



MESTRADO EM CONTROLO DE QUALIDADE

Especialidade Águas e Alimentos

**Influência da germinação e
desidratação no perfil de aminoácidos
dos Feijões Andu e Mangalô do Peru**

Dissertação

Ana Sofia Silva Alves

Orientador(a): Prof. Doutora Beatriz Oliveira

Co-orientador(a): Prof. Doutora Rita Alves

Co-orientador(a): Mestre Susana Machado

Porto, novembro 2020

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

(Madre Teresa de Calcutá)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Professora Doutora Beatriz Oliveira, que desde o primeiro dia me orientou e me acompanhou. Deu-me a oportunidade de realizar este trabalho mostrando-se sempre disponível para me orientar, mostrando uma enorme competência e profissionalismo.

Um grande obrigado à professora Rita Alves, pela disponibilidade, orientação, competência, sempre com a maior simpatia.

À Susana Machado, obrigada pelo acompanhamento na parte laboratorial, por todo o interesse, entusiasmo, empenho e companheirismo que demonstrou.

A todas as colegas do laboratório, agradeço o bom ambiente de trabalho e espírito de entreatajuda.

A todos os meus amigos que me acompanharam neste percurso, obrigada por me transmitirem confiança e pelas palavras de incentivo.

Aos meus pais, pois sem eles nada disto seria possível. A quem devo tudo o que sou hoje. Obrigada por me transmitirem valores para a vida como a humildade, a perseverança e a determinação.

À minha irmã, por acreditar em mim, pelo incentivo, o meu braço direito em tudo. Obrigada por aturares as minhas fases menos boas.

Ao meu noivo, que esteve presente desde sempre, por me apoiar incondicionalmente, fazendo-me acreditar que tudo é possível e que vai correr tudo bem. Às suas mil tentativas de me animar obrigada.

Obrigada também à Faculdade de Farmácia, que tornou a concretização deste mestrado possível.

RESUMO

As leguminosas têm-se tornado cada vez mais interessantes na procura de fontes proteicas alternativas às proteínas animais, visto serem fontes de nutrientes e compostos bioativos. Estas são ricas em proteínas e aminoácidos, pelo que a sua introdução na alimentação humana, pode ajudar a combater a subnutrição proteica.

O consumo de leguminosas mostrou-se benéfico para a saúde devido à presença de metabolitos secundários que parecem ter atividade benéfica e protetora. No entanto, estes compostos provocam efeitos indesejados (fatores antinutricionais) que podem desincentivar o seu consumo. Estes podem ser eliminados através de tratamentos físicos, térmicos e biológicos, como a germinação.

O objetivo deste estudo consistiu em avaliar a influência de dois tipos de processamento, germinação e desidratação, no perfil de aminoácidos de duas espécies de feijão, o andu (*Cajanus cajan*) e o mangalô (*Phaseolus lunatus*) do Peru.

Para cada espécie em estudo, foram analisados os perfis de aminoácidos livres e totais, no estado de semente *in natura*, germinado e farinha desidratada de germinado. As amostras foram derivatizadas automaticamente e analisadas através de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC).

A soma dos aminoácidos totais da espécie *C. cajan*, no estado de semente, germinado e farinha desidratada de germinado, revelou que a amostra de farinha desidratada de germinado apresentava os teores mais elevados ($19,62 \pm 1,38$ g/100g de peso seco), comparativamente com a semente ($18,09 \pm 0,63$ g/100g de peso seco) e o germinado ($18,58 \pm 2,41$ g/100g de peso seco).

Os aminoácidos mais abundantes na espécie *P. lunatus* foram o ácido glutâmico, o ácido aspártico, a fenilalanina, a lisina e a arginina. Os aminoácidos menos abundantes foram a hidroxiprolina, a metionina e o triptofano. A amostra que apresentou maiores concentrações de aminoácidos totais foi a amostra germinada do feijão Mangalô. A amostra semente da espécie *P. lunatus* foi a que apresentou a menor percentagem de aminoácidos essenciais e a semente de *C. cajan* foi a que apresentou a maior percentagem de aminoácidos essenciais.

Em suma, a germinação mostrou-se eficiente no aumento dos teores de aminoácidos livres e totais das duas espécies de feijões Andu e Mangalô.

Palavras Chave: leguminosas, aminoácidos, HPLC, fatores antinutricionais, germinação.

ABSTRACT

Pulses have become increasingly interesting in the search for alternative protein sources to animal proteins, as they are sources of nutrients and bioactive compounds. They are rich in protein and amino acids, so their introduction into human food can help to combat protein malnutrition.

The consumption of legumes has been shown to be beneficial for health due to the presence of secondary metabolites which appear to have beneficial and protective activity. However, these compounds can cause undesirable effects (antinutritional factors) which may discourage their consumption. However, these can be eliminated through physical, thermal, or biological treatments such as germination.

The objective of this study was to evaluate the influence of two types of processing - germination and germination plus dehydration - on the amino acids profile of two bean species, the pigeon pea (*Cajanus cajan*) and the lima bean (*Phaseolus lunatus*) from Peru.

For each species under study, the profile of free and total amino acids was analysed, in the state of fresh seed, germinated and germinated flour. The samples were automatically derivatised and analysed by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC).

The sum of the total amino acids of the species *C. cajan*, in seed, germinated and germinated flour, showed that the germinated flour had the highest levels (19.62 ± 1.38 g/100g dry weight), compared to the seed (18.09 ± 0.63 g/100g dry weight) and the germinated sample (18.58 ± 2.41 g/100g dry weight).

The most abundant amino acids in *P. lunatus* species were glutamic acid, aspartic acid, phenylalanine, lysine, and arginine. The least abundant amino acids were hydroxyproline, methionine and tryptophan. The sample with the highest concentrations of total amino acids was the germinated sample from lima bean. The seed sample of *P. lunatus* was the one with the lowest percentage of essential amino acids and the seed of *C. cajan* had the highest percentage of essential amino acids.

In summary, germination has proved efficient in increasing the free and total amino acid levels of the two species of pigeon pea and lima bean.

Keywords: legumes, amino acids, HPLC, antinutritional factors, germination.

ÍNDICE

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice	v
Índice de Tabelas	vii
Índice Figuras.....	viii
Índice Gráficos.....	ix
Lista Abreviaturas.....	x
1. Introdução.....	1
2. Revisão da Literatura.....	2
2.1. Leguminosas como fonte proteica alternativa	2
2.1.1. Benefícios do consumo de leguminosas para a saúde	3
2.1.2. Fatores Antinutricionais	8
2.1.3. Influência da Germinação no valor nutricional das Leguminosas.....	16
2.2. Feijão Andu e Mangalô.....	20
2.2.1. Feijão Andu	20
2.2.2. Feijão Mangalô	21
2.2.3. Utilização e aplicação do Feijão.....	21
2.3. Aminoácidos.....	22
2.3.1. Aminoácidos Essenciais	24
Triptofano.....	24
Treonina.....	24
Lisina	24
Metionina	25
Fenilalanina.....	25
Histidina	25
Isoleucina.....	25
Leucina	26
Valina	26
2.3.2. Aminoácidos Condicionalmente Essenciais	26
Cisteína.....	26
Tirosina	26
Arginina.....	27
Glicina.....	27

Glutamina.....	27
Prolina.....	27
2.3.3. Aminoácidos Não Essenciais	27
Alanina	27
Asparagina.....	27
Ácido Aspártico	28
Ácido Glutâmico	28
Serina.....	28
2.3.4. Importância da determinação do perfil de aminoácidos num género alimentício	29
3. Objetivo.....	30
4. Material e Métodos.....	30
4.1. Reagentes e Padrões.....	30
4.1.1. Preparação dos Reagentes	30
4.1.2. Padrões	31
4.2. Preparação das Amostras	32
4.2.1. Processo Germinativo.....	33
4.3. Métodos Analíticos	33
4.3.1. Análise do Teor de Humidade.....	33
4.3.2. Análise Quantitativa dos Aminoácidos	34
4.3.3. Análise Estatística.....	42
5. Resultados e discussão.....	43
5.1. Análise dos aminoácidos livres.....	43
5.2. Análise dos aminoácidos totais	49
6. Conclusão	60
7. Referências	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Principais leguminosas: perfil nutricional e benefícios para a saúde.	5
Tabela 2. Resumo FAN, características, fatores prejudiciais, inativação e benefícios.	10
Tabela 3. Aminoácidos essenciais, condicionalmente essenciais e não- essenciais..	23
Tabela 4. Preparação das amostras	32
Tabela 5. Etapas germinação das amostras.	33
Tabela 6. Gradiente	41
Tabela 7. Perfil de aminoácidos livres expressos em mg aminoácido/ 100g peso seco.	48
Tabela 8. Perfil Aminoácidos totais expressos em g aminoácido/ 100g peso seco. ...	55

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Pesagem amostras	34
Figura 2. Agitação amostras no <i>multi-rotator</i>	35
Figura 3. Amostras após centrifugação.....	35
Figura 4. Sobrenadante após extração	35
Figura 5. Remoção oxigénio com fluxo de azoto.....	37
Figura 6. Amostras após adição de HCl e KOH.	37
Figura 7. Amostras no bloco de aquecimento - hidrólise.....	37
Figura 8. Amostras após hidrólise.....	38

ÍNDICE GRÁFICOS

Gráfico 1. Composição em aminoácidos livres (mg/100g de peso seco).....	43
Gráfico 2. Composição aminoácidos livres <i>Cajanus cajan</i> (mg/100g de peso seco) ...	44
Gráfico 3. Composição aminoácidos livres <i>Phaseolus lunatus</i> (mg/100g de peso seco)	46
Gráfico 4. Composição em aminoácidos totais (g/100g de peso seco)	50
Gráfico 5. Composição aminoácidos totais <i>Cajanus cajan</i> (g/1000g de peso seco)	51
Gráfico 6. Composição aminoácidos essenciais <i>Cajanus cajan</i> (g/100g de peso seco)	52
Gráfico 7. Composição aminoácidos totais <i>Phaseolus lunatus</i> (g/100g de peso seco)	57
Gráfico 8. Rácio AAE/AANE	58

LISTA ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BCAA	<i>Branched-chain amino acids</i>
FAN	Fatores antinutricionais
FMOG	9-fluorenilmetoxycarbonilo
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IG	Índice glicémico
MPA	Ácido mercaptopropiónico
OPA	Ortoftaldeído
OMS	Organização Mundial de Saúde
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
SNC	Sistema nervoso central

1. INTRODUÇÃO

O crescimento demográfico, a desnutrição e o desperdício alimentar são fatores que põem em causa a disponibilidade alimentar, isto é, a capacidade de todos os seres humanos terem acesso físico, social e económico a uma alimentação suficiente para satisfazer as suas necessidades energéticas e preferências alimentares (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016).

Estima-se que até 2050 a população mundial irá atingir os 10 mil milhões de pessoas. Este crescimento e os comportamentos da sociedade são responsáveis por alterações climáticas graves, nomeadamente a escassez dos recursos hídricos, o aumento da emissão dos gases de efeito estufa e o desgaste dos solos (FAO, 2018).

O consumo exagerado de proteínas de origem animal na alimentação humana contribui em grande escala para as alterações referidas, uma vez que a sua produção está associada a um maior impacto ambiental, através da poluição da água, dos solos e do ar, a uma maior necessidade de recursos e a um maior número de resíduos (FAO, 2018).

O consumo de proteínas de origem vegetal deve ser priorizado comparativamente ao consumo de proteínas de origem animal, na medida em que a sua produção é mais eficiente pela menor utilização de recursos naturais e um menor impacto ambiental (Sabaté et al., 2015).

