One-way ANOVA* confirmam que o valor médio da AUC determinado para a BF (47,21 ± 9,02 mmol*min/l) é significativamente inferior ao valor médio da AUC determinado para a BT (112,60 ± 11,58 mmol*min/l); $p < 0,05$ (*One-Way ANOVA test* - $F(1;30) = 26,54$; $p < 0,001$; $p < 0,05$).

Em suma, após a ingestão da BF e até aos 120 min, observa-se uma resposta glicémica menor e as diferenças observadas são estatisticamente significativas, comparativamente aos resultados obtidos após a ingestão da BT pelos mesmos indivíduos.

c) *Perceção da saciedade*

A capacidade de determinado alimento ou refeição induzir saciedade tem uma importância determinante na quantidade que se ingere e no intervalo de tempo até à refeição seguinte. Este efeito, de maior saciedade, é característico dos alimentos ricos em fibra alimentar, sendo o AR um componente deste grupo.

No entanto, a avaliação da percepção de saciedade é um processo que se reveste de uma grande subjetividade. O fator “indivíduo” na sua complexidade e variedade é fundamental quando se pretende quantificar sensações físicas, psicológicas e ambientais, que influenciam o indivíduo e conseqüentemente a sua percepção dessas mesmas sensações (59). Flint, *et al* publicaram escalas visuais analógicas (VAS) validadas para avaliação da sensação de apetite que foram adotadas neste trabalho (89).

Os dados obtidos da aplicação da VAS em jejum (0) e aos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min, após a ingestão da BF e da BT pelo grupo de voluntários, foram expressos em milímetros (mm), numa escala que vai de zero (0) a cem (100). A *Figura 13* representa os valores médios que exprimem a percepção da saciedade, para cada um dos parâmetros de avaliação, no conjunto de indivíduos que participaram no estudo.

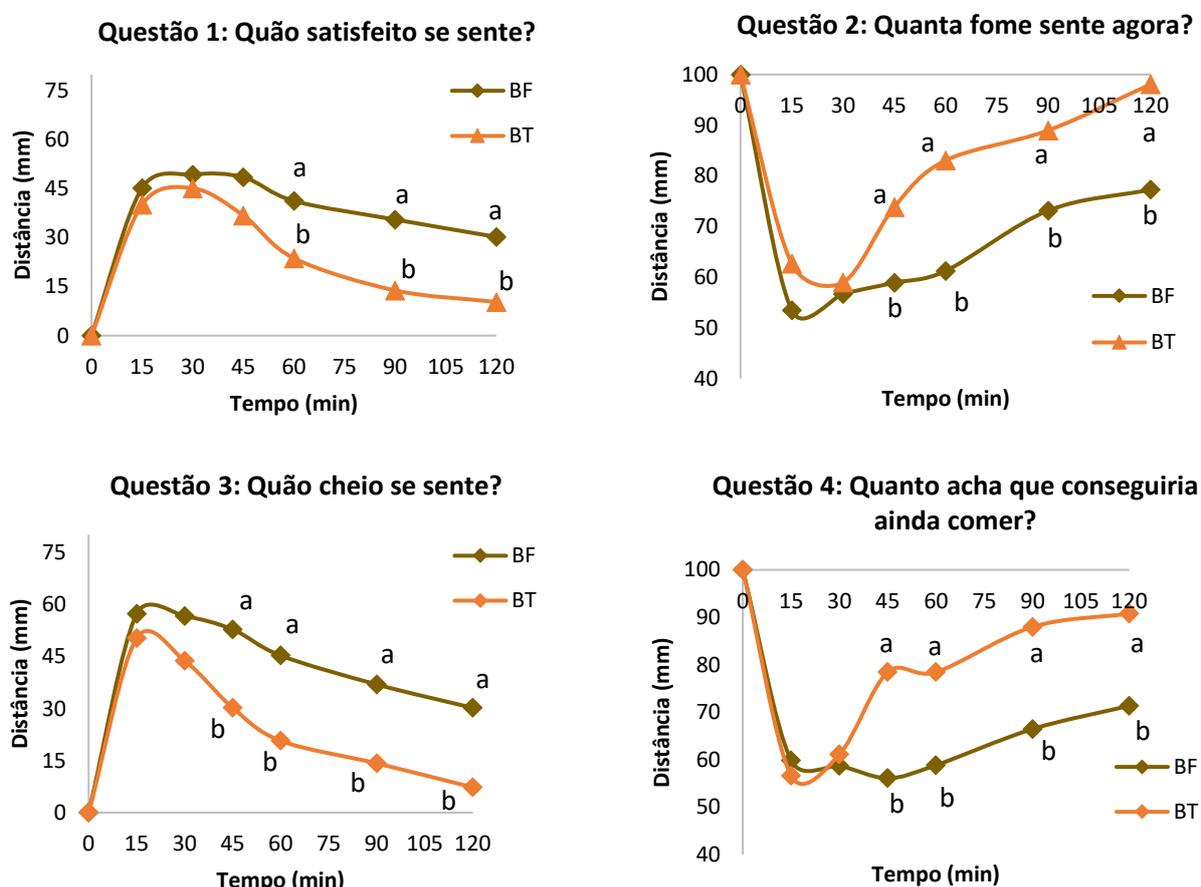


Figura 13 – Percepção da saciedade relativamente aos 4 parâmetros avaliados para as duas amostras (BF e BT), n=16; para cada tempo, letras diferentes significam que as amostras são significativamente diferentes.

De um modo geral, a BF indicou uma maior saciedade relativamente à BT, com valores de médias em cada tempo sempre superiores, exceto raras exceções. Das quatro questões apresentadas no questionário, as questões “Quão satisfeito se sente?” e “Quão cheio se

sente?” apresentaram um comportamento semelhante, ou seja, em jejum (0 min) apresentam valores baixos (preenchimento próximo do extremo esquerdo) e 15 min após a ingestão foram observados valores mais elevados que foram diminuindo até aos 120 min. Relativamente às outras duas questões, “Quanta fome sente agora?” e “Quanto acha que conseguiria ainda comer?”, observou-se o comportamento oposto, valores elevados em jejum (0 min) seguindo-se valores mais baixos aos 15 min que foram aumentando até aos 120 min.

A comparação das médias entre as duas amostras em cada um dos tempos de avaliação permite afirmar que em todas as questões realizadas foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Na questão “Quão satisfeito se sente?” foram observadas diferenças significativas nos momentos 60, 90 e 120 ($P < 0,05$), enquanto nas restantes questões, “Quão cheio se sente agora?”, “Quanto acha que conseguiria ainda comer?” e “Quanta fome sente agora?”, essas diferenças significativas foram observadas nos momentos 45, 60, 90 e 120 ($P < 0,05$).

Os resultados foram convertidos em AUC para cada uma das questões da VAS e para cada um dos voluntários. A média dos valores obtidos é apresentada na *Tabela 18*.

Tabela 18 – Valores médios da AUC ($\text{mm} \cdot \text{min}$) dos parâmetros de avaliação da percepção de saciedade após ingestão das amostras (BF e BT).

Parâmetros	BF	BT
Quão satisfeito se sente?	5576,67 ± 321,30 ^a	5212,60 ± 313,25 ^a
Quanta fome sente agora?	3076,73 ± 352,35 ^a	3902,72 ± 348,47 ^b
Quão cheio se sente?	5454,14 ± 346,61 ^a	4809,27 ± 345,18 ^b
Quanto acha que conseguiria ainda comer?	3754,69 ± 391,37 ^a	4308,84 ± 334,70 ^a

BF – bolacha de feijão; BT – bolacha de trigo (controlo);

Todos os valores representam a média ± desvio padrão, $n=16$;

Em cada linha, letras diferentes significam valores significativamente diferentes.

A comparação entre as médias da AUC da BF e da BT para cada um dos parâmetros foi avaliada pelo teste não paramétrico de *Wilcoxon* para amostras emparelhadas. Foram observadas diferenças significativas para os parâmetros “Quanta fome sente agora?” ($P=0,015$) e “Quão cheio se sente?” ($P=0,034$). Para os parâmetros “Quão satisfeito se sente?” e “Quanto acha que conseguiria ainda comer?” foram observados valores de *p-value* de respetivamente 0,056 e 0,148, ou seja, nesses parâmetros as diferenças não são significativas. No entanto, é de realçar que todos os parâmetros revelam um aumento da saciedade associada à BF.

Existem várias menções na literatura que explicam o aumento da saciedade associado a alimentos com incremento do teor de fibra pelo atraso do esvaziamento gástrico e da absorção dos macronutrientes. O aumento das hormonas gastrointestinais colecistoquinina, GLP-1 e peptídeo tirosina-tirosina, que atuam como indutores da saciedade, também poderá explicar este efeito após a ingestão de alimentos ricos em fibra (85–87). Sendo o teor em AR o único composto que difere em maior proporção nas duas bolachas analisadas poderemos afirmar que o efeito indutor da saciedade observado se deve muito provavelmente a este componente, o que poderá ser importante numa situação de perda de peso, manutenção de peso ou mesmo na diabetes.

d) Determinação do índice glicémico da bolacha de feijão e da bolacha de trigo

O ensaio para a determinação do IG das amostras em estudo (BF e BT) foi realizado nos mesmos moldes que os restantes, com os 16 voluntários a consumirem o alimento de referência (50 g de glicose anidra dissolvida em 250 mL de água). Para o cálculo do IG das duas bolachas testadas foi aplicada a *Equação 2* referida no Desenho experimental (ver em Métodos).

Assim, a BF apresentou um IG de 31 enquanto a BT apresentou um valor de 75. Os alimentos são classificados como tendo um IG baixo (≤ 55), médio (56-69) ou elevado (≥ 70), e, de acordo com esta classificação, a BF apresenta-se como um alimento de baixo IG e a BT como um alimento de IG elevado (76,90).

Podemos inferir que o IG inferior da BF se traduz na resposta glicémica menor que essa amostra desencadeou. Uma vez que as duas amostras em estudo têm como diferença principal o teor em AR podemos afirmar que este contribuiu, muito provavelmente, para a diminuição do IG das bolachas.

4.3 Identificação de compostos voláteis em farinha de feijão cru por microextração em fase sólida e cromatografia em fase gasosa associada a espectrometria de massa (SPME-GC/MS)

Utilizando a técnica de SPME-GC/MS foram analisadas 91 variedades, referentes ao segundo ano do projeto, ou seja, às variedades do bloco 3 e do bloco 4, cultivadas em Córdoba, Espanha.

Na *Figura 14* é apresentado um cromatograma tipo correspondente à análise de uma variedade de feijão cru, identificada como 654, utilizando as condições anteriormente descritas (ver Métodos).

A identificação dos compostos foi efetuada com base na comparação do espectro de massa dos compostos com o espectro obtido na biblioteca de espectros (GCMSolutions versão 2.10 – LabSolutions). De forma a evitar identificações incorretas apenas foram considerados aqueles compostos com um índice de semelhança igual ou superior a 88%. De forma a garantir uma maior confiança nas identificações foi também utilizado outro método, tendo como base a determinação do índice de retenção dos compostos, comparando o índice de retenção fornecido no cromatograma com o calculado utilizando uma solução de padrões de alcanos C8-C20 (*Anexo 9*), analisada nas mesmas condições que as variedades.

De entre os índices de retenção encontrados na literatura podemos citar o índice de retenção de Kováts e o índice de retenção linear (91). Este último diferencia-se do primeiro apenas nas condições não-isotérmicas de temperatura, ou seja, o índice de retenção linear é sempre calculado quando se utilizam temperaturas programadas de coluna (92), como é o caso do trabalho realizado no âmbito desta tese. As fórmulas dos índices de retenção são apresentadas de seguida (91,92):

a. *Índice de retenção de Kováts*

$$\text{Equação 3} \quad I_x = 100_n + 100 \left[\frac{\log(t_x) - \log(t_n)}{\log(t_{n+1}) - \log(t_n)} \right]$$

b. *Índice de retenção linear*

$$\text{Equação 4} \quad I_x = 100_n + 100 \left[\frac{t_x - t_n}{t_{n+1} - t_n} \right]$$

De forma a agilizar o cálculo dos índices de retenção linear, foi utilizada uma calculadora *online* (<https://www.pherobase.com/>). Os valores obtidos foram comparados com valores encontrados na literatura (<https://www.nist.gov/>) para colunas da mesma polaridade, atendendo que foi utilizada uma coluna polar DB-WAX.