A população tem vindo a demonstrar um interesse crescente com a sua alimentação, tendo em vista a promoção da saúde e prevenção de diversas doenças. A toma de consciência pelos consumidores acerca da relação entre a dieta e a saúde potencia a procura de alimentos mais saudáveis, mais ricos nutricionalmente e mais benéficos para a saúde (Sabaté et al., 2015).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. LEGUMINOSAS COMO FONTE PROTEICA ALTERNATIVA

As leguminosas constituem alternativas proteicas mais saudáveis do que as proteínas de origem animal cujo consumo está associado a riscos para a saúde humana, tais como doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes e cancro (Sabaté et al., 2015).

O valor nutricional das leguminosas tem ganho particular atenção nos últimos anos dado o seu contributo para a diversidade alimentar, bem como pelos seus benefícios para a saúde (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2015; Motta et al., 2016).

As leguminosas dividem-se em dois grupos: as leguminosas em grão e as leguminosas oleaginosas. Estas distinguem-se pelos teores em hidratos de carbono, proteínas e lípidos (Motta et al., 2016).

As leguminosas em grão caracterizam-se por um elevado teor em proteínas e hidratos de carbono e baixo teor em lípidos, fazendo parte deste grupo o chícharo, a ervilha, a fava, o feijão, o grão-de-bico, a lentilha, a feijoca e o tremço. As leguminosas oleaginosas por sua vez, contêm um teor em lípidos mais elevado e uma percentagem de hidratos de carbono e proteínas menor, como é o caso da soja e do amendoim (Motta et al., 2016; (Gebrelibanos et al., 2013); (Hintz, 2000).

A produção e consumo de leguminosas datam de 7000 a.C., desempenhando um papel significativo na maioria das culturas e civilizações. O consumo destas estava maioritariamente associado a famílias com rendimentos mais baixos. Habitualmente são consumidas sob a forma de semente seca ou em grão, tradicionalmente após imersão em água durante horas e cozedura/germinação (Benevides et al., 2019); (Sánchez-Chino et al., 2015).

As leguminosas constituem um grupo na roda dos alimentos rico em proteínas e aminoácidos, devendo o seu consumo representar 4% da alimentação diária para a manutenção de uma dieta completa, equilibrada e variada (Real et al., 2016); (Motta et al., 2016).

Nutricionalmente caracterizam-se por um elevado teor em hidratos de carbono de absorção lenta, fibras, proteínas, vitaminas do complexo B, minerais e fitoquímicos. Os hidratos de carbono de absorção lenta, nomeadamente o amido, são responsáveis pela sensação de saciedade das leguminosas, uma vez que mantêm os níveis de

glicose no sangue dentro dos valores de referência após as refeições, sendo por esta mesma razão considerados alimentos de baixo índice glicêmico (IG) (Motta et al., 2016; (Sánchez-Chino et al., 2015).

Relativamente às vitaminas, as leguminosas são uma fonte de vitaminas hidrossolúveis, especialmente a tiamina (vitamina B1), a riboflavina (vitamina B2), niacina (vitamina B3), piridoxina (vitamina B6) e ácido fólico (vitamina B9). Possuem elevados teores em minerais como Fósforo, Potássio, Zinco, Cobre, Ferro e Cálcio. Contêm ainda elevados teores de ácidos gordos polinsaturados como o ácido linoleico (Gebrelibanos et al., 2013). As leguminosas no geral são pobres em vitamina C, em sódio e em aminoácidos com enxofre, tais como a metionina e a cisteína (Motta et al., 2016).

O consumo de leguminosas em grão, ricas em proteínas, em conjunto com cereais constituem uma estratégia de combate à subnutrição proteica, daí que estas sejam produzidas e consumidas nos países em desenvolvimento, contribuindo para a disponibilidade alimentar (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2015).

2.1.1. BENEFÍCIOS DO CONSUMO DE LEGUMINOSAS PARA A SAÚDE

As leguminosas apresentam características que as tornam benéficas para a saúde, tais como (Hintz, 2000); Venn et al., 2010; Flight & Clifton, 2006):

- Baixo IG, sendo um ótimo alimento para diabéticos e para a gestão do peso, pois sacia a fome, ajuda a estabilizar os níveis de glicose e insulina no sangue;
- São fontes de vitaminas como o ácido fólico (B9);
- Ricas em fibras alimentares que são benéficas na redução do colesterol das LDL, diminuindo o risco de doença cardíaca coronária;
- Possuem elevado teor em ferro, o que previne anemias por deficiência de ferro. Quando o seu consumo é associado a vitamina C, a absorção do ferro é potenciada;
- Ricas em compostos bioativos, como fitoquímicos e antioxidantes que têm propriedades anticancerígenas;
- São isentas de glúten;
- Os fitoestrogénios presentes na sua composição podem prevenir o declínio cognitivo bem como aliviar os sintomas da menopausa.

O consumo de leguminosas parece diminuir o risco de doenças cardiovasculares, na medida em que são pobres em sódio e ricas em potássio, cálcio, cobre e magnésio, e como contribuem para a manutenção da pressão arterial (Gebrelibanos et al., 2013).

Estudos epidemiológicos com homens e mulheres revelaram que o consumo de quatro vezes ou mais de leguminosas por semana, diminuiu o risco de doenças coronárias e cardiovasculares para 22 e 11%, respectivamente, em comparação com os que consumiam apenas uma dose por semana (Motta et al., 2016).

As proteínas vegetais são especialmente ricas em ácido glutâmico. Elevados níveis de ácido glutâmico estão associados a baixos valores de pressão sanguínea (sistólica e diastólica), melhorando a homeostasia da pressão arterial (Poggiogalle et al., 2019).

As leguminosas são particularmente interessantes para os vegetarianos e vegans pois são muito ricas em minerais, vitaminas e proteínas; para os doentes celíacos, como substitutos de farinhas para panificação; e para diabético dado o seu teor em hidratos de carbono de absorção lenta com baixo índice glicémico (Motta et al., 2016).

As principais leguminosas, perfil nutricional e benefícios para a saúde estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1- Principais leguminosas: perfil nutricional e benefícios para a saúde.

Leguminosas	Maior Produtor	Teor Proteico	Vitaminas	Aminoácidos	Minerais	Benefícios para a Saúde
Ervilha	Canadá (Real et al., 2016)	23-33% (Real et al., 2016)	Destacam-se as B3, B6 e E (Real et al., 2016)	Rica em lisina e triptofano (Real et al., 2016; Barroso et al., 2007)	Potássio, fósforo, magnésio e cálcio (Real et al., 2016; Barroso et al., 2007)	-Regula os níveis de colesterol; - Favorece a absorção de cálcio; - Regula a hipertensão; - Melhora o funcionamento do sistema nervoso (Naia, 2015).
Fava	China e Reino Unido (Real et al., 2016)	≈26% (Real et al., 2016)	Destaca-se a vitamina B3 e A (Real et al., 2016)	Rica em aspartato, glutamato, leucina e arginina (Real et al., 2016)	Cálcio, fósforo, potássio (Real et al., 2016)	- Regula os níveis de colesterol (Bessada et al., 2019).
Feijão	Índia (Real et al., 2016)	20-30% (Benevides et al., 2019)	Destaca-se o ácido fólico (Benevides et al., 2019; Real et al., 2016)	Rico em leucina, lisina, fenilalanina, valina, isoleucina, treonina, histidina. Deficiente em aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína) (Benevides	Cálcio, ferro, magnésio, potássio (Benevides et al., 2019); (Real et al., 2016).	- Diminuição do colesterol LDL; - Auxilia no controlo de diabetes, obesidade e cancro (Benevides et al., 2019); Real et al., 2016).

				et al., 2019); (Real et al., 2016).		
Feijão-Frade	Ásia, África e Sul da Europa (Akibode & Maredia, 2011)	23-32% (Vasconcelos et al., 2010; Real et al., 2016)	Destaca-se o ácido fólico (Vasconcelos et al., 2010; Real et al., 2016)	Rico em glutamina, asparagina, fenilalanina, tirosina, arginina, leucina e lisina. Deficiente em aminoácidos sulfurados (Vasconcelos et al., 2010; Real et al., 2016).	Potássio, magnésio, fósforo (Vasconcelos et al., 2010; Real et al., 2016)	<ul style="list-style-type: none"> - A presença de amido resistente atenua a resposta insulínica e diminui o apetite; - Auxilia na perda de peso; - Melhora a digestão; - Diminui os valores de colesterol; - Propriedades anti-hipertensivas, antilipídicas, antioxidantes, anticancerígenas (Dakora & Belane, 2019)
Grão-de-bico	Índia (Akibode & Maredia, 2011)	20-30% (Bessada et al., 2019).	Rico em vitamina B3, B6, B9, vitamina A, K e C (Bessada et al., 2019; Real et al., 2016).	Rico em glutamato, aspartato e arginina. Limitante em aminoácidos sulfurados (Bessada et al., 2019; Real et al., 2016).	Potássio, fósforo, magnésio, cálcio (Bessada et al., 2019; Real et al., 2016).	<ul style="list-style-type: none"> - Propriedades saciantes; - Auxílio na perda de peso e controlo obesidade; - Diminuem risco de doenças

						cardiovasculares; - Reduzem incidência de determinados tipos de cancro (Jukanti et al., 2012; Wallace et al., 2016).
Lentilha	Ásia e Canadá (Akibode & Maredia, 2011)	≈26% (Real et al., 2016)	Destaca-se a vitamina B1, B2, B3 e ácido fólico (Akibode & Maredia, 2011; Real et al., 2016)	Rico em aspartato, glutamato, arginina, leucina, lisina e fenilalanina. Limitante em metionina, cisteína e triptofano (Real et al., 2016; Faris & Attlee, 2016).	Magnésio, fósforo, cálcio, ferro e selénio (Real et al., 2016; Faris & Attlee, 2016).	- Atividade na prevenção de cancro; - Atividade hipoglicémica e antidiabética; - Regula a hipertensão; - Auxilia no controlo do peso corporal (Faris & Attlee, 2016; Hefnawy, 2011).
Tremoço	Austrália (Oliveira et al., 2013).	30-40% (Pereira, 2003).	Destaca-se as B3 e B6 (Pereira, 2003).	Rico em leucina, fenilalanina, tirosina, arginina, asparagina, glutamina. Deficiente em metionina e cisteína (Pereira, 2003)	Potássio, fósforo, magnésio, cálcio (Pereira, 2003)	- Regula os níveis de colesterol; - Auxilia na prevenção da diabetes; - Proteção cardiovascular; - Regula a hipertensão (Pereira, 2003; Oliveira et al., 2013)

O consumo de leguminosas mostrou-se benéfico para a saúde devido à presença de metabolitos secundários que parecem ter atividade benéfica e protetora, tais como (Benevides et al., 2019; Doria et al., 2012):

- **Compostos fenólicos** – têm a capacidade de inibir ou retardar a oxidação dado o seu potencial oxidante;
- **Flavonoides** – possuem propriedades antiinflamatórias, antimicrobiana, antioxidantes, anti tumoral e antiviral;
 - **Isoflavonas** – úteis para a prevenção de osteoporose, para o tratamento e prevenção de problemas e sintomatologia pós-menopausa. Os seus mecanismos têm também efeitos antiinflamatórios;
- **Rafinossacarídeos** – estimulam o crescimento e atividade de bactérias benéficas e probióticos;
- **Saponinas** – os seus efeitos benéficos estão associados à atividade antibacteriana e antifúngica. Têm também função dislipidémica e inibem o crescimento de células cancerígenas.

Contudo, alguns destes compostos apresentam simultaneamente uma ação antinutricional que pode desincentivar o consumo de leguminosas (Doria et al., 2012).

2.1.2. FATORES ANTINUTRICIONAIS (FAN)

As sementes das leguminosas acumulam substâncias antinutricionais como mecanismo de defesa contra os ataques de parasitas e fungos, com o objetivo de ter reservas para conseguir desenvolver e crescer em condições adversas (Sánchez-Chino et al., 2015). Os FAN podem atuar de duas formas, na digestão e absorção de alguns componentes ou como agentes tóxicos, causando efeitos colaterais fisiológicos indesejáveis e desincentivando o consumo de leguminosas. Estes FAN podem dividir-se em compostos proteicos e não proteicos (Sánchez-Chino et al., 2015; Naia, 2015).