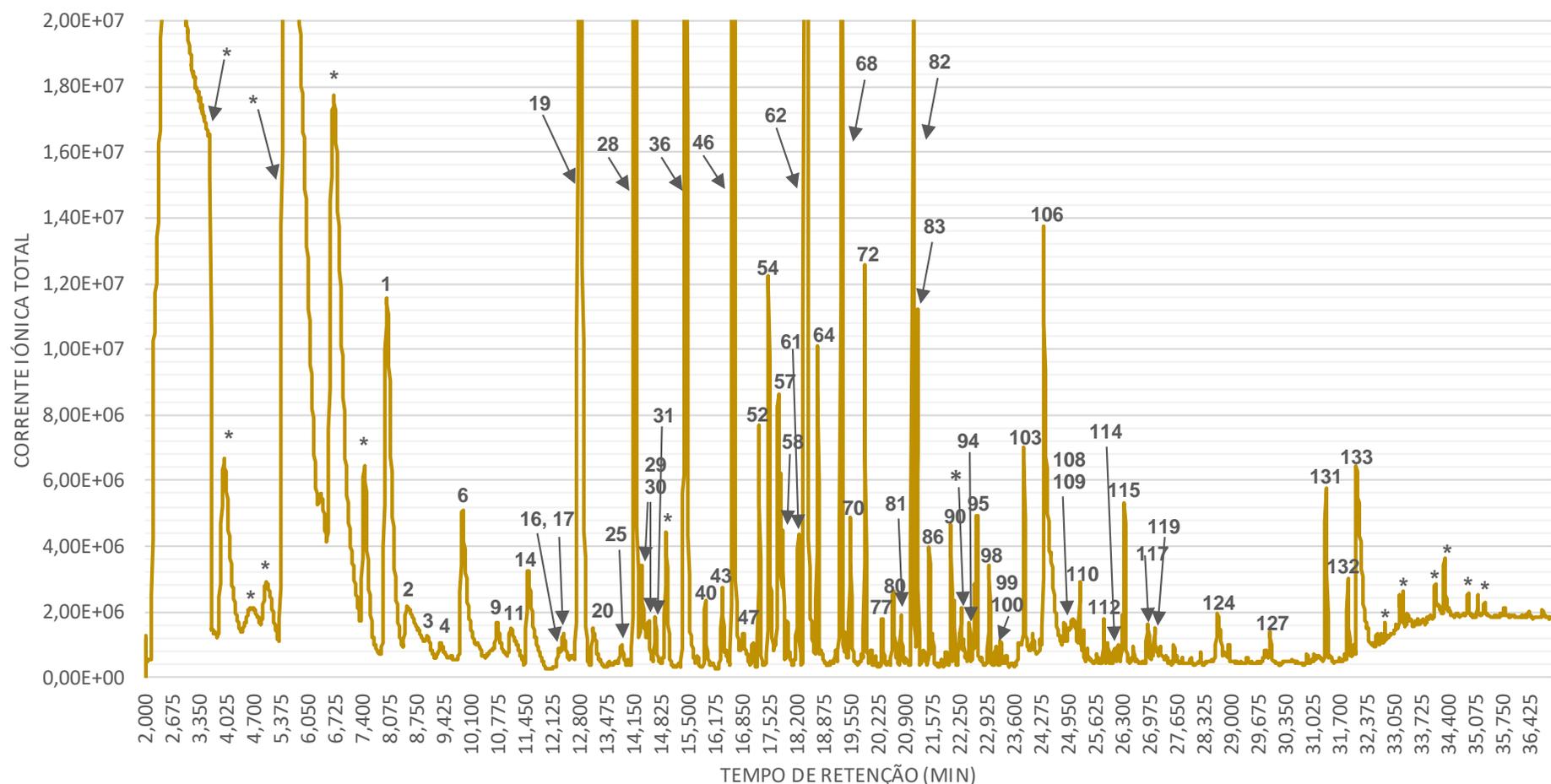


Figura 14 – Cromatograma tipo referente ao perfil cromatográfico da amostra 654 do bloco 3 (segundo ano do projeto).

Legenda: * – Siloxanos; 1 – 1-Penten-3-ona; 2 – Tolueno; 3 – NI; 4 – 2,3-Pentanodiona; 6 – Não Identificado (NI); 9 – NI; 11 – Etilbenzeno; 14 – *o*-Xileno; 16 – NI; 17 – NI; 19 – 1-Penten-3-ol; 20 – NI; 25 – Eucaliptol; 28 – NI; 29 – (E)-2-Hexenal; 30 – NI; 31 – Ácido hexanóico, éster etílico; 36 – 1-Pentanol; 40 – NI; 43 – 2-Octanona; 46 – NI; 47 – 1-Octen-3-ona; 52 – Ciclopentanol; 54 – (Z)-2-Pentenol; 57 – (Z)-6-Octen-2-one; 58 – NI; 61 – NI; 62 – Formiato de hexila; 64 – NI; 68 – NI; 70 – 3-Octanol; 72 – NI; 77 – NI; 80 – NI; 81 – NI; 82 – 1-Octen-3-ol; 83 – 1-Heptanol; 86 – NI; 90 – NI; 94 – 2-Decanona; 95 – NI; 98 – NI; 99 – NI; 100 – NI; 103 – NI; 106 – 2,3-Butanediol; 108 – NI; 109 – NI; 110 – NI; 112 – NI; 114 – Mentol; 115 – NI; 117 – 3-Furanometanol; 119 – (E,E)-2,4-Nonadienal; 124 – NI; 127 – NI; 131 – Álcool benzílico; 132 – Álcool feniletílico; 133 – NI.

Os cromatogramas das variedades analisadas mostram que estas apresentam na sua composição um número elevado de compostos, de diferentes famílias químicas e que as variações observadas entre as variedades, tal como seria de esperar, referem-se, na sua maioria, à área dos picos detetados e não ao aparecimento de novos compostos.

O Anexo 8 apresenta a compilação de todos os compostos identificados, a que família pertencem, os índices de semelhança, os índices de retenção linear e respetivos valores na literatura, bem como, os descritores aromáticos do composto identificado. Dos compostos identificados neste trabalho alguns encontram mencionados na literatura, como é o caso do 1-octen-3-ol e do 3,5-octadien-2-ona identificados por Buttery, *et al* em 1975 (66), e do 1-pentanol identificado por Lovegren, *et al* em 1979 (67). Também foram identificados compostos detetados por Oomah, *et al* em 2007, tais como o tolueno, o etilbenzeno, o *o*-xileno, o 1,2,3-trimetilbenzeno, o benzaldeído, o 1-penten-3-ol, o 1-pentanol, o 1-hexanol, o 1-octen-3-ol, o álcool benzílico, a 3,5-octadien-2-ona e o 2-propilfurano (69). Todos estes compostos voláteis foram identificados em amostras de feijão cru.

Para perceber a relação entre as várias variedades aqui estudadas e os compostos voláteis identificados, foi realizada uma análise por componentes principais (ACP). Esta ferramenta estatística permite comparar um grande número de variedades quando um grande número de variáveis está a ser avaliado. Neste trabalho o número de variedades a comparar era 91 e o número de variáveis considerado inicialmente para o tratamento de resultados era 138.

Numa primeira abordagem foram utilizados os valores da área dos picos de todos os compostos identificados (n=138) das 91 variedades estudadas, e respetivas réplicas biológicas e réplicas técnicas.

Realizando uma *Two-way* ANOVA foi possível verificar que o fator réplica técnica não é estatisticamente significativo ($P=0,546$). Assim sendo, pode ser utilizado o valor médio destes resultados na ACP, confirmando assim que o equipamento não tem influência nos resultados obtidos. A mesma *Two-way* ANOVA também permitiu determinar que o fator bloco, ou seja, a réplica biológica das variedades estudadas, não é estatisticamente significativo ($P=0,887$), logo pode-se concluir que o campo era uniforme. Assim, é possível utilizar os valores médios do bloco na ACP, reduzindo o número de entradas o que facilita a comparação e avaliação dos resultados obtidos (*Tabela 19*).

Tabela 19 – Resultados obtidos no tratamento estatístico (Two-way ANOVA).

	<i>p-value</i>
<i>Bloco (réplica biológica)</i>	0,887
<i>Replica técnica</i>	0,546

Posteriormente, procedeu-se a uma análise de correlação para verificar quais as variáveis que poderiam ser retiradas, diminuindo assim o seu número o que, mais uma vez, facilitava a análise dos resultados. Assim sendo, foram retiradas as variáveis com valores de correlação superiores a 0,75, ou seja, as variáveis A3, A24, A39, A40, A50, A52, A60, A62, A65, A66, A79, A94, A96, A108, A109, A110, A117, A118, A122, A123, A129, A130, A133, A134 e A137. Com as variáveis selecionadas (n=113), foi realizada a ACP. No entanto, como a variância total explicada era baixa foram retiradas da matriz de resultados as variáveis com uma contribuição para a componente inferior a 0,5 (93), permanecendo assim na matriz de dados 24 variáveis que estão identificadas a negrito no *Anexo 8*. A matriz de resultados foi sujeita a nova análise por ACP e a projeção das variedades e respetivas variáveis, no plano explicado pelas componentes 1 e 2 é apresentada na *Figura 15*, e justifica 49,04% da variância total acumulada.

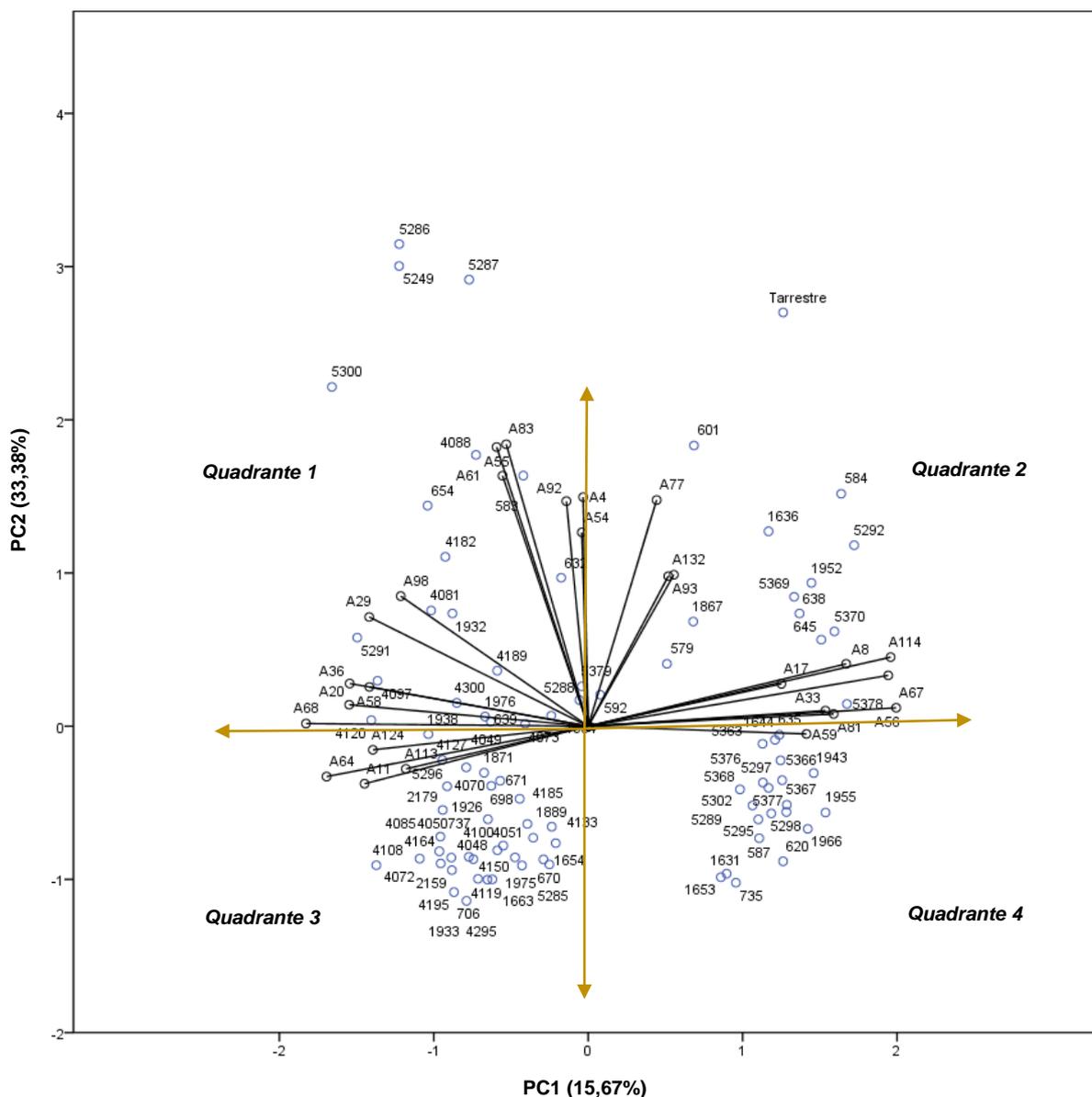


Figura 15 – Projeção das variedades de feijão (n=91) e variáveis medidas (n=24) no plano definido pelas componentes principais 1 e 2. As variáveis estão identificadas como: A4, A8, ..., A132.

A partir da análise da *Figura 15* é possível inferir que há uma aparente distribuição das variedades por quadrantes diferentes. Esta distribuição é mais centralizada nos quadrantes 3 e 4, e estas variedades são discriminadas por apresentarem teores inferiores relativamente às variáveis discriminantes nos quadrantes 1 e 2.

Relativamente ao quadrante 1, as variedades 5249, 5286, 5287 e 5300 apresentam na sua composição uma quantidade superior de (Z)-2-pentenol (A54), 2,3-pentanodiona (A4), A92, 1-heptanol (A83), (Z)-2-heptenal (A55) e formiato de hexila (A61). Para a discriminação das restantes variedades neste quadrante 1 estão a contribuir teores mais elevados das variáveis A98, (E)-2-hexenal (A29), 1-pentanol (A36), (Z)-3-hexenol (A68) e A58. Em relação ao quadrante 2, a variedade Tarrestre parece discriminar-se por apresentar teores mais elevados de A77, álcool feniletílico (A132) e A93. Para as restantes variedades presentes no quadrante

2 estão a contribuir teores mais elevados das variáveis 2-metilpropanol (A8), mentol (A114), A17 e A33.

Os compostos voláteis de relevância nas variedades 5249, 5286, 5287 e 5300 tem um descritor aromático associado a verde, plástico, etéreo, frutado, no caso do **(Z)-2-pentenol**, a picante, doce, amanteigado, cremoso, caramelo, noz, queijo, no caso da **2,3-pentanodiona**, a mofado, folhagem, violeta, herbal, verde, doce, madeira, floral (peônia), no caso do **1-heptanol** e a maçã, ameixa, banana, doce, no caso do **formiato de hexila**. Por sua vez, os compostos de relevância na variedade Tarrestre tem um descritor aromático associado a doce, floral, fresco, pão, rosa, mel, no caso do **álcool feniletílico**. Os restantes compostos voláteis que discriminam a variedade Tarrestre não foram identificados pelas bibliotecas de massas utilizadas.

Assim, podemos inferir que as variedades presentes no quadrante 1 tem em um descritor aromático específico, e que no caso do quadrante 2 acontece o mesmo. Em ambos os casos é possível que seja este o fator de distinção entre as variedades analisadas e que justifica o resultado da projeção obtida. Observa-se ainda uma discriminação das variedades nos quadrantes 1 e 2 por família de composto, neste caso, álcoois, uma vez, que são a família dominante em ambos os quadrantes.

5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Com o trabalho desenvolvido no âmbito desta tese podemos concluir que, no que se refere à análise do teor do amido resistente (AR):

- os resultados obtidos para as variedades de farinha de feijão cru estão dentro dos valores médios descritos na literatura;
- não há diferenças significativas entre os teores em AR determinados e as diferentes variedades analisadas;
- há diferenças significativas entre os valores de AR do primeiro e do segundo ano do projeto (dois ambientes diferentes) e há interação significativa entre o fator variedade e o fator ambiente;
- o teor em AR não é influenciado pela cor e padrão da semente das variedades comerciais de feijão.

No que se refere ao estudo comparativo realizado entre a bolacha à base de farinha de feijão (BF) e bolacha à base de farinha de trigo (BT), conclui-se que:

- as bolachas BF e BT são semelhantes quanto à sua composição nutricional, e ambas tiveram uma boa aceitação a nível sensorial por parte dos voluntários, sendo que a BF obteve uma aceitação ligeiramente superior à BT;
- o teor em AR mostrou ser cerca de vinte vezes superior na BF (11,24g/100g) em relação à BT (0,24g/100g);
- nos resultados obtidos para o teor em fenóis totais, atividade antioxidante e inibidores da atividade da tripsina (TIA), ocorre uma diminuição do teor com o processo de preparação das bolachas (180°C), à exceção da MT que teve um valor médio de fenóis totais mais elevado que a BT;
- a análise dos compostos voláteis de ambas as bolachas mostrou que era possível identificar compostos específicos da BF com um descritor aromático associado a cacau, assado, noz, verde, cremoso, gorduroso, sulfuroso e queimado. Por sua vez, os compostos identificados preferencialmente na BT estão associados a descritores verde, gorduroso, especiarias, floral, queijo. Embora semelhantes há claramente descritores aromáticos que caracterizam cada amostra, tal como, o cacau, a noz, o sulfuroso/queimado na BF e as especiarias, o floral e o queijo na BT, sendo possível que estes sejam compostos decisórios na percepção sensorial;
- a medição da glicémia mostra que a BF revelou uma resposta glicémica significativamente inferior à BT, e que simultaneamente induziu maior saciedade que

esta última. Estes resultados sugerem que o AR influencia a digestibilidade da fração de amido disponível;

- a determinação do IG das amostras em estudo mostrou que a BF possui um IG de 31, valor este associado a alimentos com um baixo IG, enquanto que, a BT apresentou um valor de 75, valor associado a alimentos com um elevado IG. O IG inferior da BF é o resultado da resposta glicêmica menor que essa amostra desencadeou e, uma vez que, as duas amostras em estudo têm como diferença principal o teor em AR, podemos afirmar que este componente do feijão pode ser o responsável pela diminuição do IG na bolacha à base de farinha de feijão, a BF;

Dos resultados obtidos na identificação da composição volátil da farinha de feijão cru foi possível perceber que:

- a ACP realizada mostra uma aparente dispersão das variedades por quadrantes, em especial no quadrante 1 e 2;
- as variedades presentes nos quadrantes 1 e 2 têm descritores aromáticos específicos, e esta pode ser a justificação da projeção obtida;
- há uma discriminação das variedades nos quadrantes 1 e 2 por família de composto, neste caso, álcoois.

Dado que a indústria alimentar está constantemente à procura de novos alimentos, seja por serem mais equilibrados a nível nutricional ou por serem mais apreciados pelos consumidores do ponto de vista sensorial, o desenvolvimento de uma bolacha à base de farinha de feijão apresenta-se como uma possibilidade interessante. Entre os diferentes componentes da fibra alimentar, o AR apresenta-se como um componente muito interessante conferindo diversos benefícios para a saúde. Desta forma, seria interessante, no futuro, e em colaboração com uma indústria nacional, tentar proceder à colocação no mercado de uma bolacha com elevado teor em AR, como é o caso da bolacha formulada no âmbito desta tese.

Na literatura não é comum encontrar trabalhos desenvolvidos que relacionam a composição volátil com o feijão. No entanto, existem alguns trabalhos desenvolvidos no que toca ao feijão cru, tal como o realizado aqui. Futuramente, seria interessante proceder à análise da composição volátil de feijão cozido e assim poder associar o conteúdo sensorial do feijão ao consumidor, e ao que este procura na altura de compra.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Duchin F. Sustainable Consumption of Food - A Framework for Analyzing Scenarios about Changes in Diets. *J Ind Ecol* [Internet]. 2005;9(1–2):99–114. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1162/1088198054084707/abstract%5Cnhttp://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1162/1088198054084707/asset/1088198054084707.pdf?v=1&t=hnhozk3o&s=662d7f24dae9918f4430a5b5b0a3781f80816d26>
2. Kushi LH, Lenart EB, Willett WC. Health implications of Mediterranean diets in light of contemporary knowledge. 1. Plant foods and dairy products. *Am J Clin Nutr*. 1995;61:1407S–15S.
3. Bosetti C, Gallus S, Trichopoulou A, Talamini R, Franceschi S, Negri E. Influence of the Mediterranean Diet on the Risk of Cancers of the Upper Aerodigestive Tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003;12(October):1091–4.
4. Trichopoulou A, Martínez-gonzález MA, Tong TYN, Forouhi NG, Khandelwal S, Prabhakaran D, et al. Definitions and potential health benefits of the Mediterranean diet: views from experts around the world. *BMC Med*. 2014;12(112):1–16.
5. Dontas AS, Zerefos NS, Panagiotakos DB, Valis DA. Mediterranean diet and prevention of coronary heart disease in the elderly. *Clin Interv Aging*. 2007;2(1):109–15.
6. Fundação Dieta Mediterrânea. Dieta Mediterrânica. Associação Portuguesa de Nutricionistas [Internet]. 2010 [cited 2017 Nov 7];11. Available from: http://www.apn.org.pt/documentos/ebooks/Ebook_Dieta_Mediterranica.pdf
7. Food and Agriculture Organization of the United Nations. About the International Year of Pulses. United Nations - General Assembly [Internet]. 2016;1. Available from: <http://www.fao.org/pulses-2016/about/en/>
8. Instituto Nacional de Estatística. Estatísticas Agrícolas 2012. Estatísticas Agrícolas. 2013. 33-44 p.
9. Maria João Loureiro do Valle Pereira. Potencial químico e biológico de rebentos de leguminosas. Alteração do metaboloma e da bioactividade de *Glycine max* (L.) Merr. pela inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*. Universidade do Minho. 2012.
10. Food and Agriculture Organization of the United. International Year of Pulses. United Nations - General Assembly [Internet]. 2016;68:1–2. Available from: undocs.org/A/RES/68/231

11. Christenhusz MJM, Byng JW. The number of known plants species in the world and its annual increase. 2016;261(May):201–17.
12. Martins J, Bento O. As leguminosas como alimentos funcionais: o caso das dislipidémias e das doenças cardiovasculares. Rev Ciências Agrárias [Internet]. 2007;385–99. Available from: <https://www.rdp.uevora.pt/handle/10174/2151>
13. Venter, CS; van Eyssen E. More legumes for better overall health. South African J Clin Nutr. 2001;14(3 Suppl):S32–8.
14. Berbara RL, Souza FA, Fonseca H MAC. Fungos Micorrízicos Arbusculares: Muito Além da Nutrição. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2006.
15. Almeida MMTB. Fertilizantes de Leguminosas: Autossuficiência de Nitrogênio em Sistemas Orgânicos de Produção. Instituto de Agronomia. 2012.
16. Siddiq M, Ravi R, Harte J, Dolan K. Physical and functional characteristics of selected dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. Food Sci Technol [Internet]. 2010;43(2):232–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2009.07.009>
17. Graham P, Ranalli P. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). F Crop Res. 1997;53:131–46.
18. Hayat I, Ahmad A, Masud T, Ahmed A, Bashir S. Nutritional and Health Perspectives of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): An Overview. Food Res Int. 2013;(2):37–41.
19. Doss A, Pugalenti M, Vadivel V, Subhashini G, Subash AR. Effects of processing technique on the nutritional composition and antinutrients content of under – utilized food legume. Food Chem. 2011;18(3):965–70.
20. Wang N, Hatcher D, Tyler R, Toews R, Gawalko E. Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). Food Res Int [Internet]. 2010;43(2):589–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.012>
21. Nutricional V, Phaseolus DEF, Rico C, Pedro L, Aldonir B, Moacir C, et al. Valor Nutricional de Feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivares rico 23, carioca, piratã-1 e rosinha-G2. 1995;(532).
22. Costa GEDA, Queiroz-Monici K da S, Reis SMPM, Oliveira AC De. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. Food Chem. 2006;94:327–30.
23. Kutos T, Golob T, Kac M, Plestenjak A. Dietary fibre content of dry and processed beans. Food Chem. 2003;80:231–5.