Os FAN proteicos são proteínas biologicamente ativas como os inibidores das proteases e as lectinas. Estas podem interferir na digestão das proteínas na dieta, retardando o crescimento e a absorção de nutrientes. Os inibidores de proteases e as lectinas são instáveis ao calor, podendo ser efetivamente inativados por tratamento térmico pelos métodos tradicionais de cozedura (Naia, 2015). Os FAN não proteicos englobam os alcaloides, ácido fítico, compostos fenólicos, taninos e saponinas (Naia, 2015; Motta et al., 2016).

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários essenciais para o crescimento e reprodução das plantas, atuando como agentes protetores contra os agentes patogénicos (Sánchez-Chino et al., 2015).

2.1.2.1. Inativação FAN

A inativação dos FAN pode ser realizada através de (Sánchez-Chino et al., 2015):

- Tratamentos físicos (descasque e por diminuição/divisão do tamanho de cada leguminosa);
- Tratamentos térmicos (cozedura, autoclavagem, imersão);
- Tratamentos biológicos (germinação);
- Uso de enzimas específicas como a fitase para a redução do ácido fítico.

Na tabela que se segue (Tabela 2), estão resumidos os FAN referidos anteriormente, bem como as suas funções, ação prejudicial *versus* benefícios do seu consumo e forma de inativação.

Tabela 2- Resumo FAN, características, fatores prejudiciais, inativação e benefícios.

FATORES ANTI-NUTRICIONAIS		CARACTERÍSTICAS/FUNÇÃO	AÇÃO PREJUDICIAL	BENEFÍCIOS	INATIVAÇÃO/REDUÇÃO
PROTEICOS	Lectinas	Glicoproteínas capazes de se ligar reversivelmente a mono ou oligossacarídeos, formando complexos com açúcares e proteínas específicas (Suárez-Martínez et al., 2016).	Ao ligar-se ao epitélio intestinal, interferem na digestibilidade proteica (Suárez-Martínez et al., 2016). Retardam a absorção de nutrientes e o crescimento. Podem provocar diarreia, inflamação, inchaço e vômitos (Hamid & Kumar, 2017).	A sua ligação a reguladores celulares tem demonstrado propriedades anti-tumorais, imoduladoras do sistema imune e anti-bacterianas. Efeito hipoglicémico (Suárez-Martínez et al., 2016).	Inativados por tratamento térmico pelos métodos tradicionais de cozedura (Hamid & Kumar, 2017).

	<p>Inibidores de Proteases</p>	<p>Incluem os inibidores das seguintes enzimas: tripsina, quimotripsina, carboxipeptidase, elastase e α-amilase. A ação destes no processo digestivo reduz a metabolização dos hidratos de carbono (Sánchez-Chino et al., 2015).</p>	<p>Reduzem/inibem a ação de enzimas necessárias para a digestão/ processamento dos alimentos (Sánchez-Chino et al., 2015).</p> <p>Resistentes à pepsina digestiva e ao pH ácido do estômago, interferindo na digestão (Bessada et al., 2019).</p>	<p>Propriedades anti-inflamatórias (Bessada et al., 2019).</p>	<p>Podem ser significativamente reduzidos por tratamentos térmicos e germinação (Khalil & Mansour, 1995).</p>
<p>NÃO-PROTEICOS</p>	<p>Alcalóides</p>	<p>Compostos orgânicos cíclicos contendo azoto (Marques & Lopes, 2015).</p>	<p>Provocam distúrbios do sistema nervoso central (SNC), digestivos e imunológicos</p>	<p>Propriedades anti-tumorais (Marques & Lopes, 2015)</p>	<p>Lavagem das sementes com água (Pereira, 2003).</p>

			(Bessada et al., 2019).		
--	--	--	-------------------------	--	--

	<p>Ácido Fítico</p>	<p>Carboidrato com 6 grupos de fosfato. Formam complexos estáveis com proteínas específicas, diminuindo a sua solubilidade ou a enzimas digestivas reduzindo a digestibilidade dos nutrientes.</p> <p>Inibem enzimas digestivas como pepsina, pancreatina e α-amilase (Romero-Aguilera et al., 2017; Bessada et al., 2019; Souza et al., 2019).</p>	<p>É um quelante de cátions divalentes como o cálcio, magnésio, zinco e ferro, reduzindo a absorção de minerais pelo epitélio intestinal (C. G. de Souza et al., 2019).</p>	<p>Inibe a formação de cristais de oxalato de cálcio;</p> <p>Diminuição da inflamação;</p> <p>Potencial oxidante;</p> <p>Ação na prevenção do cancro (Romero-Aguilera et al., 2017; Souza et al., 2019).</p>	<p>Imersão das sementes em água simples e solução salina mineral durante 12h diminui o ácido fítico em 46-50%.</p> <p>Germinação e fermentação reduz os teores em mais de 30% (Sánchez-Chino et al., 2015).</p>
--	----------------------------	---	---	--	---

	COMPOSTOS FENÓLICOS	Taninos	<p>Diminuem a ingestão alimentar inibindo a ação das enzimas digestivas e formam complexos com proteínas (Suárez-Martínez et al., 2016).</p> <p>Composto fenólico com sabor adstringente que precipita as proteínas. Podem também formar complexos com metais divalentes reduzindo a absorção de metais (Gebrelibanos et al., 2013).</p>	<p>Inibem as enzimas, diminuindo a digestibilidade (Jukanti et al., 2012).</p>	<p>Agente antidiarreico, anti-hemorrágico, homeostático e antibacteriano (Awoyinka et al., 2016; Souza et al., 2019).</p>	<p>Germinação, fermentação, a imersão e o descasque (Gebrelibanos et al., 2013).</p>
--	----------------------------	----------------	--	--	---	--

		Saponinas	<p>Glicosídeos compostos por um esterol ou triterpenóide. Pouco absorvidas, formando micelas grandes e mistas com ácidos biliares e colesterol.</p> <p>Substâncias derivadas do metabolismo secundário das plantas (Messina, 1999).</p>	<p>Em concentrações elevadas confere um sabor amargo.</p> <p>Propriedades espumosas e surfactantes.</p> <p>Responsáveis por flatulência, produção de gás intestinal e em consumo exagerado pode surgir dor abdominal e diarreia (Bessada et al., 2019).</p>	<p>Efeito hipocolesterolêmico e hipotensivo.</p> <p>Atividades anticancerígenas anti-inflamatórias, e antioxidantes.</p> <p>Propriedades surfactantes que reduzem a tensão superficial e ajuda na absorção de nutrientes (Awoyinka et al., 2016; Sánchez-Chino et al., 2015; Souza et al., 2019).</p>	<p>Brotação durante 60h (Vasconcelos et al., 2010).</p>
--	--	------------------	---	---	---	---

2.1.3. INFLUÊNCIA DA GERMINAÇÃO NO VALOR NUTRICIONAL DAS LEGUMINOSAS

A germinação é um processo simples, de baixo custo e eficaz para melhorar a qualidade nutricional das leguminosas (Pal et al., 2017). Esta corresponde a um processo biológico que ocorre nas plantas, no qual a semente sai da fase de latência, germinando, quando são reunidas condições ambientais ideais (humidade, temperatura, nutrientes e oxigénio) para o seu crescimento e desenvolvimento (Aragão, 2013; Sangronis & Machado, 2007).

O processo germinativo inicia-se com a absorção de água pela semente e crescimento do embrião. Corresponde a um período do ciclo da planta que começa a emergir a partir da semente. Durante o processo ocorrem diversos eventos fisiológicos e bioquímicos que irão definir características diferentes da semente inicial (Aragão, 2013; Farinde et al., 2018).

A germinação promove importantes alterações de características bioquímicas, nutricionais e sensoriais das sementes, o que pode potenciar a diminuição e até mesmo o desaparecimento de fatores antinutricionais e o aumento de compostos benéficos com efeitos antioxidantes, promovendo uma maior aceitabilidade do produto final (Gharachorloo et al., 2013; Hsu et al., 1980; Pal et al., 2017). A semente de leguminosas germinadas constitui uma alternativa ao consumo de leguminosas em grão, na medida em que este processo permite eliminar desvantagens como o odor e gosto desagradável conferidos pela presença de taninos e inibidores da tripsina presentes nas leguminosas (Aragão, 2013; Sangronis & Machado, 2007).

O processo germinativo afeta também a quantidade e os nutrientes presentes na semente dependendo da espécie de cultivo, do tipo de cultivo, do tipo de semente e com as condições de germinação (temperatura, luz, humidade e tempo de germinação). Durante a germinação, quantidades elevadas de enzimas hidrolíticas são sintetizadas que decompõem as proteínas, hidratos de carbono e lípidos em formas mais simples. A ação destas enzimas gera um aumento da disponibilidade de nutrientes, e conseqüentemente dos aminoácidos, podendo originar diferenças na composição química das leguminosas antes e após a germinação (Gharachorloo et al., 2013; A. Singh et al., 2015).

Durante a germinação as reservas das sementes são utilizadas para a respiração e para a síntese de novos componentes celulares do desenvolvimento embrionário, provocando alterações na estrutura dos macronutrientes, gerando compostos com maior bioatividade, melhorando características bioquímicas, nutricionais e sensoriais das leguminosas (Bau et al., 1997; Vidal-Valverde et al., 2002). A digestibilidade proteica aumenta durante a germinação bem como as suas propriedades de emulsificação (Vidal-Valverde et al., 2002).

A germinação parece favorecer a diminuição do teor lipídico das sementes. Estudos realizados por (Chandrasiri et al., 1990), indicaram uma perda de teor lipídico de aproximadamente 19,8% ao fim de cinco dias de germinação quando comparado com a semente in natura. A degradação destes lípidos durante o processo germinativo tem como objetivo fornecer energia para a síntese proteica, necessária para o crescimento da planta, o que pode explicar a diminuição do conteúdo lipídico e o aumento do teor proteico ao fim de cinco dias de germinação (Bau et al., 1997).

Como já referido anteriormente, a presença de alguns fatores antinutricionais nas sementes das leguminosas, tais como os inibidores da tripsina, o ácido fítico e os taninos interferem com a absorção e disponibilidade de nutrientes, redução da digestibilidade proteica e valor nutricional do alimento. A redução ou eliminação destes fatores irá melhorar a qualidade nutricional dos alimentos (Farinde et al., 2018).

Alguns investigadores verificaram uma redução do fator antinutricional, ácido fítico, com a germinação das sementes devido a um aumento da atividade da enzima fitase, resultando numa maior disponibilidade de minerais essenciais como o zinco, o manganês, o cálcio, o magnésio, o ferro e o cobre (Bau et al., 1997; Hsu et al., 1980).

A literatura refere que a germinação da soja promoveu um aumento dos teores de vitamina C, ácido ascórbico, biotina, niacina e riboflavina (Bau et al., 1997; Hsu et al., 1980).

Estudos realizados com amostras de feijão, lentilhas e ervilhas constataram que após a germinação, os teores de açúcares solúveis e de vitamina B2 aumentaram (Vidal-Valverde et al., 2002).

Os hidratos de carbono são as principais fontes de reserva das sementes, sendo utilizados para o desenvolvimento inicial das plântulas. Estes fornecem energia para os processos metabólicos e morfogenéticos. De acordo com a literatura, estudos realizados com sementes de os conteúdos de hidratos de carbono diminuem com o progresso da germinação (Aragão, 2013).

A germinação pode, contudo, originar efeitos como a modificação da composição proteica e de aminoácidos, degradação lipídica e contaminação bacteriana (Bau et al., 1997).