24. Lin L-Z, Harnly JM, Pastor-Corrales MS, Luthria DL. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem.* 2008;107:399–410.
25. Beninger CW, Hosfield GL. Antioxidant Activity of Extracts, Condensed Tannin Fractions, and Pure Flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. Seed Coat Color Genotypes. *J Agric Food Chem.* 2003;51:7879–83.
26. Aparicio-Fernandez X, Yousef GG, Loarca-Piña G, Mejia E de, Lila MA. Characterization of Polyphenolics in the Seed Coat of Black Jamapa Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem.* 2005;53:4615–22.
27. Dinelli G, Bonetti A, Dinelli G. Content of flavonols in Italian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ecotypes Content of flavonols in Italian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ecotypes. *Food Chem.* 2006;99(December).
28. Cardador-Martínez A, Loarca-Piña G, Oomah BD. Antioxidant Activity in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem.* 2002;50:6975–80.
29. Annete H. Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*). *Food Chem.* 2007;103:521–7.
30. Stanton W, Francis B. Ecological Significance of Anthocyanins in the Seed Coats of the Phaseoleae. *Nat Publ Gr.* 1966;211:970–1.
31. Deshpande S, Sathe S, Cornforth D, Salunkhe D. Effects of Dehulling on Functional Properties of Dry Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Flours.pdf. *Cereal Chem.* 1982;59(5):396–401.
32. Ariga T, Hamano M. Radical Scavenging Action and Its Mode in Procyanidins B-1 and B-3 from Azuki Beans to Peroxyl Radicals. *Agric Biol Chem.* 1990;54(10):2499–504.
33. Tsuda T, Ohshima K, Government AP, Industries PC. Antioxidative Pigments Isolated from the Seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *J Agric Food Chem.* 1994;42:248–51.
34. Gonzalez E, Mejia D, Castano-tostado E. Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. *Mutat Res.* 1999;441.
35. Cummings PB. *Plant reproduction and biotechnology.* 2002.
36. Luthria DL, Pastor-corrales MA. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L .) varieties. *J Food Compos Anal Anal.* 2006;19:205–11.
37. Boateng J, Verghese M, Walker L, Ogutu S. Effect of processing on antioxidant contents in selected dry beans (*Phaseolus* spp. L.). *Food Sci Technol.* 2008;41:1541–7.

38. US Department of Health and Human Services, US Department of Agriculture. Dietary Guidelines for Americans. Healthierus. 2005;
39. Anderson JW, Major AW. Pulses and lipaemia , short- and long-term effect: Potential in the prevention of cardiovascular disease. *Br J Nutr.* 2017;88(May):263–71.
40. Flight I, Clifton P. Cereal grains and legumes in the prevention of coronary heart disease and stroke: a review of the literature. *Eur J Clin Nutr.* 2006;60(December):1145–59.
41. Maruyama C, Araki R, Kawamura M, Kondo N, Kigawa M. Azuki Bean Juice Lowers Serum Triglyceride Concentrations in Healthy Young Women. *J Clin Biochem Nutr.* 2008;43(July):19–25.
42. Bitzur R, Cohen H, Kamari Y, Shaish A, Harats D. Triglycerides and HDL Cholesterol. *Diabetes Journals.* 2009;32:373–7.
43. Venn B, Mann J. Cereal grains, legumes and diabetes. *Eur J Clin Nutr.* 2004;58:1443–61.
44. Campos-Vega R, Loarca-Piña G, Oomah BD. Minor components of pulses and their potential impact on human health. *Food Res Int [Internet].* 2010;43(2):461–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.004>
45. Pauls KP, Fan MZ. In vitro starch digestibility, expected glycemic index and some physicochemical properties of starch and flour from common bean. *Food Res Int [Internet].* 2015;41(9):869–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2008.03.013>
46. Foster-Powell K, Holt SH, Brand-Miller JC. International table of glycemic index and glycemic load values: 2002. *Am J Clin Nutr.* 2002;76(2):5–56.
47. Patterson C, Maskus H, Dupasquier C. Pulse Crops for Health. *Cereal Foods World.* 2009;54(3).
48. Pietta P-G. Flavonoids as Antioxidants. *J Nat Prod.* 2000;63(7):1035–42.
49. Pizzimenti S, Toaldo C, Pettazoni P, Dianzani MU, Barrera G. The “Two-Faced” Effects of Reactive Oxygen Species and the Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxynonenal in the Hallmarks of Cancer. *Cancers (Basel).* 2010;338–63.
50. Cardador-Martínez A, Albores A, Bah M, Calderón-Salinas V, Castaño-Tostado E, Guevara-González R, et al. Relationship Among Antimutagenic, Antioxidant and Enzymatic Activities of Methanolic Extract from Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Foods Hum Nutr.* 2006;61:161–8.
51. Correa P. Epidemiological Correlations between Diet and Cancer Frequency. *Cancer*

- Res. 1981;41:3685–90.
52. Singh PN, Fraser GE. Dietary Risk Factors for Colon Cancer in a Low-risk Population. *Am J Epidemiol.* 1998;148(8).
 53. Kolonel LN, Hankin JH, Whittemore AS, Wu AH, Gallagher RP, Wilkens LR, et al. Vegetables, Fruits, Legumes and Prostate Cancer: A Multiethnic Case-Control Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9(August):795–804.
 54. World Health Organization. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases - Technical Report Series. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. 2003;
 55. Pereira K. Amido resistente, a última geração no controle de energia e digestão saudável. *Ciência e Tecnol Aliment.* 2007;27:88–92.
 56. Kulkarni PR. Starch — A Review. 2006;5(Figure 2).
 57. Fuentes-Zaragoza E, Sánchez-Zapata E, Sendra E, Sayas E, Navarro C, Fernández-López J, et al. Resistant starch as prebiotic: A review. *Compr Rev food Sci food Saf.* 2011;406–15.
 58. Amagliani L, O'Regan J, Kelly AL, O'Mahony JA. Chemistry, structure, functionality and applications of rice starch. *J Cereal Sci [Internet].* 2016;70:291–300. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2016.06.014>
 59. Amaral OMRP de. Pão com elevado teor em amido resistente: desenvolvimentos tecnológico e estudo in vivo. Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. 2016.
 60. Thilakavathy S, Pandeewari NK. The Glycemic Index - A Science Based Diet. *Int J Pharma Med Biol Sci.* 2012;1(2):259–65.
 61. Jenkins DJ, Kendall CW, Augustin LS, Franceschi S, Hamidi M, Marchie A. Glycemic index: overview of implications in health and disease. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:266–73.
 62. Ludwig DS. The Glycemic Index Physiological Mechanisms Relating to Obesity, Diabetes, and Cardiovascular Disease. *Am Med Assoc.* 2002;287(18):2414–23.
 63. Basso C, Silva LP da, Bender AB beutinger, Silveira F da. Elevação dos níveis de amido resistente: efeito sobre a glicemia e na aceitabilidade do alimento. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2011;70(3):276–82.
 64. Dudareva N, Negre F, Nagegowda DA, Orlova I. Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 2006;25(October):417–40.
 65. Maffei M. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African J Bot.* 2010;76(4):612–31.

66. Buttery RG, Seifert RM, Ling LC. Characterization of Some Volatile Constituents of Dry Red Beans. *J Agric Food Chem.* 1975;23(3):516–9.
67. Lovegren N V, Fisher GS, Legendre MG, Schuller WH. Volatile Constituents of Dried Legumes. *J Agric Food Chem.* 1979;27(4):851–3.
68. van Ruth SM, Dings L, Buhr K, Posthumus MA. In vitro and in vivo volatile flavour analysis of red kidney beans by proton transfer reaction – mass spectrometry. *Food Res Int.* 2004;37:785–91.
69. Oomah BD, Liang LSY, Balasubramanian P. Volatile compounds of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Foods Hum Nutr [Internet].* 2007;62(4):177–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17926127>
70. Mishra PK, Tripathi J, Gupta S, Variyar PS. Effect of cooking on aroma profile of red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) and correlation with sensory quality. *Food Chem [Internet].* 2016;215:401–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.149>
71. International Board for Plant Genetic Resources. *Phaseolus Vulgaris* Descriptors. Bioversity International. 1982;
72. Sparvoli F, Laureati M, Pilu R, Pagliarini E, Toschi I, Giuberti G, et al. Exploitation of Common Bean Flours with Low Antinutrient Content for Making Nutritionally Enhanced Biscuits. *Front Plant Sci.* 2016;7(June):1–14.
73. _Zili_ S, Kocadagli T, Vancetovi J, Gokmen V. Effects of baking conditions and dough formulations on phenolic compound stability , antioxidant capacity and color of cookies made from anthocyanin-rich corn fl our. *Food Sci Technol.* 2016;65:597–603.
74. Figueira ME, Oliveira M, Direito R, Rocha J, Alves P, Serra A, et al. Protective effects of a blueberry extract in acute inflammation and collagen-induced arthritis in the rat. *Biomed Pharmacother [Internet].* 2016;83:1191–202. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.08.040>
75. Uganda National Bureau of Standards. Animal feeding stuffs — Determination of trypsin inhibitor activity of soya products. *Uganda Standards.* 2001;1.
76. Wolever T. Is glycaemic index (GI) a valid measure of carbohydrate quality? *Eur J Clin Nutr [Internet].* 2013;(January):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ejcn.2013.27>
77. Belo MMN. Estudo de diferentes variedades de milho utilizadas na produção de broa. Universidade de Lisboa; 2012.

78. Fabbri AD, Schacht RW, Crosby GA. Evaluation of resistant starch content of cooked black beans, pinto beans and chickpeas. *NFS J* [Internet]. 2016;3:8–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nfs.2016.02.002>
79. Queiroz-Monici K da S, Costa GE, Silva N da, Reis SM, Oliveira AC de. Bifidogenic effect of dietary fiber and resistant starch from leguminous on the intestinal microbiota of rats. *Nutrition*. 2005;21:602–8.
80. Tovar J, Melito C. Steam-Cooking and Dry Heating Produce Resistant Starch in Legumes. *J Agric Food Chem*. 1996;44:2642–5.
81. O'Sullivan TA, Hafekost K, Mitrou F, Lawrence D. Food Sources of Saturated Fat and the Association With Mortality: A Meta-Analysis. *Am J Public Health*. 2013;103(9):31–42.
82. Aparicio-Saguilán A, Sáyago-Ayerdi SG, Vargas-Torres A, Tovar J, Ascencio-Otero TE, Bello-Pérez LA. Slowly digestible cookies prepared from resistant starch-rich lintnerized banana starch. *J Food Compos Anal*. 2007;20:175–81.
83. Jan U, Gani A, Ahmad M, Shah U. Characterization of cookies made from wheat flour blended with buckwheat flour and effect on antioxidant properties. *J Food Sci Technol*. 2015;52(October):6334–44.
84. Anton AA, Fulcher RG, Arntfield SD. Physical and nutritional impact of fortification of corn starch-based extruded snacks with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour: Effects of bean addition and extrusion cooking. *Food Chem* [Internet]. 2009;113(4):989–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.050>
85. Shang R, Wu H, Guo R, Liu Q, Pan L, Li J, et al. The Diversity of Four Anti-nutritional Factors in Common Bean. *Hortic Plant J* [Internet]. 2016;2(2):97–104. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hpj.2016.06.001>
86. Ross AA, Ross KA, Lukow OM, Fulcher RG, Arntfield SD. Influence of added bean flour (*Phaseolus vulgaris* L.) on some physical and nutritional properties of wheat flour tortillas. *Food Chem*. 2008;109:33–41.
87. Liener IE, Goodale RL, Deshmukh A, Satterberg TL, Ward G, DiPietro CM, et al. Effect of a Trypsin Inhibitor From Soybeans (Bowen-Birk) on the Secretory Activity of the Human Pancreas. *Gastroenterology* [Internet]. 1988;94(2):419–27. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0016-5085\(88\)90431-3](http://dx.doi.org/10.1016/0016-5085(88)90431-3)
88. Brand-Miller JC, Stockmann K, Atkinson F, Petocz P, Denyer G. Glycemic index, postprandial glycemia, and the shape of the curve in healthy subjects: analysis of a database of more than 1000 foods. *Am J Clin Nutr*. 2009;89:97–105.

89. Flint A, Raben A, Blundell J, Astrup A. Reproducibility, power and validity of visual analogue scales in assessment of appetite sensations in single test meal studies. *Int J Obes.* 2000;24:38–48.
90. Wolever TM, Brand-miller JC, Abernethy J, Astrup A, Atkinson F, Axelsen M, et al. Measuring the glycemic index of foods: interlaboratory study. *Am J Clin Nutr.* 2008;87:247–57.
91. Zini C, Mühlen C Von. Índices de retenção em cromatografia gasosa bidimensional abrangente. *Sci Chromatogr.* 2009;21–9.
92. Dool H Van Der, Kratz PD. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatogr.* 1963;(3):463–71.
93. Samuels P. Advice on Exploratory Factor Analysis. Centre for Academic Success, Birmingham City University. 2016.

7. ANEXOS

Anexo 1. Identificação das amostras de feijão analisadas

Identificação da amostra	Padrão	Cor (na ausência de padrão)
579	Ausente	branco
583	Ausente	branco
584	Ausente	branco
587	Ausente	branco
592	ausente	castanho
600	ausente	amarelo
601	ausente	rosa
602	ausente	branco
620	manchas; bicolor	-
621	ausente	branco
632	ausente	branco
633	manchas; bicolor	-
635	ausente	castanho claro
639	ausente	branco
642	ausente	branco
644	ausente	rosa
645	ausente	castanho
648	ausente	branco
654	riscas	-
667	ausente	rosa
670	ausente	vermelho
671	riscas	-
675	ausente	branco
695	riscas	-
698	avermelhado à volta do <i>hilum</i>	-
700	manchas; bicolor	-
706	ausente	rosa
735	ausente	branco
736	ausente	branco
737	riscas	-
747	ausente	rosa

748	ausente	castanho
1631	manchado	-
1636	ausente	branco
1644	ausente	branco
1651	ausente	branco
1653	manchado	-
1654	ausente	vermelho arroxeadado
1662	ausente	vermelho
1663	ausente	castanho
1867	ausente	castanho
1871	riscas largas	-
1877	ausente	castanho
1883	ausente	castanho claro
1884	riscas	-
1889	riscas	-
1892	riscas	-
1897	riscas	-
1911	ausente	castanho
1917	ausente	branco
1918	ausente	branco
1926	ausente	castanho
1927	riscas	-
1932	ausente	branco
1933	ausente	rosa
1937	ausente	branco
1938	riscas	-
1943	ausente	branco
1944	ausente	branco
1948	ausente	branco
1952	ausente	branco
1955	riscas	-
1956	riscas	-
1961	riscas largas	-
1964	ausente	castanho
1966	ausente	vermelho
1975	ausente	vermelho
1976	riscas	-
1979	Ausente	branco
1984	Ausente	rosa

2081	Riscas	-
2126	Riscas	-
2155	Riscas	-
2159	manchado	-
2179	Ausente	preto
2189	Ausente	vermelho
2192	Riscas	-
4038	Riscas	-
4044	Riscas	-
4048	Ausente	castanho
4049	Ausente	vermelho
4050	Ausente	castanho
4051	Riscas	-
4067	manchado com cor marginal	-
4070	Ausente	vermelho
4071	Riscas	-
4072	Ausente	castanho claro
4081	Ausente	castanho claro
4085	Ausente	branco
4088	Ausente	branco
4097	Riscas	-
4100	Riscas	-
4108	manchado com cor marginal	-
4110	Ausente	rosa
4119	Riscas	-
4120	Ausente	vermelho
4127	Ausente	branco
4133	manchas; bicolor	-
4135	Riscas	-
4144	Ausente	branco
4149	Ausente	vermelho
4150	Riscas	-
4162	Ausente	vermelho
4164	Ausente	rosa
4179	Ausente	rosa
4182	Riscas	-
4185	manchado com cor marginal	-
4189	manchas; bicolor	-

4290	Riscas	-
4295	Riscas	-
4300	Ausente	vermelho
4306	Ausente	rosa
5249	Ausente	branco
5285	Ausente	amarelo
5286	Ausente	castanho claro
5287	Ausente	castanho
5288	Riscas	-
5290	Ausente	vermelho arroxeadado
5291	Riscas	-
5292	riscas largas	-
5295	manchado	-
5296	riscas largas	-
5297	Riscas	-
5298	Ausente	castanho
5300	Riscas	-
5302	Ausente	amarelo
5363	manchas; bicolor	-
5365	Riscas	-
5366	Ausente	rosa
5367	Riscas	-
5368	Ausente	rosa
5369	Ausente	vermelho arroxeadado
5370	Ausente	rosa
5371	Ausente	rosa
5372	Riscas	-
5376	Ausente	castanho
5377	Ausente	rosa
5378	manchado com cor marginal	-
5379	Riscas	-
5380	Riscas	-
5381	Riscas	-
Tarrestre-1	manchado com cor marginal	-
Tarrestre-4	avermelhado à volta do <i>hilum</i>	-

Anexo 2. Documento de informação ao participante do ensaio *in vivo*

Título do estudo: EFEITO DA INGESTÃO DE BOLACHAS COM FARINHA DE FEIJÃO NA RESPOSTA GLICÉMICA

Embora a importância das leguminosas na alimentação tenha vindo a ser mencionada pelos *media*, e comunidade científica, servindo como evidência o facto de 2016 ter sido nomeado o Ano Internacional das Leguminosas pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), estudos relativos à caracterização nutricional (ex. teor em amido resistente) de variedades Portuguesas de feijão são ainda escassos.

Os benefícios do amido resistente, tais como, aumento da saciedade, diminuição dos níveis de glucose no sangue, prevenção do cancro colo-rectal, entre outros, são já conhecidos e descritos na literatura, através de metodologias como os ensaios *in vivo* em humanos. Com vista a compreender o impacto do processamento no teor em amido resistente do feijão e seu efeito na saúde humana procedeu-se ao processamento de bolachas de feijão usando uma variedade Portuguesa de feijão e irá avaliar-se o efeito do amido resistente no índice glicémico e saciedade de voluntários sem doença diagnosticada.

Para que possa participar neste estudo deverá preencher os seguintes requisitos:

- Idade compreendida entre 18 e 35 anos;
- Peso estável nos últimos 3 meses;
- Não ter diagnóstico médico de diabetes ou outras doenças endócrinas;
- Não ter história clínica de doença gastrointestinal ou distúrbios endócrinos;
- Não estar a tomar medicamentos que interfiram com o metabolismo glicídico ou lipídico (antidiabéticos orais, insulina, estatinas, fibratos, corticosteróides, antibióticos, antiretrovirais, entre outros);
- Não ter estado internado nos últimos 3 meses;
- Não estar grávida ou a amamentar;
- Não ser fumador;
- Efetuar regularmente a refeição do pequeno-almoço.

Caso preencha os requisitos definidos é um candidato a participar neste estudo. A sua participação é voluntária e poderá abandoná-lo a qualquer momento.

Como participante no estudo ser-lhe-á pedido que compareça em jejum, ao início da manhã, em **cada sessão que terá a duração aproximada de 2 horas**. No total serão **três sessões** com um **intervalo de uma semana** entre si, sendo que no caso de alguma indisponibilidade por parte do participante estas podem ser reagendadas. Também ser-lhe-á pedido que no dia antes de cada ensaio evite exercício físico intenso, ingestão de álcool e ingestão de alimentos especialmente ricos em fibra na refeição do jantar (cereais integrais e hortícolas em abundância). É-lhe também recomendado que na véspera dos dias dos ensaios a refeição do jantar seja o mais semelhante possível ao habitual, realizada por volta das 20 horas, e que não ingira alimentos ou bebidas desde o jantar até ao momento do ensaio.

As sessões terão início entre as 8h00 e as 9h30, e teriam a duração de 120 minutos aproximadamente. O início do ensaio começa com a realização de duas leituras da glicémia capilar, seguido do preenchimento de um questionário sobre a avaliação da saciedade, tipo Escala Visual Analógica (VAS). Posteriormente, num período de 12 a 15 minutos, procede-se ao consumo da amostra teste. As restantes leituras e a VAS, após a ingestão da amostra teste, são repetidas aos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos.

Serão realizados 3 ensaios:

- 1º Ensaio: consumir 2 bolachas, que contêm na sua composição farinha de feijão, com 250 mL de água,
- 2º Ensaio: consumir 2 bolachas, de farinha de trigo, com 250 mL de água
- 3º Ensaio: consumir uma amostra referência de 50g de glicose anidra dissolvida em 250 mL de água,

Os 3 ensaios serão realizados com intervalos de uma semana.

Os dados pessoais dos participantes serão confidenciais e tratados em anonimato sendo o seu registo efetuado sob a forma de um código que lhe será atribuído. Os investigadores que têm acesso aos seus dados pessoais estão sujeitos a sigilo profissional. Caso pretenda, os seus dados ser-lhe-ão disponibilizados no final de cada sessão. Não haverá qualquer custo ou pagamento inerentes à participação neste estudo.

Este trabalho insere-se no trabalho de investigação no âmbito da minha Tese de Mestrado em Controlo de Qualidade e Toxicologia dos Alimentos. Antes de participar no estudo deverá assinar o Termo de Consentimento Informado.

Agradeço desde já a atenção dada a este documento.

Verónica Correia

Estudante de Mestrado em Controlo de Qualidade e Toxicologia dos Alimentos - FFUL

Licenciada em Bioquímica - FCUP e ICBAS

Tlm.: 913625934

E-mail: vero_correi@hotmail.com

Estefânia - Lisboa

Anexo 3. Consentimento informado

CONSENTIMENTO INFORMADO

Título do estudo: EFEITO DA INGESTÃO DE BOLACHAS COM FARINHA DE FEIJÃO NA RESPOSTA GLICÊMICA

Assegura-se a anonimização dos dados pessoais bem como a confidencialidade dos resultados obtidos.

Poderá, a qualquer momento, retirar a sua permissão para participar no estudo, sem quaisquer consequências.

Fui informado dos objetivos do estudo, compreendi o que me foi explicado e aceito participar no estudo.

_____ Data: ____/____/____
Assinatura do participante

_____ Data: ____/____/____
Assinatura do responsável

Anexo 4. Ficha individual do participante do ensaio in vivo

FICHA INDIVIDUAL

NOME: _____ DATA: ____/____/____

E-MAIL: _____ TELEFONE: _____

DATA DE NASCIMENTO: _____

PESO: _____ ALTURA: _____

CÓDIGO (A PREENCHER PELO RESPONSÁVEL): _____

Requisitos:

Idade compreendida entre 18 e 36 anos		
Índice de massa corporal igual ou superior a 18,5Kg ^m - ²		
Peso estável nos últimos 3 meses		
Não ter diagnóstico médico de diabetes ou outras doenças endócrinas		
Não ter história clínica de doença gastrointestinal ou distúrbios endócrinos		
Não estar a tomar medicamentos que interfiram com o metabolismo glicídico ou lipídico		
Não ter estado internado nos últimos 3 meses		
Não estar grávida ou a amamentar		
Não ser fumador		
Efetuar regularmente a refeição do pequeno-almoço		

Obrigada pela sua participação!