2.1.3.1. Influência da germinação no teor proteico e no perfil de aminoácidos de leguminosas

As plantas têm a capacidade de sintetizar proteínas através de fontes de azoto inorgânicas como o amoníaco, nitrato e nitritos. Sendo as proteínas essencialmente constituídas por azoto, o azoto pode ser utilizado como um índice de proteína de uma amostra (Aremu et al., 2017).

Estas sintetizam aproximadamente 20 aminoácidos através de três vias (Aragão, 2013):

- Intermediários da glicólise (serina, glicina, cisteína, alanina, valina, leucina e isoleucina);
- Ciclo do ácido cítrico (aspartato, metionina, treonina, lisina, glutamina, prolina e arginina);
- Via das pentoses fosfato (histidina, triptofano, fenilalanina e tirosina).

Os aminoácidos controlam praticamente todos os processos celulares e reações nas células vivas (Thakur et al., 2017). Estes são moléculas essenciais para o desenvolvimento das plantas pois são fontes de azoto úteis para a síntese de proteínas e outros componentes necessários para o funcionamento celular. Deste modo, os níveis de aminoácidos variam ao longo do processo germinativo (Aragão, 2013).

A qualidade proteica de um alimento não depende apenas da quantidade de proteína presente, mas sim da sua composição em aminoácidos essenciais, disponibilidade, digestibilidade e interferência de fatores antinutricionais (Thakur et al., 2017).

O conteúdo proteico e a composição de aminoácidos variam frequentemente entre as plantas, dependendo da fase de desenvolvimento e crescimento das mesmas. Deste modo, o teor proteico pode diferir entre famílias, géneros e espécies de leguminosas. Estas variações também podem ocorrer entre as sementes dependendo da posição do órgão de frutificação da semente e da sua localização na planta. As principais razões de variação são fatores genéticos e ambientais (Aremu et al., 2017; Walter et al., 2008).

As sementes das leguminosas possuem um conteúdo proteico cerca de duas vezes superior ao dos cereais e apresenta um perfil de aminoácidos essenciais mais equilibrado. O teor proteico das leguminosas varia aproximadamente entre 17 – 40 g/100g, sendo muito mais elevado que o dos cereais (≈ 7 – 12 g/100g) e semelhante ao da carne (18-25 g/100g) (Farinde et al., 2018).

A proteína bruta de um alimento obtém-se mais comumente pela determinação de azoto, pelo método Kjeldahl, multiplicado pelo fator de conversão de 6,25, amplamente

utilizado para uma gama de proteínas contendo aproximadamente 16% de azoto (Aremu et al., 2017).

Em geral, 85-90% do azoto total das sementes das leguminosas é de origem proteica. A parte não proteica corresponde a uma percentagem minoritária de compostos de azoto como aminoácidos solúveis, ácidos nucleicos, bases de purinas e pirimidinas (Aremu et al., 2017).

Estudos realizados com sementes germinadas de proteínas vegetais revelaram que ao longo do processo germinativo, o conteúdo em aminoácidos varia de acordo com as necessidades das várias fases de desenvolvimento da plântula, sugerindo que estes possam ter alguma influência no processo (Aragão, 2013). Referências literárias sugerem que para além de outras funções já referidas, os aminoácidos durante a germinação podem atuar como reguladores osmóticos, tendo assim um papel crucial no desenvolvimento e crescimento do broto (Aragão, 2013; Pieruzzi et al., 2011).

Investigadores reportaram que o valor nutritivo das leguminosas pode ser melhorado pela cozedura ou germinação (Khalil & Mansour, 1995). Estudos feitos com o feijão fava revelaram que a germinação provocou um ligeiro aumento de proteína bruta em comparação com o feijão fava cru. Este aumento pode dever-se essencialmente à degradação de moléculas complexas, ou seja, proteínas a péptidos mais simples durante o processo de germinação (Khalil & Mansour, 1995). A lisina e a leucina representaram em conjunto a maior quantidade de aminoácidos essenciais presentes na amostra em cru e após processamento. O valor total de aminoácidos não sofreu alterações após tratamento térmico e germinação (Khalil & Mansour, 1995).

Um estudo realizado por Singh et al. (2015) com sementes de aveia indicou um aumento do teor de aminoácidos ao fim de 24 horas de germinação, sobretudo dos aminoácidos treonina, valina e isoleucina.

2.2. FEIJÃO ANDU E MANGALÔ

As leguminosas são culturas alimentares importantes devido ao elevado teor proteico e quantidade de aminoácidos presentes. Estas são muito relevantes nutricionalmente e vantajosas para a saúde do consumidor. Dois bons exemplos são o feijão Andu (*Cajanus cajan* L.) e o feijão Mangalô (*Phaseolus lunatus* L.) que irão ser destacados em seguida por se tratarem das espécies estudadas no presente trabalho.

2.2.1. FEIJÃO ANDU

O feijão Andu (*Cajanus cajan* L.) também conhecido como ervilha-de-pombo é uma leguminosa pertencente à família *Fabaceae*, que se estima ter aparecido na África Ocidental em 2000 a.C. É maioritariamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais, em todo o mundo, originando grãos nutricionalmente ricos (Ishaya & Aletor, 2019; Benevides et al., 2019). Esta pode ser consumida sob a forma de vagem ou semente e o seu teor proteico varia entre 18-30%. Constitui também uma fonte de hidratos de carbono, minerais e vitaminas. Rico em cálcio, fósforo, magnésio, ferro, cobre, zinco, potássio e vitaminas hidrossolúveis como tiamina, riboflavina e niacina (Ngozi et al., 2015; Odeny D A, 2007; Sharma et al., 2011). É uma fonte de vitamina K cuja concentração elevada ativa os níveis de osteocalcina, que consequentemente limita o comprometimento da mineralização óssea. Esta é ainda necessária para a coagulação do sangue (Ngozi et al., 2015). É uma boa fonte de aminoácidos, sendo a fenilalanina o aminoácido essencial mais abundante e a metionina o aminoácido limitante (Oshodi et al., 1993).

O feijão Andu tem-se tornado uma das leguminosas mais importantes para a subsistência em África, na medida em que possui uma elevada tolerância à seca e solos ácidos, sendo uma das poucas culturas com rendimento de grãos durante os períodos de seca. Na Nigéria, esta leguminosa tem vindo a ser explorada para o fabrico de biscoitos (Aremu et al., 2017). Mantém uma ótima função sintética durante o *stress* quando comparada com outras culturas tolerantes à seca como o feijão-frade (Sharma et al., 2011). Apesar da sua capacidade de adaptação a climas hostis a produtividade desta cultura manteve-se estável nas últimas cinco décadas, com cerca de 750 kg/ha por ano (Fuller et al., 2019). Esta leguminosa apresenta um baixo teor em lípidos pelo que auxilia na prevenção de doença cardiovascular. A presença de fibras ajuda a prevenir doenças crónicas e diabetes. Os aminoácidos limitantes do *Cajanus cajan* L. são a metionina, cistina, triptofano e treonina (Sharma et al., 2011).

Como FAN detetou-se a presença de inibidores de proteases, afetando a atividade das enzimas digestivas. Estes devem ser inativados antes do consumo do feijão através da demolha, germinação ou cozedura (Sharma et al., 2011).

2.2.2. FEIJÃO MANGALÔ

O feijão Mangalô (*Phaseolus lunatus L.*) é uma espécie do género *Phaseolus* originária do Peru. É cultivada na Ásia, América do Sul e África, em regiões temperadas e/ ou subtropicais. O seu conteúdo proteico varia entre 21 e 28% (Ishaya & Aletor, 2019; Mizubuti et al., 2000).

É uma cultura importante para a nutrição humana principalmente em países em desenvolvimento como na África Oriental e de Leste e América Central e do Sul, uma vez que nestas regiões as pessoas carecem de proteína de origem animal. Assim, o consumo de vegetais e leguminosas contribui para o aumento do aporte proteico da alimentação (Oshodi & Adeladun, 1993; Doria et al., 2012).

As suas sementes contêm elevados níveis de macro e micronutrientes como proteínas, minerais, hidratos de carbono e vitaminas (Doria et al., 2012).

Apresenta como fatores antinutricionais os inibidores da tripsina e α -amilase, a hemaglutinina (lectina) e o tioglicosídeo (Adeparusi, 2001).

2.2.3. UTILIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO FEIJÃO

As proteínas presentes em maior quantidade no feijão são as globulinas e as albuminas e, em menor quantidade, a prolamina e a glutelina (Benevides et al., 2019; Messina, 1999) As globulinas 11S são particularmente interessantes e usadas como ingrediente alimentar, conferindo textura aos alimentos (Chel-Guerrero et al., 2011).

Neste contexto, o feijão é amplamente utilizado pelas suas características sensoriais, nutricionais e propriedades funcionais que fazem com que seja um ingrediente ótimo para a indústria alimentar, como por exemplo para produtos de padaria/pastelaria, condimentos, salsichas, entre outros (Chel-Guerrero et al., 2011).

O feijão tem propriedades que podem ser usadas na melhoria de alguns alimentos. A farinha desta leguminosa pode ser usada na panificação, na indústria de *snacks*, como aditivo em sopas e arroz, como suplemento em dietas pobres em proteína, com o objetivo de aumentar o seu valor nutricional sem interferir com as suas características sensoriais. As sementes podem também ser incorporadas na ração animal, melhorando a qualidade da sua alimentação, resultando num aumento de peso mais rápido (Odeny D A, 2007; Oshodi et al., 1993; Benevides et al., 2019).

Estudos referem que a incorporação de leguminosas na ração animal pode ser benéfica no aumento da disponibilidade proteica não degradada e no controlo de infeções parasitárias, quando presente em concentrações inferiores a 6%. Concentrações superiores a 7% podem interferir no valor nutritivo das leguminosas, desencorajando o seu consumo e ganho de peso nos ruminantes. Este facto, deve-se à presença de taninos condensados que para além de proporcionar uma sensação adstringente, é capaz de complexar proteínas tornando-as indisponíveis à absorção pelo organismo (Stivari et al., 2011).

2.3. AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos são compostos biologicamente ativos constituídos por dois grupos funcionais, um grupo amina e um grupo carboxílico ligados ao átomo de carbono α . Estes são a base de construção das proteínas, visto que uma proteína corresponde a uma sequência de aminoácidos unidos por ligações peptídicas (Monirujjaman & Ferdouse, 2014). As proteínas são moléculas orgânicas que se encontram em todas as células de todos os organismos e possuem funções vitais para o funcionamento celular (Voet et al., 2000). Variações no grupo-R das cadeias laterais dos aminoácidos, resultam em aminoácidos com propriedades e funções bioquímicas diferentes (Voet et al., 2000; Wu, 2009) Existem mais de 300 aminoácidos, mas apenas 20, os α -aminoácidos, estão presentes nas moléculas das proteínas. Os aminoácidos desempenham papéis importantes em vários processos metabólicos e fisiológicos nos seres vivos (Monirujjaman & Ferdouse, 2014).

Nutricionalmente, os aminoácidos podem ser classificados como essenciais ou não essenciais (Tabela 3) (Wu, 2013; Pavanelli, 2014):

- **Aminoácidos essenciais** - são aqueles que o organismo é incapaz de sintetizar, mas que são essenciais para o seu funcionamento, pelo que deverão ser obtidos pela dieta em quantidades suficientes para assegurar a síntese proteica e a manutenção de todas as funções vitais para o organismo;
- **Aminoácidos não essenciais** - são aqueles que podem ser sintetizados pelo organismo, não estando dependentes da obtenção a partir da dieta;
- **Aminoácidos condicionalmente essenciais** – são aqueles que não o sendo normalmente, em situações especiais de carência tornam-se aminoácidos essenciais

As necessidades em aminoácidos dependem da espécie, do estágio de desenvolvimento, estado fisiológico, microbiota intestinal, fatores ambientais e estados patológicos (Wu, 2013). Situações com carências especiais de aminoácidos incluem a gravidez, amamentação, infeção de crescimento rápido, queimaduras, lesões, stress, entre outros (Pimentel, 2016).