Anexo 6. Teores de amido resistente em feijão cru (matéria seca)

Amostra		Origem; Ano	AR (g/100 g)		Média	Desvio padrão
579	Bloco 3	Córdoba; 2015	71,86	71,70	74,32	2,55
	Bloco 4		77,17	76,54		
583	Bloco 3	Córdoba; 2015	43,33	43,62	49,40	6,5183
	Bloco 4		51,48	59,16		
584	Bloco 4	Córdoba; 2015	55,23	57,89	56,56	1,33
587	Bloco 3	Córdoba; 2015	51,18	48,73	49,96	1,22
592	Bloco 3	Córdoba; 2015	71,23	75,35	70,89	2,8040
	Bloco 4		68,51	68,49		
600	Bloco 1	Sintra; 2014	33,42	35,04	35,42	1,5444
	Bloco 2		35,45	37,74		
601	Bloco 3	Córdoba; 2015	61,08	63,84	57,95	4,62
	Bloco 4		53,56	53,31		
602	Bloco 2	Sintra; 2014	33,74	33,73	33,74	0,00
620	Bloco 4	Córdoba; 2015	58,32	55,50	56,91	1,41
632	Bloco 3	Córdoba; 2015	66,73	78,77	59,73	13,89
	Bloco 4		43,51	49,90		
635	Bloco 3	Córdoba; 2015	50,89	53,06	54,55	2,71
	Bloco 4		56,60	57,63		
638	Bloco 3	Córdoba; 2015	56,48	56,57	58,88	2,79
	Bloco 4		63,35	59,11		
639	Bloco 3	Córdoba; 2015	60,26	59,18	58,60	1,19
	Bloco 4		57,55	57,39		
645	Bloco 1	Sintra; 2014	30,92	32,53	32,73	3,71
	Bloco 2		27,84	30,41		
	Bloco 4	Córdoba; 2015	39,28	35,41		
654	Bloco 1	Sintra; 2014	31,16	29,12	36,24	4,53
	Bloco 2		34,55	33,44		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	38,25	40,90		
	Bloco 4		41,80	40,73		
667	Bloco 1	Sintra; 2014	30,20	31,19	31,27	1,21
	Bloco 2		30,41	33,26		
670	Bloco 1	Sintra; 2014	28,50	28,31	31,94	4,82

	Bloco 2		25,60	27,32		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	32,80	38,07		
	Bloco 4		37,14	37,76		
671	Bloco 3	Córdoba; 2015	29,78	29,93	28,36	2,16
	Bloco 4		24,67	29,08		
698	Bloco 1	Sintra; 2014	31,76	32,43	34,13	4,33
	Bloco 2		31,49	29,53		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	31,09	34,21		
	Bloco 4		42,22	40,34		
706	Bloco 1	Sintra; 2014	30,15	29,31	34,14	5,52
	Bloco 2		27,31	28,03		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	39,40	39,60		
	Bloco 4		38,62	40,73		
735	Bloco 4	Córdoba; 2015	67,57	70,92	69,25	1,67
737	Bloco 1	Sintra; 2014	24,47	30,74	29,09	1,99
	Bloco 2		29,49	29,24		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	28,29	28,83		
	Bloco 4		30,22	31,40		
1631	Bloco 1	Sintra; 2014	31,74	32,21	40,10	10,83
	Bloco 2		33,04	32,80		
	Bloco 4	Córdoba; 2015	55,12	55,67		
1636	Bloco 1	Sintra; 2014	35,68	33,00	39,87	8,30
	Bloco 2		31,17	28,53		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	48,42	51,79		
	Bloco 4		47,51	42,85		
1644	Bloco 1	Sintra; 2014	23,30	28,26	24,00	2,20
	Bloco 2		23,56	25,18		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	24,48	23,54		
	Bloco 4		19,75	23,94		
1653	Bloco 1	Sintra; 2014	32,23	33,90	39,22	11,30
	Bloco 2		30,82	28,32		
	Bloco 4	Córdoba; 2015	55,69	54,35		
1654	Bloco 1	Sintra; 2014	31,88	30,20	29,50	2,16
	Bloco 2		26,10	25,83		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	30,21	31,34		
	Bloco 4		30,96	29,50		
1662	Bloco 1	Sintra; 2014	27,09	23,61	25,52	1,80
	Bloco 2		23,85	27,53		
1663	Bloco 1	Sintra; 2014	35,31	35,00	32,62	3,16

	Bloco 2		35,21	34,82		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	29,92	29,77		
	Bloco 4		34,37	26,56		
1867	Bloco 4	Córdoba; 2015	41,63	43,52	42,57	0,94
1871	Bloco 3	Córdoba; 2015	31,00	33,03	32,35	0,85
	Bloco 4		32,25	33,12		
1889	Bloco 3	Córdoba; 2015	39,99	37,20	38,12	2,26
	Bloco 4		40,43	34,85		
1926	Bloco 3	Córdoba; 2015	64,82	63,14	61,81	2,36
	Bloco 4		58,64	60,63		
1932	Bloco 3	Córdoba; 2015	51,49	51,03	51,26	0,23
1933	Bloco 3	Córdoba; 2015	64,36	65,15	59,80	5,34
	Bloco 4		57,62	52,06		
1938	Bloco 3	Córdoba; 2015	63,60	63,54	64,50	1,61
	Bloco 4		67,29	63,57		
1943	Bloco 3	Córdoba; 2015	34,04	37,26	38,40	2,98
	Bloco 4		41,23	41,06		
1952	Bloco 3	Córdoba; 2015	29,35	29,15	48,17	18,94
	Bloco 4		66,12	68,07		
1955	Bloco 1	Sintra; 2014	20,94	23,89	34,10	7,99
	Bloco 2		31,48	32,07		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	42,40	41,56		
	Bloco 4		36,92	43,55		
1966	Bloco 1	Sintra; 2014	36,03	36,55	30,18	5,50
	Bloco 2		34,45	34,89		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	27,59	25,42		
	Bloco 4		22,45	24,08		
1975	Bloco 1	Sintra; 2014	33,09	32,89	28,03	3,45
	Bloco 2		29,26	28,36		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	25,58	22,27		
	Bloco 4		26,16	26,62		
1976	Bloco 1	Sintra; 2014	31,59	29,80	38,90	9,75
	Bloco 2		34,35	32,90		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	36,17	36,48		
	Bloco 4		59,31	50,63		
1984	Bloco 1	Sintra; 2014	30,05	29,86	29,80	3,10
	Bloco 2		34,21	34,23		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	26,34	27,23		
	Bloco 4		30,92	25,57		
2081	Bloco 1	Sintra; 2014	27,12	28,86	27,79	0,68

	Bloco 2		27,31	27,88		
2126	Bloco 1	Sintra; 2014	31,82	33,63	32,00	0,98
	Bloco 2		31,04	31,52		
2155	Bloco 1	Sintra; 2014	27,19	30,25	30,91	2,44
	Bloco 2		33,04	33,15		
2159	Bloco 3	Córdoba; 2015	59,78	58,75	59,41	2,85
	Bloco 4		63,55	55,57		
2179	Bloco 1	Sintra; 2014	21,86	22,45	30,71	5,29
	Bloco 2		30,73	31,55		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	33,30	33,45		
	Bloco 4		37,34	34,98		
2192	Bloco 1	Sintra; 2014	26,82	25,61	26,49	0,55
	Bloco 2		27,08	26,46		
4048	Bloco 1	Sintra; 2014	29,64	31,62	40,01	10,11
	Bloco 2		28,53	30,03		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	48,47	50,52		
	Bloco 4		50,43	50,83		
4049	Bloco 1	Sintra; 2014	21,63	23,57	34,00	10,46
	Bloco 2		25,51	25,04		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	45,49	39,69		
	Bloco 4		41,67	49,42		
4050	Bloco 1	Sintra; 2014	21,53	25,44	31,29	6,74
	Bloco 2		28,93	24,23		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	37,21	33,84		
	Bloco 4		39,36	39,78		
4051	Bloco 1	Sintra; 2014	34,87	33,75	36,55	5,06
	Bloco 2		31,52	33,46		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	33,12	35,43		
	Bloco 4		44,86	45,34		
4070	Bloco 1	Sintra; 2014	21,23	21,19	29,50	7,94
	Bloco 2		24,42	23,20		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	44,77	30,74		
	Bloco 4		34,71	35,78		
4071	Bloco 1	Sintra; 2014	35,61	35,80	41,60	6,85
	Bloco 2		34,93	34,09		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	44,91	53,10		
	Bloco 4		46,96	47,37		
4072	Bloco 1	Sintra; 2014	37,28	37,94	39,01	0,87
	Bloco 2		38,97	39,39		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	39,83	39,95		
	Bloco 4		39,48	39,21		

4073	Bloco 3	Córdoba; 2015	30,59	30,66	34,42	4,35
	Bloco 4		35,21	41,23		
4081	Bloco 2	Sintra; 2014	29,76	31,49	37,88	5,19
	Bloco 3	Córdoba; 2015	42,48	40,43		
	Bloco 4		41,96	41,16		
	Bloco 1	Sintra; 2014	31,20	31,96		
4085	Bloco 2	Córdoba; 2015	32,14	32,20	35,17	4,68
	Bloco 3		42,19	41,35		
	Bloco 1		Sintra; 2014	25,19		
4088	Bloco 2	Córdoba; 2015	33,49	31,97	33,46	5,65
	Bloco 3		32,66	32,88		
	Bloco 4	43,45	40,49			
	Bloco 1	Sintra; 2014	27,50	30,74		
4097	Bloco 2	Córdoba; 2015	30,82	30,79	41,12	11,22
	Bloco 3		52,02	53,56		
	Bloco 4		52,37	51,18		
	Bloco 1		Sintra; 2014	34,35		
4100	Bloco 2	Córdoba; 2015	30,33	29,28	37,30	6,25
	Bloco 3		43,97	45,35		
	Bloco 4		40,40	43,33		
	Bloco 1		Sintra; 2014	32,51		
4108	Bloco 2	Córdoba; 2015	32,25	33,11	40,63	8,21
	Bloco 3		48,29	47,81		
	Bloco 4	50,60	48,51			
	Bloco 1	Sintra; 2014	30,82	26,91		
4119	Bloco 2	Córdoba; 2015	20,79	17,87	28,76	6,10
	Bloco 3		30,02	35,19		
	Bloco 4		35,79	32,68		
	Bloco 2		Sintra; 2014	21,31		
4120	Bloco 3	Córdoba; 2015	37,67	38,93	33,10	8,24
	Bloco 4		35,98	42,47		
	Bloco 1		Sintra; 2014	43,19		
4127	Bloco 2	Córdoba; 2015	27,97	30,12	40,97	7,99
	Bloco 3		45,06	52,05		
	Bloco 4		38,28	49,47		
	Bloco 1		Sintra; 2014	44,21		
4133	Bloco 2	Córdoba; 2015	39,03	39,04	39,86	2,16
	Bloco 3		42,78	38,53		
	Bloco 4		37,97	39,05		
	Bloco 1		Sintra; 2014	44,21		

4150	Bloco 1	Sintra; 2014	32,26	32,55	34,64	1,65
	Bloco 2		33,45	35,33		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	34,95	36,98		
	Bloco 4		36,68	34,92		
4164	Bloco 3	Córdoba; 2015	44,46	44,45	45,12	0,80
	Bloco 4		46,42	45,16		
4182	Bloco 1	Sintra; 2014	31,89	32,81	36,67	5,49
	Bloco 2		30,08	31,14		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	44,28	39,13		
	Bloco 4		44,04	40,02		
4185	Bloco 1	Sintra; 2014	30,04	29,36	49,24	13,84
	Bloco 3	Córdoba; 2015	59,65	57,23		
	Bloco 4		59,57	59,57		
4189	Bloco 1	Sintra; 2014	36,89	36,22	42,19	6,52
	Bloco 2		36,85	39,09		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	48,58	56,13		
	Bloco 4		43,10	40,67		
4195	Bloco 3	Córdoba; 2015	48,81	47,00	45,88	3,006
	Bloco 4		46,87	40,84		
4295	Bloco 1	Sintra; 2014	26,98	22,59	35,88	9,97
	Bloco 2		25,95	28,65		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	46,31	45,15		
	Bloco 4		45,66	45,74		
4300	Bloco 3	Córdoba; 2015	36,74	35,79	35,90	0,96
	Bloco 4		34,37	36,69		
5249	Bloco 1	Sintra; 2014	29,57	29,90	32,10	2,92
	Bloco 2		29,88	30,70		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	31,26	31,89		
	Bloco 4		38,49	35,06		
5285	Bloco 1	Sintra; 2014	23,64	28,56	31,15	5,75
	Bloco 2		25,36	27,98		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	33,01	31,03		
	Bloco 4		38,31	41,32		
5286	Bloco 1	Sintra; 2014	30,75	30,97	35,09	6,99
	Bloco 2		25,01	28,19		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	46,62	42,20		
	Bloco 4		38,25	38,69		
5287	Bloco 1	Sintra; 2014	27,29	29,95	29,68	3,82
	Bloco 2		30,83	31,89		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	33,51	35,34		

	Bloco 4		24,65	23,96		
5288	Bloco 1	Sintra; 2014	34,46	31,35	45,91	9,51
	Bloco 3	Córdoba; 2015	55,22	54,84		
	Bloco 4		48,51	51,09		
5289	Bloco 3	Córdoba; 2015	63,46	61,62	62,54	0,92
5290	Bloco 2	Sintra; 2014	32,30	34,60	33,45	1,15
5291	Bloco 1	Sintra; 2014	25,88	25,97	40,21	10,28
	Bloco 3	Córdoba; 2015	43,44	48,37		
	Bloco 4		48,28	49,35		
5292	Bloco 1	Sintra; 2014	35,01	31,23	37,50	3,78
	Bloco 2		35,73	34,43		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	40,94	38,36		
	Bloco 4		42,48	41,81		
5295	Bloco 1	Sintra; 2014	28,26	29,67	38,87	12,97
	Bloco 2		30,23	30,70		
	Bloco 4	Córdoba; 2015	58,13	56,20		
5296	Bloco 1	Sintra; 2014	28,51	28,69	42,15	15,99
	Bloco 2		33,34	33,19		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	65,51	63,66		
5297	Bloco 3	Córdoba; 2015	49,94	44,72	48,20	3,65
	Bloco 4		53,34	44,79		
5298	Bloco 1	Sintra; 2014	35,37	35,60	41,72	10,26
	Bloco 2		27,84	29,38		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	48,75	48,82		
	Bloco 4		51,07	56,95		
5300	Bloco 1	Sintra; 2014	30,85	30,47	38,08	8,25
	Bloco 2		31,35	28,84		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	44,31	41,13		
	Bloco 4		52,23	45,45		
5302	Bloco 1	Sintra; 2014	31,51	30,00	31,73	1,93
	Bloco 2		29,38	31,27		
	Bloco 4	Córdoba; 2015	35,19	33,02		
5307	Bloco 1	Sintra; 2014	29,87	32,08	31,03	0,87
	Bloco 2		31,60	30,55		
5363	Bloco 1	Sintra; 2014	32,60	34,22	35,60	2,08
	Bloco 2		37,19	33,87		

	Bloco 3	Córdoba; 2015	37,72	38,78		
	Bloco 4		33,91	36,49		
5365	Bloco 2	Sintra; 2014	33,70	-	33,70	0,00
5366	Bloco 1	Sintra; 2014	29,48	30,24	32,06	2,75
	Bloco 2		32,59	30,42		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	33,13	37,27		
	Bloco 4		34,78	28,60		
5367	Bloco 1	Sintra; 2014	34,46	25,87	42,19	10,75
	Bloco 3	Córdoba; 2015	38,82	42,97		
	Bloco 4		56,27	54,73		
5368	Bloco 4	Córdoba; 2015	64,10	57,30	60,70	3,40
5369	Bloco 1	Sintra; 2014	24,37	32,56	31,60	3,53
	Bloco 2		31,94	32,35		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	34,60	37,18		
	Bloco 4		30,00	29,79		
5370	Bloco 1	Sintra; 2014	29,75	33,77	36,91	7,43
	Bloco 2		30,87	33,11		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	48,44	50,23		
	Bloco 4		36,54	32,56		
5371	Bloco 1	Sintra; 2014	31,21	36,19	44,56	15,33
	Bloco 2		35,74	32,10		
	Bloco 4	Córdoba; 2015	67,30	64,83		
5376	Bloco 1	Sintra; 2014	27,79	31,52	52,56	16,27
	Bloco 3	Córdoba; 2015	63,94	64,67		
	Bloco 4		65,49	61,95		
5377	Bloco 1	Sintra; 2014	30,42	30,39	43,27	13,14
	Bloco 2		32,44	27,94		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	56,36	58,82		
	Bloco 4		57,69	52,08		
5378	Bloco 1	Sintra; 2014	31,08	30,40	37,87	9,78
	Bloco 2		33,93	33,97		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	54,17	55,08		
	Bloco 4		33,63	30,66		
5379	Bloco 1	Sintra; 2014	34,84	34,51	43,25	10,40
	Bloco 2		31,78	31,69		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	55,72	55,11		
	Bloco 4		55,11	47,20		

5380	Bloco 1	Sintra; 2014	32,07	31,20	30,11	1,57
	Bloco 2		28,96	28,23		
5381	Bloco 1	Sintra; 2014	33,27	32,40	31,89	1,02
	Bloco 2		31,30	30,60		
Tarrestre	Bloco 1	Sintra; 2014	32,40	-	41,33	8,11
	Bloco 2		34,83	-		
	Bloco 3	Córdoba; 2015	38,72	37,55		
	Bloco 4		54,85	49,63		

Anexo 7. Identificação de compostos voláteis nas bolachas e massas desenvolvidas analisadas por SPME-GC/MS

TR: Tempo de Retenção (min); IS: Índice de Semelhança; min: minutos; IRL: Índice de Retenção Linear; (x): presente na amostra; (-): não encontrado/não se aplica.

# pico	TR (min)	Nome do composto	IS	IRL ¹	IRL (literatura) ²	BF	BT	MF	MT	Descritor aromático ³
1	8,385	Tolueno	97	1036	1043.09	x	x	x	x	Doce
2	9,789	Hexanal	94	1081	1078	x	x	x	x	fresco, verde, gorduroso, aldeído, erva, folhagem, frutado, adocicado
3	10,399	2-Metilpropanol	96	1100	1116		x		x	etéreo, vinho
4	11,182	2-Pentanol	97	1125	1112		x		x	verde, combustível, oleoso, fermentado
5	11,365	1-Metoxi-2-propanol	97	1131	1160				x	-
6	11,692	o-Xileno	96	1141	1185	x		x		floral (gerânio)
7	11,817	2-Propilfurano	97	1145	1011	x		x		-
8	11,818	1-Butanol	95	1045	1150	x			x	combustível, oleoso, doce, balsâmico, whiskey
9	12,335	1-Penten-3-ol	95	1161	1157	x	x			picante, rábano, verde, legume, frutado, tropical
10	13,061	2-Heptanona	96	1184	1184	x	x	x		frutado, picante, doce, herbal, coco, madeira
11	13,551	L-Limoneno	92	1200	1189			x	x	terpeno, pinho, herbal, apimentado
12	14,234	(E)-2-Hexenal	95	1222	1216		x			verde, banana, aldeído, gorduroso, queijo

¹ <http://www.pherobase.com/>

² <http://webbook.nist.gov/>

³ <http://www.thegoodscentscompany.com/>

13	14,411	2-Etoxibutano	91	1227	734					x	-	
14	14,677	2-Pentilfurano	92	1236	1235	x	x				frutado, verde, terroso, feijão, vegetal, metálico	
15	15,171	1-Pentanol	95	1251	1255	x	x	x	x		combustível, oleoso, doce, balsâmico	
16	16,190	1,2,3-Trimetilbenzeno	97	1284	1329					x	-	
17	16,259	3-Hidroxi-2-butanona	96	1286	1280					x	doce, amanteigado, cremoso, leitoso, gorduroso	
18	17,289	2-Heptanol	90	1319	1468		x			x	mofado, folhagem, violeta, herbal, verde, doce, madeira, floral (peônia)	
19	17,323	2,5-Dimetilpirazina	93	1320	1323	x					cacau, assado, noz, bife, madeira, erva, medical	
20	18,231	1-Hexanol	96	1349	1359	x	x	x	x		etéreo, combustível, oleoso, frutado, alcoólico, doce, verde	
21	18,873	1-Hidroxi-2-butanona	95	1370	1395	x				x	doce, café, mofado, cereais, malte, caramelo	
22	19,121	(Z)-3-Hexen-1-ol	97	1378	1258	x					fresco, verde, erva, folhagem, vegetal, herbal, oleoso	
23	19,368	2-Nonanona	97	1386	1386	x	x	x	x		frutado, doce, ceroso, ensaboadado, queijo, verde, herbal, coco	
24	20,438	3-Furaldeído	94	1424	1455			x			-	
25	20,943	1-Octen-3-ol	94	1443	1442	x	x	x	x		cogumelo, terroso, verde, oleoso, fungo, cru, frango	
26	21,073	1-Heptanol	95	1448	1468	x	x	x	x		mofado, folhagem, violeta, herbal, verde, doce, madeira, floral (peônia)	
27	21,570	Éter metílico de dipropilenoglicol	96	1466	1479					x	x	-
28	22,002	2-Etil-1-hexanol	98	1482	1484	x	x	x	x			citrino, fresco, floral, oleoso, doce
29	22,245	2,4 Heptadienal	91	1491	1468			x				verde, picante, frutado, especiarias
30	22,874	1-(2-Metoxipropoxi)-2-propanol	90	1515	1532						x	-
31	23,002	Benzaldeído	94	1520	1508	x	x	x				forte, doce, amargo, amêndoa, cereja
32	23,325	(E)-2-Nonenal	92	1532	1542	x	x	x	x			gorduroso, verde, pepino, aldeído, citrino

33	24,888	2-Undecanona	96	1592	1296.35	x			ceroso, frutado, cremoso, gorduroso, floral (lírio)
34	25,162	Dihidro-5-metil-2(3H)-furanona	91	1603	1619		x		-
35	25,598	Butirolactona	97	1624	1635	x	x	x	cremoso, oleoso, gorduroso, caramelo
36	26,241	1-Nonanol	94	1654	1666		x		fresco, limpo, gorduroso, floral, rosa, laranja, poeirento, molhado, oleoso
37	26,488	Ácido butanoico	97	1666	1641		x		forte, acético, queijo, amanteigado, frutado
38	28,315	Naftaleno	96	1753	1712	x	x		picante, seco, resinoso
39	28,458	Acetamida	90	1748	1764	x		x	suave
40	28,546	2-Undecenal	92	1751	1755		x	x	fresco, frutado, casca da laranja
41	29,448	Tetrahydro-6-metil-2H-piran-2-ona	94	1786	1792	x			cremoso, frutado, coco
42	29,470	3,7,11,15-Tetrametil-1-hexadecanol	91	1786	2537			x	-
43	29,809	2-Tridecanona	95	1799	1814	x			gorduroso, ceroso, laticínios, coco, noz, herbal, terroso
44	29,868	(E,E)-2,4-Decadienal	92	1803	1819	x		x	oleoso, pepino, melão, citrino, abóbora, noz
45	31,143	Álcool benzílico	96	1884	1820	x	x		floral, rosa, fenólico, balsâmico, frutado, químico
46	31,591	Dimetilsulfona	90	1912	1912	x			sulfuroso, queimado
47	31,759	Álcool feniletílico	92	1923	1901	x	x	x	doce, floral, fresco, pão, rosa, mel
48	32,576	Tetrahydro-6-propil-2H-piran-2-ona	93	1975	1977	x			doce, gorduroso, coco, tropical, laticínios

Anexo 8. Identificação de compostos voláteis em amostras de farinha de feijão cru analisadas por SPME-GC/MS

TR: Tempo de Retenção (min); IS: Índice de Semelhança; min: minutos; IRL: Índice de Retenção Linear; NI: Não Identificado; (-): não encontrado/não se aplica.