Tabela 3-Aminoácidos essenciais, condicionalmente essenciais e não-essenciais (Wu, 2009).

Essenciais	Condicionalmente Essenciais	Não Essenciais
Histidina	Arginina	Alanina
Isoleucina	Glutamina	Asparagina
Leucina	Glicina	Aspartato
Lisina	Prolina	Glutamato
Metionina	Tirosina	Serina
Fenilalanina	Cisteína	
Treonina		
Triptofano		
Valina		

Os aminoácidos funcionais possuem funções importantes na prevenção e no tratamento de estados patológicos como doenças metabólicas, restrições de crescimento, doenças infecciosas e disfunções orgânicas (Wu, 2013).

O organismo para desempenhar as suas funções e processos metabólicos necessita de macro e micronutrientes em determinadas concentrações. Ao longo dos anos têm sido criadas recomendações de exigência dietéticas para os nutrientes tendo em conta a idade, o género, o peso, a atividade física e variações individuais (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013; WHO/FAO/UNU Expert Consultation, 2007).

A exigência dietética consiste na quantidade de proteínas e/ou dos seus aminoácidos constituintes, que devem ser fornecidos pela dieta a fim de satisfazer as suas necessidades metabólicas e alcançar o equilíbrio em azoto (Paula et al., 2012; WHO/FAO/UNU Expert Consultation, 2007).

As exigências em aminoácidos essenciais (triptofano, treonina, lisina, metionina, fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina e valina) e em aminoácidos condicionalmente essenciais (cisteína, tirosina, arginina, glicina, glutamina e prolina) estão descritas em seguida. As exigências em aminoácidos não essenciais (alanina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutâmico e serina) não são valores absolutos, podendo ser expressos apenas em relação à ingestão total de azoto (WHO/FAO/UNU Expert Consultation, 2007).

Com base em estimativas, a FAO estabeleceu recomendações para as necessidades tanto de proteínas como de aminoácidos, sendo em média 1,14 g/kg por dia para crianças até 1 ano de idade, de 0,99 a 0,91 g/kg por dia para crianças até 10 anos e 0,66 g/kg por dia para adultos (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013; Paula et al., 2012; WHO/FAO/UNU Expert Consultation, 2007).

2.3.1. AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS

Triptofano

Nutricionalmente significativo, embora menos que alguns. É precursor da serotonina, sendo um potente efector de humor e comportamentos, e da melatonina que apresenta propriedades sedativas e auxiliares do sono (Berry, 2019; S. Huang et al., 2018; Pavanelli, 2014; Pimentel, 2016; Vasconcelos et al., 2010)

Necessidade diária (adulto): 4 mg/kg (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013).

Treonina

Essencial para a manutenção da pele e dentes saudáveis. Auxilia no metabolismo da gordura, sendo também benéfica nos indivíduos com indigestão, ansiedade e depressão leve. Importante para a síntese da mucina e manutenção da integridade intestinal, bem como da função imunitária (Berry, 2019; S. Huang et al., 2018; Pavanelli, 2014; Pimentel, 2016; Vasconcelos et al., 2010)

Necessidade diária (adulto): 15 mg/kg por dia (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013).

Lisina

Muito importante pois não pode ser sintetizada por mamíferos. Tem uma função principal na síntese proteica. Melhora a absorção do cálcio pelo intestino e a reabsorção do mesmo após filtração glomerular. Importante para a estrutura do colagénio. Atua como regulador da síntese do óxido nítrico e como mediador da vasodilatação (Wu, 2009). Papel na construção muscular, manutenção da estrutura/densidade óssea, recuperação de lesões, regulação de hormonas, anticorpos e enzimas. Responsável pela conversão dos ácidos gordos em energia, auxiliando na diminuição do colesterol (Pavanelli, 2014; Vasconcelos et al., 2010; Pimentel, 2016; Berry, 2019; Huang et al., 2018; M.Singh et al.,2011).

Necessidade diária (adulto): 30 mg/kg por dia (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013).

Metionina

Importante na formação de produtos como a colina que é um intermediário metabólico de alta energia. Atua na desintoxicação do fígado. Auxilia na absorção de selênio e zinco e na remoção de chumbo e mercúrio, cuja acumulação é prejudicial à saúde. Ajuda no fortalecimento das unhas. Principal dador do grupo metilo para afetar o ácido desoxirribonucleico (ADN) e a metilação proteica das células (Pavanelli, 2014; Vasconcelos et al., 2010; Pimentel, 2016; Berry, 2019; Huang et al., 2018).

Necessidade diária (adulto): 15 mg/kg por dia (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013).

Fenilalanina

Responsável pela regulação da síntese de dopamina e das proteínas do tecido visceral. Ajuda na utilização de outros aminoácidos para a realização funções específicas (Pimentel, 2016; Berry, 2019; Huang et al., 2018).

Necessidade diária (adulto): 25 mg/kg por dia (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013).

Histidina

Facilita o crescimento, renovação de células sanguíneas e reparação dos tecidos. Interfere na imunidade, saúde reprodutiva e digestão. Envolvida na modulação da oxidação/degradação do ADN. Um dos seus metabolitos, a histamina é um importante mensageiro químico (Pavanelli, 2014; Vasconcelos et al., 2010; Pimentel, 2016; Berry, 2019; Huang et al., 2018).

Necessidade diária (adulto): 10 mg/kg por dia (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013).

Isoleucina

Armazenado em grandes quantidades, está associada à síntese de glutamina e alanina. Regula os níveis de energia, auxilia na cicatrização de feridas, na imunidade, regulação do açúcar e na produção de hormonas (Pavanelli, 2014; Vasconcelos et al., 2010; Pimentel, 2016; Berry, 2019; Huang et al., 2018).

Necessidade diária (adulto): 20 mg/kg por dia (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013).

Leucina

Estimula a síntese proteica, promovendo um aumento da massa muscular. Ajuda na regulação dos níveis de açúcar na circulação sanguínea, auxiliando também no crescimento e reparação de músculos e ossos. Importante na cicatrização de feridas e produção de hormonas de crescimento. Intensificador de sabor (Pavanelli, 2014; Vasconcelos et al., 2010; Pimentel, 2016; Berry, 2019; Huang et al., 2018).

Necessidade diária (adulto): 39 mg/kg por dia (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013).

Valina

Importante para a síntese de glutamina e alanina. Essencial para a concentração mental, coordenação muscular e equilíbrio emocional. Os suplementos de valina auxiliam na reparação de tecidos e revitalização muscular (Pavanelli, 2014; Vasconcelos et al., 2010; Pimentel, 2016; Berry, 2019; Huang et al., 2018).

Necessidade diária (adulto): 26 mg/kg por dia (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013).

2.3.2. AMINOÁCIDOS CONDICIONALMENTE ESSENCIAIS

Cisteína

Em conjunto com a metionina desempenham um papel na elasticidade e na saúde da pele e do cabelo. Capaz de modular a pressão arterial através da diminuição do *stress* oxidativo e aumento de biodisponibilidade de óxido nítrico e aumentar a sensibilidade à insulina (Berry, 2019; S. Huang et al., 2018; Pavanelli, 2014; Poggiogalle et al., 2019; Vasconcelos et al., 2010)

Necessidade diária (adulto): 15 mg/kg por dia (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013).

Tirosina

Juntamente com a fenilalanina é um aminoácido aromático e está dependente desta uma vez que a fenilalanina é convertida em tirosina. Atua na fosforilação, nitrosação e sulfatação de proteínas. Precursor de síntese de hormonas da tiroide, dopamina, epinefrina e norepinefrina (Pavanelli, 2014; Vasconcelos et al., 2010; Berry, 2019; Huang et al., 2018).

Necessidade diária (adulto): 25 mg/kg por dia (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013).

Arginina

Importante para a regulação da pressão arterial, cicatrização, imunidade e libertação de hormonas. Promove a síntese das mioproteínas. Vasodilatador promovendo uma maior oxigenação do tecido muscular. Permite a produção de energia mais rapidamente. Retarda a fadiga muscular, prolongando a resistência do atleta na atividade física de alta duração. Contribui para o funcionamento regular do SNC. Estimula a síntese proteica muscular, sendo um importante regulador de metabolismo de nutrientes (Pavanelli, 2014; Vasconcelos et al., 2010; Berry, 2019; Huang et al., 2018).

Glicina

Importante para a síntese de ADN, fosfolípidos, colagénios e elastina. Essencial para a produção de glutathione e porfirina, componentes da hemoglobina. Útil para os atletas na medida em que atrasa a degeneração muscular, estimula a libertação da hormona de crescimento e o armazenamento de glicogénio. Melhora a qualidade do sono (Pavanelli, 2014; Vasconcelos et al., 2010; Berry, 2019; Huang et al., 2018).

Glutamina

Fonte primária de “combustível” para o trato intestinal. Controlo da síntese de glicogénio e degradação das proteínas. Atua no fortalecimento do sistema imunológico, restaura a mucosa intestinal, melhora a absorção de nutrientes e protege o organismo contra a entrada de microrganismos patogénicos (Pavanelli, 2014; Vasconcelos et al., 2010; Pimentel, 2016; Berry, 2019; Huang et al., 2018).

Prolina

Principal componente do colagénio, sendo um constituinte essencial para a manutenção e reparação da pele e outros tecidos (Pavanelli, 2014; Vasconcelos et al., 2010; Berry, 2019; Huang et al., 2018).

2.3.3. AMINOÁCIDOS NÃO ESSENCIAIS

Alanina

Fonte de energia para o fígado, músculos, cérebro e sistema nervoso (S. Huang et al., 2018).

Asparagina

Combustível metabólico para o intestino delgado, função digestiva. Protetora da integridade da mucosa (S. Huang et al., 2018).

Ácido Aspártico

Papel no desenvolvimento do sistema nervoso e na visão. Fonte de energia de atuação rápida. Responsável pela secreção e produção de hormonas, intervém na desintoxicação hepática e protege o sistema cardiovascular (Pavanelli, 2014; Vasconcelos et al., 2010; Berry, 2019; Huang et al., 2018).

Ácido Glutâmico

Sintetizado no organismo, encontra-se associado ao desenvolvimento do cérebro, sendo um importante neurotransmissor. Precursor para a síntese de neurotransmissores como o GABA. Permite a deteção de alterações química ao nível do trato gastrointestinal (Pavanelli, 2014; Vasconcelos et al., 2010; Berry, 2019; Huang et al., 2018).

Serina

Envolvido na síntese das purinas e pirimidinas. Precursor da glicina e cisteína. Importante nas sensações gustativas. Essencial na produção de fosfolípidos e ácido glicérido, componentes das membranas das células. Auxilia na produção de anticorpos, mantendo um sistema imunológico estável (Pavanelli, 2014; Vasconcelos et al., 2010; Berry, 2019; Huang et al., 2018).

Isoleucina, Leucina e Valina também conhecidos por aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA, do inglês *branched chain amino acids*) são aminoácidos essenciais com um papel fundamental nos atletas de alta competição. Estes aminoácidos são capazes de regular a taxa de síntese proteica e a degradação do músculo-esquelético. Favorecem a produção de energia extra ao músculo, pelo que o organismo liberta glicose mais lentamente na corrente sanguínea. Deste modo, há uma menor quantidade de glicogénio nos músculos, possuindo assim uma ação reguladora do glicogénio. Contribuem para a aceleração da recuperação dos danos musculares e retarda o início da fadiga induzido pelo exercício de elevada intensidade (Hernán, 2019; Wu, 2013).