# pico	TR (min)	Família do composto	Nome do composto	IS (%)	LRI ¹	LRI (literatura) ²	Descritor aromático ³
1	7,980	Cetona	1-Penten-3-ona	92	1023	1056	-
2	8,527	Hidrocarboneto	Tolueno	90	1041	1037	doce
3	9,000	-	NI	-	-	-	-
4	9,335	-	2,3-Pentanodiona	96	1066	1062	picante, doce, amanteigado, cremoso, caramelo, noz, queijo
5	9,352	-	NI	-	-	-	-
6	9,602	-	NI	-	-	-	-
7	10,259	-	NI	-	-	-	-
8	10,625	Álcool	3-Metilpropanol	88	1107	1092	etéreo, vínico
9	10,749	-	NI	-	-	-	-
10	11,046	-	NI	-	-	-	-
11	11,095	Hidrocarboneto	Etilbenzeno	93	1122	1126	-
12	11,350	-	NI	-	-	-	-
13	11,507	Hidrocarboneto	NI	-	-	-	-
14	11,528	Hidrocarboneto	<i>o</i> -Xileno	94	1138	1189	floral (gerânio)
15	12,165	-	NI	-	-	-	-
16	12,294	-	NI	-	-	-	-
17	12,571	-	NI	-	-	-	-

¹ <http://www.pherobase.com/>

² <http://webbook.nist.gov/>

³ <http://www.thegoodscentscompany.com/>

18	12,639	-	NI	-	-	-	-
19	12,800	Álcool	1-Penten-3-ol	96	1173	1157	picante, rábano, verde, legume, frutado, tropical
20	13,000	-	NI	-	-	-	-
21	13,170	Cetona	2-Heptanona	97	1188	1184	frutado, picante, doce, herbal, coco, madeira
22	13,208	-	NI	-	-	-	-
23	13,522	-	NI	-	-	-	-
24	13,602	-	NI	-	-	-	-
25	13,727	Álcool	Eucaliptol	96	1205	1211	eucalipto, herbal, madeira (cânfora)
26	13,844	-	NI	-	-	-	-
27	14,026	-	NI	-	-	-	-
28	14,185	-	NI	-	-	-	-
29	14,339	Aldeído	(E)-2-Hexenal	95	1225	1216	verde, banana, aldeído, gorduroso, queijo
30	14,523	Furano	2-Pentilfurano	92	1231	1235	frutado, verde, terroso, feijão, vegetal, metálico
31	14,691	Éster	Ácido hexanóico, éster etílico	95	1236	1246	-
32	14,823	-	NI	-	-	-	-
33	15,277	-	NI	-	-	-	-
34	15,318	Cetona	3-Octanona	96	1256	1261	fresco, herbal, lavanda, doce, cogumelo
35	15,360	-	NI	-	-	-	-
36	15,445	Álcool	1-Pentanol	90	1262	1250	-
37	15,502	Álcool	3-Metil-3-buten-1-ol	93	1260	1255	combustível, oleoso, doce, balsâmico
38	15,735	-	NI	-	-	-	-
39	15,875	-	NI	-	-	-	-
40	15,936	-	NI	-	-	-	-
41	16,168	Éster	Ácido acético, éster hexílico	97	1276	1276	-
42	16,223	-	NI	-	-	-	-

43	16,360	Cetona	2-Octanona	93	1291	1296.35	terroso, erva, natural, madeira, herbal
44	16,450	Cetona	3-Hidroxi-2-butanona				
45	16,538	Aldeído	3-Hidroxibutanal				
46	16,657	-	NI	-	-	-	-
47	16,885	Cetona	1-Octen-3-ona	93	1306	1317	herbal, cogumelo, terroso, mofo, sujo
48	16,925	-	NI	-	-	-	-
49	16,977	-	NI	-	-	-	-
50	17,068	-	NI	-	-	-	-
51	17,121	-	NI	-	-	-	-
52	17,275	Álcool	Ciclopentanol	93	1319	1300	-
53	17,377	Álcool	(E)-2-Penten-1-ol	90	1322	1301	cogumelo
54	17,512	Álcool	(Z)-2-Pentenol	93	1326	1322	verde, plástico, etéreo, frutado
55	17,593	Aldeído	(Z)-2-Heptenal	94	1329	1319	-
56	17,601	-	NI	-	-	-	-
57	17,722	Cetona	(Z)-6-Octen-2-ona	89	-	-	-
58	17,883	-	NI	-	-	-	-
59	17,969	-	NI	-	-	-	-
60	18,121	-	NI	-	-	-	-
61	18,252	Éster	Formiato de hexila	95	1354	1382	maçã, ameixa, banana, doce
62	18,480	-	NI	-	-	-	-
63	18,622	-	NI	-	-	-	-
64	18,733	-	NI	-	-	-	-
65	18,882	-	NI	-	-	-	-
66	19,067	-	NI	-	-	-	-
67	19,176	-	NI	-	-	-	-
68	19,320	-	NI	-	-	-	-
69	19,422	Cetona	2-Nonanona	89	1388	1386	frutado, doce, ceroso, ensaboado, queijo, verde, herbal, coco

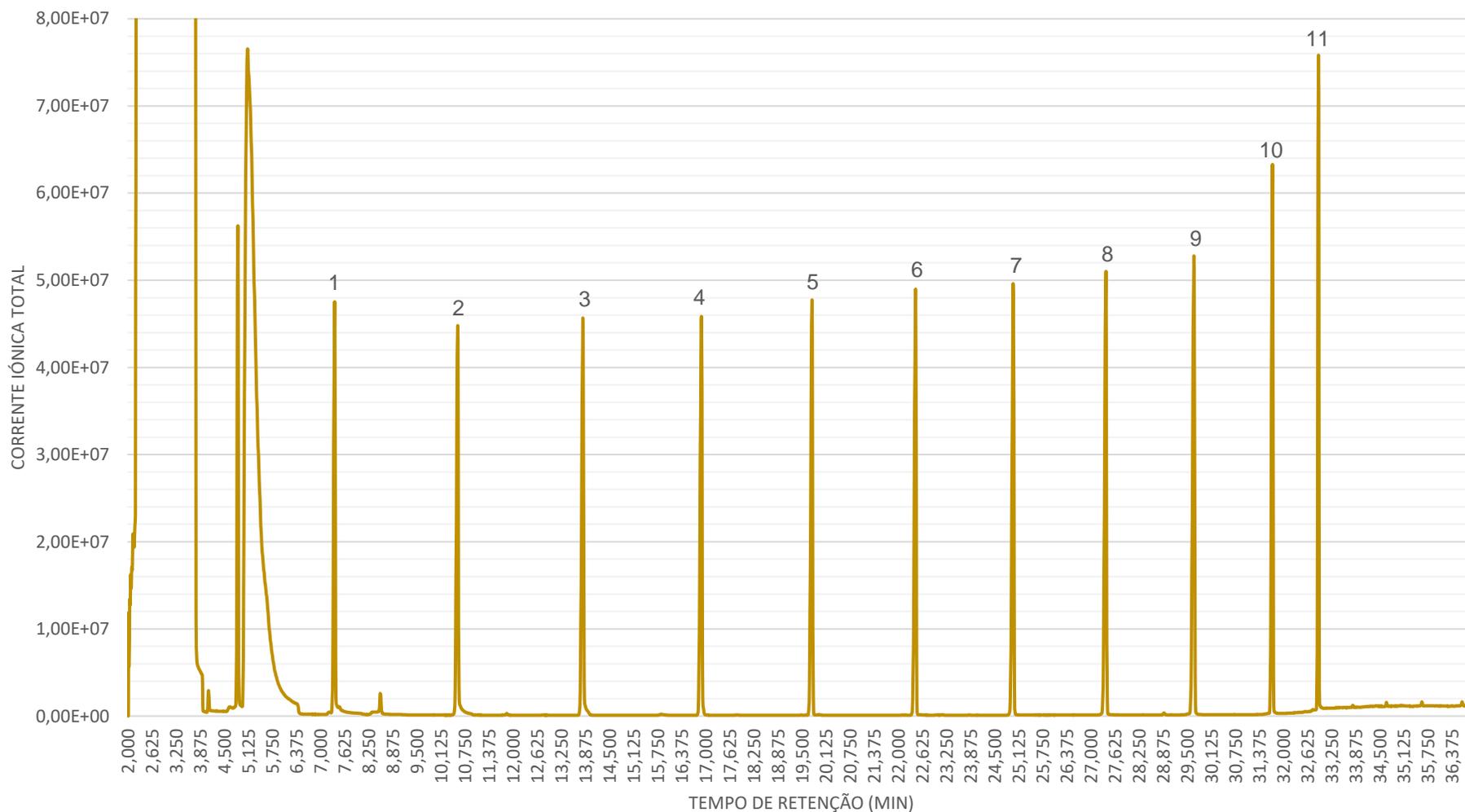
70	19,543	Álcool	3-Octanol	91	1392	1396	terroso, cogumelo, lacticínios, mofado, cremoso, ceroso, fermentado, verde, menta
71	19,704	-	NI	-	-	-	-
72	19,829	-	NI	-	-	-	-
73	20,062	Álcool	(Z)-4-Hexen-1-ol	95	1410	1422	verde, cozinhado, vegetal, tomate, gasoso
74	20,162	Álcool	(Z)-2-Hexen-1-ol	93	1414	1410	mais fresco que o (E)-2-hexenol, verde, folhagem, frutado
75	20,246	-	NI	-	-	-	-
76	20,338	-	NI	-	-	-	-
77	20,495	-	NI	-	-	-	-
78	20,615	Aldeído	(E)-2-Octenal	95	1430	1434	fresco, pepino, gorduroso, verde, herbal, banana, ceroso, folhagem
79	20,703	Hidrocarboneto	1,2,3,4-Tetrametilbenzeno	93	1435	1430	-
80	20,807	-	NI	-	-	-	-
81	20,922	-	NI	-	-	-	-
82	21,099	Álcool	1-Octen-3-ol	91	1449	1442	cogumelo, terroso, verde, oleoso, fungo, cru, frango
83	21,215	Álcool	1-Heptanol	97	1453	1468	mofado, folhagem, violeta, herbal, verde, doce, madeira, floral (peônia)
84	21,388	Pirazina	2-Etil-3,5-dimetilpirazina	91	1459	1464	noz
85	21,484	-	NI	-	-	-	-
86	21,515	-	NI	-	-	-	-
87	21,700	-	NI	-	-	-	-
88	21,809	-	NI	-	-	-	-
89	21,928	-	NI	-	-	-	-
90	22,050	-	NI	-	-	-	-
91	22,134	-	NI	-	-	-	-
92	22,362	-	NI	-	-	-	-
93	22,504	-	NI	-	-	-	-
94	22,594	Cetona	2-Decanona	91	1482	1493	laranja, floral, gorduroso, pêsego

95	22,649	-	NI	-	-	-	-
96	22,815	-	NI	-	-	-	-
97	22,999	-	NI	-	-	-	-
98	23,005	-	NI	-	-	-	-
99	23,286	-	NI	-	-	-	-
100	23,420	-	NI	-	-	-	-
101	23,640	Álcool	Linalol	91	1545	1552	citrino, floral, doce, pau-rosa, madeira, verde, mirtilo
102	23,756	Ácido orgânico	Ácido acético	-	-	-	-
103	23,869	-	NI	-	-	-	-
104	24,084	-	NI	-	-	-	-
105	24,268	Cetona	3,5-Octadien-2-ona	-	-	-	-
106	24,360	Álcool	Butano-2,3-diol	97	1572	1580	frutado, cremoso, amanteigado
107	24,875	-	NI	-	-	-	-
108	25,079	-	NI	-	-	-	-
109	25,173	-	NI	-	-	-	-
110	25,255	-	NI	-	-	-	-
111	25,447	-	NI	-	-	-	-
112	25,853	-	NI	-	-	-	-
113	25,956	-	NI	-	-	-	-
114	26,112	Álcool	Mentol	92	1641	1653	mentol, mofado, madeira, floral (cânfora)
115	26,553	-	NI	-	-	-	-
116	26,710	Hidrocarboneto	Metilsulfanilmetilbenzeno	93	1679	1665	assado, queimado, bife, porco, cordeiro, frango
117	26,946	Álcool	3-Furanometanol	93	1687	1684	-
118	26,954	Álcool	(Z)-3-Nonen-1-ol	89	1689	1682	fresco, ceroso, verde, casca de melão, tropical, cogumelo
119	27,257	Aldeído	(E,E)-2,4-Nonadienal	88	1712	1797	gorduroso, noz, violeta, folhagem, fruta tropical
120	27,405	-	NI	-	-	-	-

121	27,599	-	NI	-	-	-	-
122	27,595	-	NI	-	-	-	-
123	28,014	Hidrocarboneto	1,2-Dimetoxibenzeno	91	1731	1706	-
124	28,689	-	NI	-	-	-	-
125	28,981	-	NI	-	-	-	-
126	29,720	-	NI	-	-	-	-
127	29,907	-	NI	-	-	-	-
128	30,220	-	NI	-	-	-	-
129	30,881	-	NI	-	-	-	-
130	31,173	-	NI	-	-	-	-
131	31,379	Álcool	Álcool benzílico	92	1894	1820	floral, rosa, fenólico, balsâmico, frutado, químico
132	31,927	Álcool	Álcool feniletílico	97	1933	1901	doce, floral, fresco, pão, rosa, mel
133	32,139	-	NI	-	-	-	-
134	32,236	-	NI	-	-	-	-
135	32,648	-	NI	-	-	-	-
136	33,041	-	NI	-	-	-	-
137	33,227	-	NI	-	-	-	-
138	33,292	-	NI	-	-	-	-

Negrito: variáveis utilizadas na ACP.

Anexo 9. Cromatograma referente à análise da solução padrão de alcanos C8-C20



Legenda: 1. C10, 2. C11, 3. C12, 4. C13, 5. C14, 6. C15, 7. C16, 8. C17, 9. C18, 10. C19 e 11. C20.