2.3.4. IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE AMINOÁCIDOS NUM GÊNERO ALIMENTÍCIO

É importante analisar a concentração e o perfil de aminoácidos num género alimentício para avaliar a qualidade proteica do alimento. A concentração de aminoácidos permite ainda avaliar a capacidade de um produto alimentar suprir as necessidades em aminoácidos de um organismo.

A qualidade proteica de um alimento é limitada quando existem valores baixos de aminoácidos essenciais (U. Singh & Jambunathan, 1982). Para avaliar essa qualidade proteica faz-se um rácio percentual entre os aminoácidos essenciais e o total de aminoácidos (Ishaya & Aletor, 2019).

O score de aminoácidos é geralmente baseado em crianças pois estas requerem maiores quantidades de aminoácidos e melhor qualidade proteica na sua dieta (Ishaya & Aletor, 2019).

3. OBJETIVO

O objetivo desta dissertação foi avaliar a influência de dois tipos de processamento, a) germinação + liofilização e b) germinação + desidratação por aquecimento, no perfil de aminoácidos totais e livres de duas espécies de feijão, o Andu (*Cajanus cajan*) e o Mangalô (*Phaseolus lunatus*).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Bromatologia e Hidrologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, utilizando amostras de feijão Andu e Mangalô provenientes do Perú, adquiridas na cidade do Porto, Portugal.

4.1. REAGENTES E PADRÕES

4.1.1. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Fase móvel A: 10 mM Na₂HPO₄: 10 mM Na₂B₄O₇, pH 8.2: 5 mM NaN₃.

Para a preparação de 1L de solução, pesou-se 1,4g de Na₂HPO₄, 3,8g de Na₂B₄O₇ e 32mg de NaN₃ e adicionou-se água ultrapura, num frasco de vidro, suficiente para misturar todos os reagentes. Ajustou-se a um volume final de 1L com água ultrapura. Colocou-se a solução num agitador até completa dissolução dos cristais de borato. Por fim, acertou-se o pH da solução até pH 8,2, com HCl concentrado. Antes de utilizar, a solução foi filtrada através de uma membrana de celulose de 0,45 µm

Fase móvel B: Acetonitrilo: Metanol: Água (45:45:10)

Os solventes são específicos para HPLC e foram adquiridos à Agilent. A preparação desta fase móvel, consistiu na mistura dos solventes nas proporções indicadas para o volume desejado. Para preparação de 1L de solução, foram misturados 450 mL de acetonitrilo, 450 mL de metanol e 100 mL de água ultrapura própria para HPLC.

Preparação HCL 6M:

Preparação de HCl 6M a partir de HCl concentrado, sabendo que a densidade é de 1,18 g/cm³ e percentagem m/m 37%.

Supondo que 1L:

$$\rho = \frac{m}{v} \leftrightarrow 1,18 \times 1000 = 1180 \text{ g}$$

$$\% \frac{\text{massa soluto}}{\text{massa solução}} \times 100 \leftrightarrow 0,37 = \frac{\text{massa soluto}}{1180} \leftrightarrow \text{massa soluto} = 436,6\text{g}$$

$$C = \frac{m/MM}{1} \leftrightarrow C = \frac{436,6/36,46}{1} \leftrightarrow 11,97\text{M} \sim 12\text{M de ácido puro}$$

Para um volume de 200 mL:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f \leftrightarrow 12 \times V_i = 6 \times 200 \leftrightarrow V_i = 100 \text{ mL}$$

Pipetou-se 100 mL de ácido puro para um balão volumétrico e fez-se o volume com água desionizada.

Preparação KOH 4M:

Supondo que num volume de 1L:

$$C = \frac{n}{v} \leftrightarrow 4 = \frac{n}{1} \leftrightarrow n = 4$$

$$m = n \times MM \leftrightarrow m = 4 \times 56,11 \leftrightarrow m = 224,44 \text{ g para um litro de solução.}$$

4.1.2. PADRÕES

Foram utilizados como padrões de aminoácidos L-alanina (≥99,5%), monohidroclorido de L-arginina (≥99,0%), L-asparagina (≥99,0%), L-ácido aspártico (≥99,5%), L-cistina (≥99,0%), L-treonina (≥99,0%), L-triptofano (≥98,0%), L-tirosina (≥98,0%), L-valina (≥99,0%), L-leucina (≥98,0%), monohidrocloreto de L-lisina (≥99,0%), L-metionina (≥99,0%), L-fenilalanina (≥98,0%), L-prolina (≥99,0%), L-serina (≥99,0%), L-glutamina (≥99,5%), L-ácido glutâmico (≥99,0%), L-glicina (≥99,0%), monohidroclorido monohidratado de L-histidina (≥99,0%), L-isoleucina (≥99,0%), trans-4-hidroxiprolina (≥99,0%), solução de mistura de aminoácidos (material de referência certificado, Trace CERT®) foram adquiridos na Sigma Aldrich (Suíça) e L-norvalina adquirido na sigma (Alemanha).

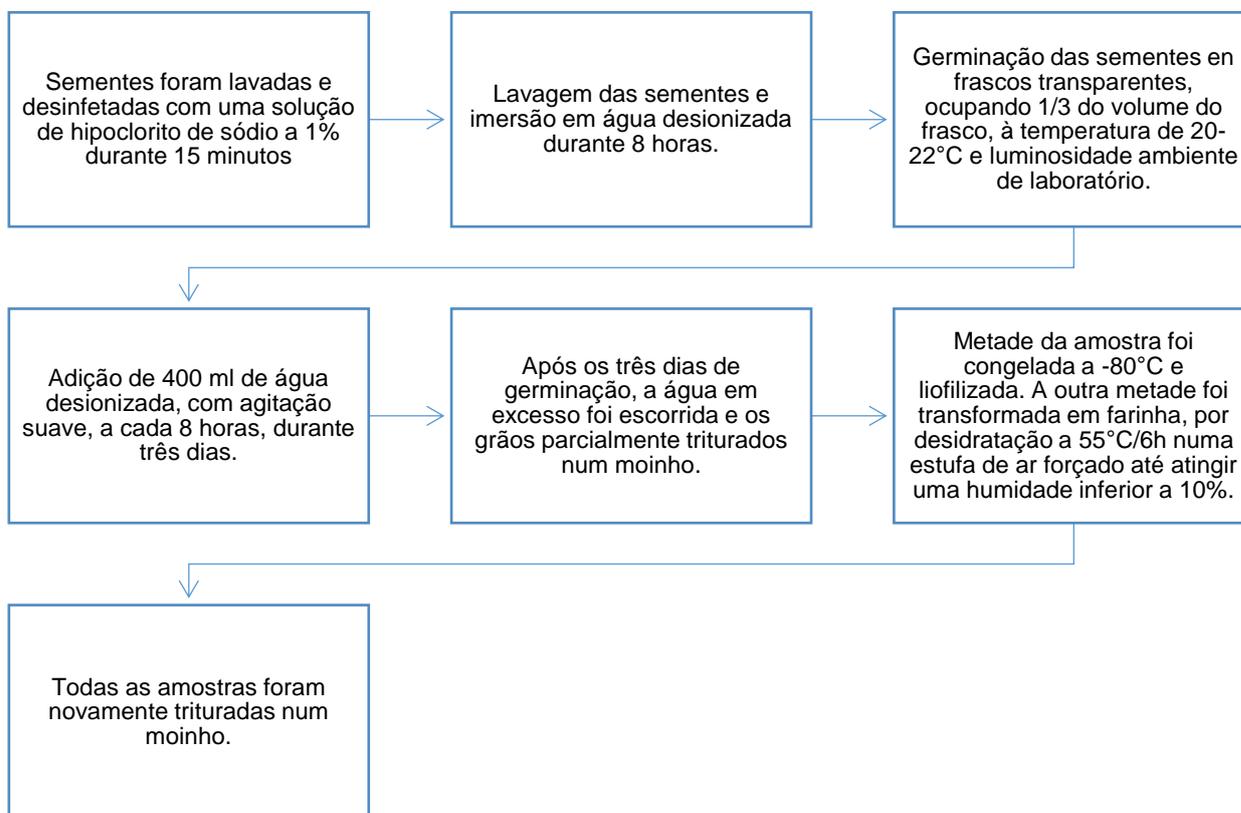
4.2. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Tabela 4- Preparação das amostras

Tipo de Amostra	Preparação
Semente <i>in natura</i>	As sementes foram trituradas em moinho (Mod Grindomix-GM200) e conservadas em frascos de vidro fechados até análise.
Germinado	As sementes foram germinadas sob condições controladas de luz, água e temperatura, de acordo com Berni e Canniatti-Brazaca, e posteriormente trituradas no moinho Grindomix GM 200 (Retsch, Hann, Germany), liofilizadas (Mod LIOTOP 101) e armazenadas em frascos herméticos à temperatura ambiente.
Farinha desidratada de germinado	Após germinação, uma parte da amostra, foi transformada em farinha por desidratação a 55 °C durante 6h em estufa de ar forçado (Mod TE-394/2) até obtenção de uma humidade inferior a 10%.

4.2.1. PROCESSO GERMINATIVO

Tabela 5 - Etapas germinação das amostras.



4.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.3.1. ANÁLISE DO TEOR DE HUMIDADE

A análise do teor de humidade das amostras foi realizada instrumentalmente, utilizando o medidor de humidade DBS60-3 da Kern, com sistema de aquecimento de vidro de quartzo halogéneo de 400 W. Para a análise, pesaram-se aproximadamente 1,5 g de amostra moída que foi submetida a uma temperatura de aproximadamente 105 °C até obtenção de uma massa constante. A análise foi realizada em triplicado. Os resultados são expressos em %.

4.3.2. ANÁLISE QUANTITATIVA DOS AMINOÁCIDOS

Os perfis de aminoácidos livres e totais foram determinados de acordo com o método descrito por Machado et al. (2020).

4.3.2.1. Extração Aminoácidos Livres

A extração dos aminoácidos livres foi realizada em duplicado para cada amostra em estudo. Pesaram-se 250 mg de amostra para um tubo de vidro (Figura 1), aos quais foram adicionados 10 mL de água desionizada. A extração ocorreu sob agitação rotativa no *multi-rotator* (Multi RS-60, Biosan, Letónia) (Figura 2) durante 30 minutos. Após agitação, as amostras foram centrifugadas (Heraeus Magafuge 16, Thermo Scientific, EUA) (Figura 3), durante 10 minutos a 4000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi extraído para um tubo de Falcon (Figura 4). Realizou-se uma re-extração das amostras, com adição de 5 mL de água desionizada e agitação no *multi-rotator* (Multi RS-60, Biosan, Letónia) durante 15 minutos, sob as mesmas condições da etapa anterior. Seguiu-se novamente outra etapa de centrifugação (Heraeus Magafuge 16, Thermo Scientific, EUA) da amostra a 4000 rpm durante 10 minutos. Separou-se o sobrenadante e adicionou-se ao sobrenadante reservado da primeira extração. O resultado da extração foi homogeneizado. Deste último, pipetou-se 1,5 mL para um eppendorf e procedeu-se a nova centrifugação (Biofuge pico, Heraeus, Alemanha), durante 10 minutos a 13000 rpm. De cada amostra, pipetou-se 990 µL de sobrenadante para um eppendorf, aos quais se adicionou 10 µL de padrão interno (norvalina, 2 mg/mL). Os extraídos foram posteriormente homogeneizados no vórtex (Reax top, Heidolph, Alemanha) e transferidos para vials de injeção.

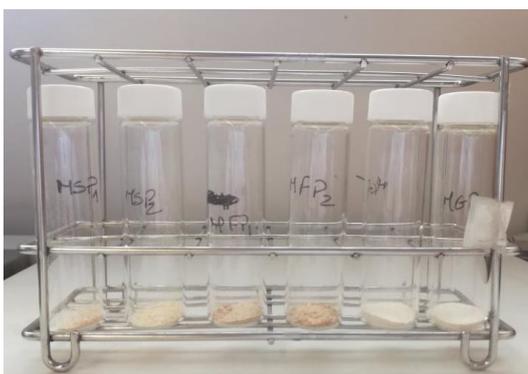


Figura 1-Pesagem amostras



Figura 2-Agitação amostras no multi-rotator

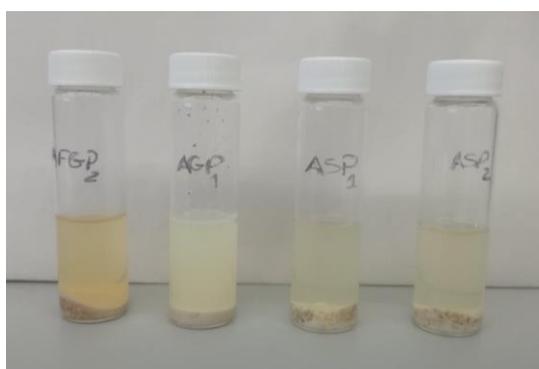


Figura 3-Amostras após centrifugação

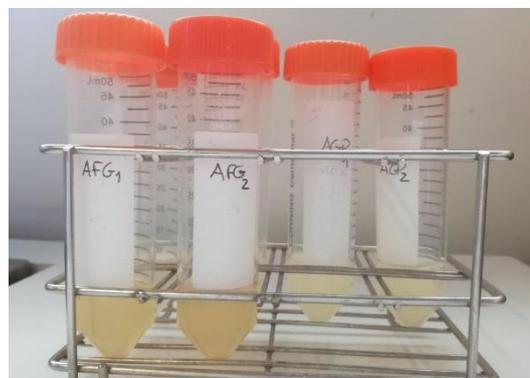


Figura 4-Sobrenadante após extração

4.3.2.2. Extração dos Aminoácidos Totais

Para a análise dos aminoácidos totais, foi necessário realizar dois tipos de hidrólises: em meio alcalino e em meio ácido. A hidrólise em meio alcalino tem por objetivo a extração e posterior quantificação do aminoácido triptofano, uma vez que este é degradado em meio ácido. A hidrólise em meio ácido é utilizada para a extração dos restantes aminoácidos.

HIDRÓLISE ALCALINA

Para a hidrólise alcalina, pesaram-se para tubos screw-cap 50 mg de cada amostra, às quais foram adicionados 3 mL de KOH 4M. Após a adição, removeu-se o oxigênio dos tubos com um fluxo de azoto (Figura 5) durante 3 minutos, com o intuito de evitar a destruição parcial da treonina e da serina e oxidação da cisteína e da metionina durante a hidrólise. Os tubos foram posteriormente colocados num bloco de aquecimento (Block Heater SBH130D/3, Stuart, Stafford, UK) (Figura 7), durante 4 horas, à temperatura de 110°C. Terminado o tempo de hidrólise, os tubos foram arrefecidos com água fria corrente para interromper a reação (Figura 8). De seguida, as amostras foram centrifugadas (Labofuge Ae centrifuge, Heraeus Sepatech, Germany), durante 10 minutos a 5000 rpm. Do sobrenadante resultante, foram retirados 50 µL para um eppendorf, aos quais foram adicionados 940 µL de HCL 0.1M e 10 µL de padrão interno (norvalina 2 mg/ml). A mistura foi homogeneizada no vórtex (Reax top, Heidolph, Alemanha) e novamente centrifugada (Heraeus Fresco 17 centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Germany) a 13000 rpm durante 10 min. Por fim, transferiu-se 950 µL de cada uma das amostras para um vial, colocado posteriormente no autosampler AS-4150 (Jasco, Japão) o qual realizou automaticamente a derivatização das amostras. Cada amostra foi hidrolisada em duplicado.

HIDRÓLISE ÁCIDA

Para a hidrólise ácida das amostras em análise, pesou-se 150 mg de cada uma para um tubo screw-cap e adicionou-se 3 ml de HCL 6M. Removeu-se o oxigênio por meio de um fluxo de azoto (Figura 5), três minutos em cada tubo. Posteriormente, colocou-se os tubos no bloco de aquecimento (Block Heater SBH130D/3, Stuart, Stafford, UK) (Figura 7) a 110°C durante 24h. Terminado o tempo de hidrólise, os tubos foram arrefecidos com água fria corrente para interromper a reação (Figura 8). De seguida, as amostras foram centrifugadas (Labofuge Ae centrifuge, Heraeus Sepatech, Germany), durante 10 minutos a 5000 rpm. Do sobrenadante resultante, foram retirados 50 µL para um eppendorf, aos quais foram adicionados 940 µL de tampão borato (pH 10.2) e 10 µL de padrão interno (norvalina 2 mg/ml). A mistura foi homogeneizada no vórtex (Reax top, Heidolph, Alemanha) e novamente centrifugada (Heraeus Fresco 17 centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Germany) a 13000 rpm durante 10 min. Por fim, transferiu-se 950 µL de cada uma das amostras para

um vial, colocado posteriormente no autosampler AS-4150 (Jasco, Japão) o qual realizou automaticamente a derivatização das amostras. As amostras foram hidrolisadas em duplicado.

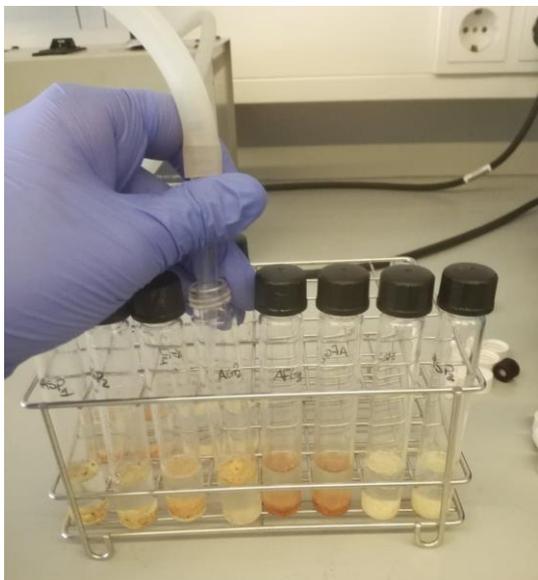


Figura 5- Remoção oxigênio com fluxo de azoto.



Figura 6- Amostras após adição de HCL e KOH.



Figura 7- Amostras no bloco de aquecimento - hidrólise



Figura 8- Amostras após hidrólise.

4.3.2.3. Análise cromatográfica dos aminoácidos livres e totais

O teor em aminoácidos presentes nas amostras foi analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (RP-HPLC).

O QUE É O RP-HPLC?

A cromatografia é uma técnica que permite a separação individual de componentes presentes numa amostra, por meio de duas fases: a fase móvel e a fase estacionária. A fase móvel consiste numa mistura de solvente e amostra que irá passar por uma fase estacionária, que é normalmente uma coluna. Os componentes da amostra são eluídos de acordo com a afinidade com a fase estacionária. Assim, os componentes que apresentam menor afinidade para a fase estacionária são primeiramente eluídos (Kumar et al., 2013).

Na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) uma pequena quantidade de amostra é injetada num loop, onde é misturada com o eluente, que é posteriormente forçado a passar por uma coluna revestida por uma fase estacionária apropriada, por intermédio de um fluxo de pressão elevada constante exercido por uma bomba. É na interação com a coluna que a separação dos componentes da amostra ocorre. A fase móvel é impulsionada por uma bomba a um fluxo constante a alta pressão. A utilização da alta pressão aumenta a eficiência da técnica na medida em que força a passagem da fase móvel por uma coluna coberta de pequenas partículas (Kumar et al., 2013).

Os componentes eluídos são detetados por um detetador de fluorescência acoplado ao HPLC, o que permite a quantificação da amostra (Kumar et al., 2013; Hesse & Weller, 2016).

Componentes HPLC (Kumar et al., 2013):

- Reservatórios para os eluentes após utilização;
- Uma bomba para impulsionar o eluente e a amostra;
- Um injetor da amostra;
- Uma coluna apropriada para o analito em análise;
- Um detetor para identificar os analitos separados;
- Um dispositivo de recolha e tratamento de dados;

O RP-HPLC utiliza uma fase estacionária não polar e uma fase aquosa moderadamente polar composta por um tampão e um solvente orgânico miscível em água (Kumar et al., 2013).

4.3.2.3.1. SISTEMA CROMATOGRÁFICO

No desenvolvimento deste trabalho laboratorial para a análise dos aminoácidos foi utilizado um sistema integrado da Jasco (Jasco, Japão) que integra um injetor automático (AS-4150) que efetua também a derivatização automática, duas bombas de alta pressão (PU-980 Plus), um detetor de fluorescência (FP-2020 Plus) e um detetor de díodos (MD-2015 Plus) (Machado et al., 2020).

4.3.2.3.2. DERIVATIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Previamente à separação dos compostos, estes foram derivatizadas com dois reagentes: o ortoftaldeído (OPA) e o 9-fluorenilmetoxicarbonilo (FMOC). A derivatização é um processo químico de modificação de compostos a fim de gerar novos produtos com melhores propriedades cromatográficas. Esta tem como objetivo diminuir a polaridade dos compostos e aumentar a sensibilidade e seletividade do detetor para os analitos em estudo (Schummer et al., 2009; Hesse & Weller, 2016).

Previamente à análise, todos os reagentes necessários foram verificados para que estes fossem suficientes para toda a análise cromatográfica. Os reagentes necessários para a derivatização foram colocados no equipamento em vials independentes (Machado et al., 2020):

- Tampão borato a pH 10.2;
- OPA/3-MPA;
- FMOC;
- Água ultrapura para diluição da amostra;
- Água ultrapura para lavagem da agulha entre reagentes.

O reagente OPA tem como função derivatizar as aminas primárias enquanto que o FMOC derivatiza as aminas secundárias neste caso, é responsável pela derivatização dos aminoácidos prolina e hidroxiprolina.

A utilização do reagente OPA na derivatização oferece vantagens como: preparação simples das amostras, reagentes e eluentes; rápida formação dos derivatizados e eficiência na separação cromatográfica à temperatura ambiente; fácil automatização; elevada sensibilidade de detecção (fmol); baixa incidência de reações de interferência; linha de base cromatográfica estável; regeneração rápida da coluna para as condições de corrida iniciais (Dai et al., 2014).

No processo de derivatização, todos os reagentes e a amostra são adicionados a uma vial de mistura, onde ocorre a reação de derivatização com duração de aproximadamente 7 minutos a 4°C (Machado et al., 2020).

O processo de derivatização ocorre automaticamente pela seguinte ordem (Machado et al., 2020):

1. Adição de 5 µL de tampão borato;
2. Adição de 1 µL de amostra à vial de reação;
3. Homogeneização da amostra e tampão borato;
4. Lavagem da agulha em água ultrapura;
5. Adição do primeiro reagente de derivatização (OPA/3-MPA) à mix de reação;
6. Homogeneização da solução;
7. Lavagem da agulha em água ultrapura;
8. Adição do segundo reagente de derivatização (FMOC);
9. Nova homogeneização da solução por borbulhação desta com o ar;
10. Lavagem da agulha em água ultrapura;
11. Diluição da amostra com 30 µL de água ultrapura;
12. Homogeneização da mistura da vial;
13. Injeção de 3 µL de amostra derivatizada na coluna.

4.3.2.3.3. SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Anteriormente à injeção das amostras, deve-se garantir que a coluna está estável para a análise. Desta forma, a coluna deve ser preparada fazendo passar pela mesma uma sequência de água e eluentes a utilizar, até que esta estabilize a um fluxo constante, diminuindo assim a existência de picos interferentes.

Na separação cromatográfica foi utilizada uma fase móvel constituída por dois eluentes: um eluente A (solução de hidrogenofosfato dissódico 10 mM, tetraborato de sódio 10 mM e

azida de sódio 5 mM ajustada a pH 8,2) e um eluente B (mistura de acetonitrilo, metanol e água na proporção 45:45:10 (v/v/v)). A fase estacionária consistiu numa coluna (Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 5µm, 4,6x 250 mm, EUA) mantida a uma temperatura constante de $40 \pm 0,1^\circ\text{C}$, a um fluxo de 1,5 mL/min (Machado et al., 2020). O sistema de gradiente foi preparado de acordo com o descrito por Machado et al. (2020) e apresenta-se na Tabela 6.

Tabela 6- Gradiente

Tempo de Retenção (min)	% Eluente A	% Eluente B
0	98	2
0.85	98	2
33.4	43	57
33.5	15	85
39.3	15	85
39.4	98	2
40.0	98	2

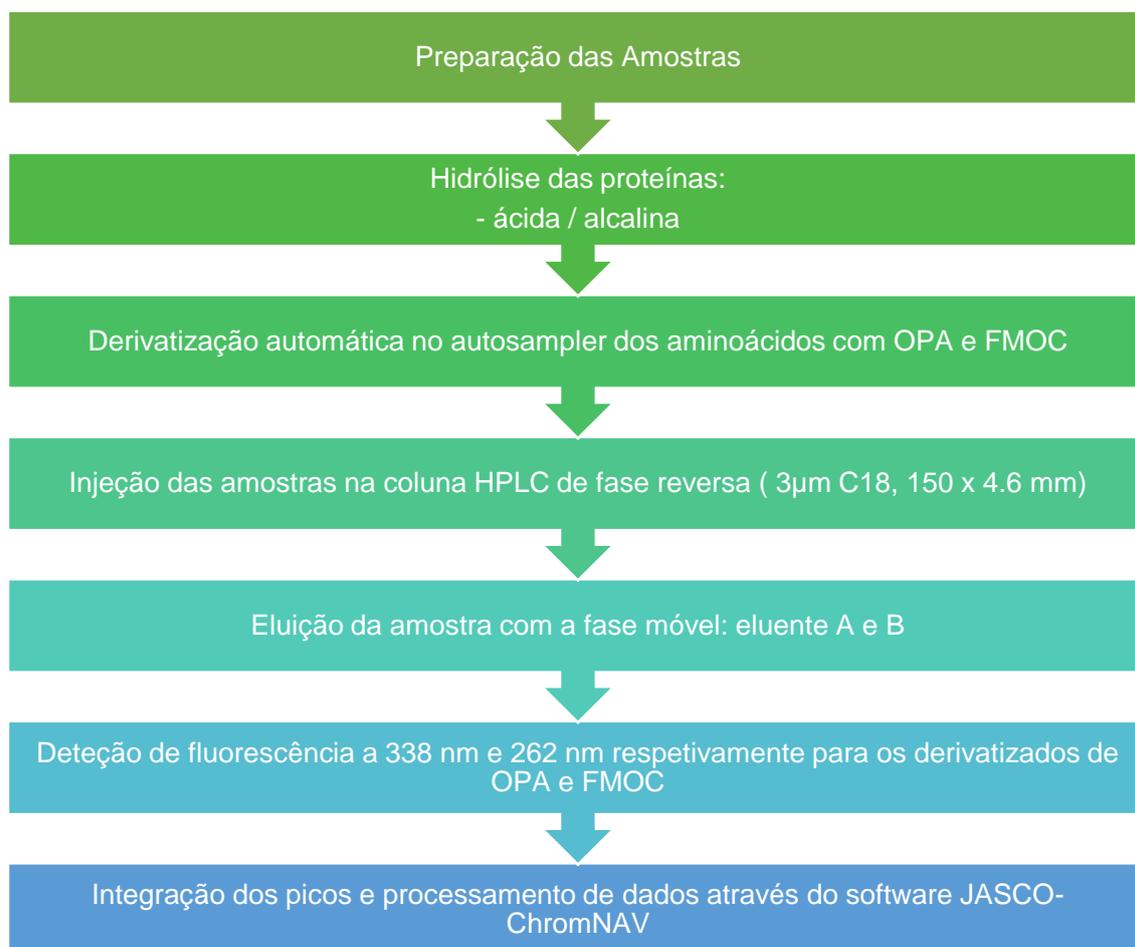
4.3.2.3.4. DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

A fluorescência foi monitorizada a $\lambda_{\text{excitação}}=340 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{emissão}}=450 \text{ nm}$ (de 0.0 a 26.2) para os derivatizados de OPA, e a $\lambda_{\text{excitação}}=266 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{emissão}}=305 \text{ nm}$ (de 26.2 a 40.0) para os derivatizados de FMOC.

Os dados cromatográficos obtidos foram analisados com o software JASCO-ChromNAV (Versão 2.02.08). O perfil de aminoácidos foi identificado de acordo com o tempo retenção comparativamente ao padrão correspondente.

A quantidade de aminoácido presente na amostra é diretamente proporcional ao sinal de fluorescência, sendo convertida em concentração por extrapolação dos resultados através da utilização de uma curva de calibração para cada um dos aminoácidos, recorrendo ao método do padrão interno (norvalina 2 mg/ml). Para a construção da curva de calibração foram utilizadas várias gamas de concentrações decrescentes de padrões de cada aminoácido.

SÍNTESE ETAPAS RP-HPLC



4.3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o software IBM SPSS Statistics versão 26 (IBM corp., Armonk, Nova Iorque). Os valores médios obtidos nas determinações efetuadas foram comparados por análise de variância a um fator (One-way ANOVA). Quando as diferenças entre as médias foram estatisticamente diferentes, recorreu-se a um teste post-hoc de Tukey, com um nível de significância igual a 5% ($\alpha = 0,05$). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os resultados apresentados encontram-se expressos como média e desvio padrão ($n=4$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISE DOS AMINOÁCIDOS LIVRES

A proporção de aminoácidos livres numa amostra é muito inferior à proporção de aminoácidos totais, pelo que têm uma influência reduzida na dieta. A composição em aminoácidos livres dos feijões Andu e Mangalô nos diferentes estados (semente *in natura*, sementes germinadas e farinha desidratada de germinado) é apresentada na Tabela 7.

A análise dos resultados permite verificar que existem diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) na composição de aminoácidos livres entre as duas espécies e entre o tipo de processamento. Nas amostras em estudo, os valores de aminoácidos livres variaram entre os $475,9 \pm 13,9$ e $3616,8 \pm 173,9$ mg/100g de peso seco (Gráfico 1).

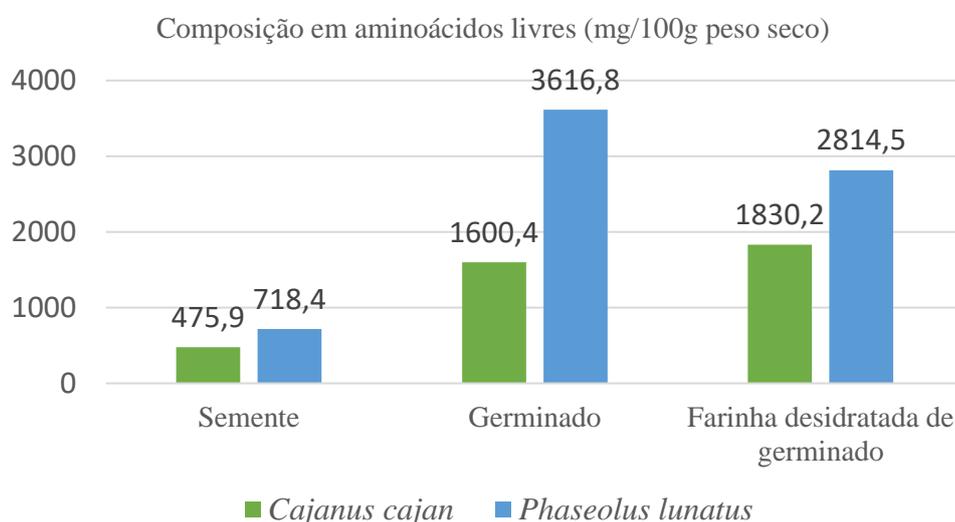


Gráfico 1. Composição em aminoácidos livres (mg/100g de peso seco)

Na análise dos resultados da espécie *C. cajan* constata-se que existem diferenças nas concentrações de aminoácidos livres entre as 3 formas da semente, sendo estas diferenças estatisticamente significativas.

A semente do feijão Andu revelou, de uma forma geral, concentrações individuais de cada aminoácido livre inferiores às das amostras germinado e farinha desidratada de germinado, à exceção dos aminoácidos ácido aspártico e hidroxiprolina (Gráfico 2), indicando uma variação estatisticamente significativa do teor de aminoácidos durante o processo germinativo, o que está de acordo com Aragão (2013) que observou menores teores de aminoácidos livres na semente madura e um aumento do conteúdo de aminoácidos e diminuição do teor proteico durante o evento germinativo das semente de *C. fissillis*.

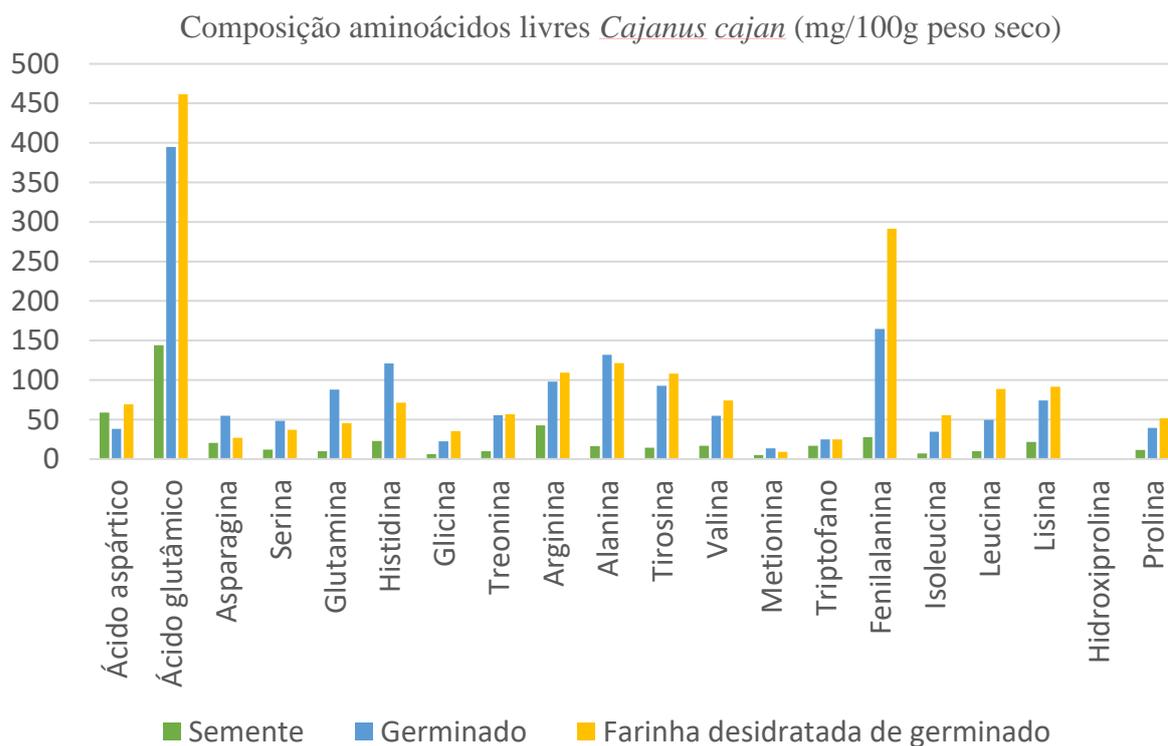


Gráfico 2. Composição aminoácidos livres *Cajanus cajan* (mg/100g de peso seco)

O aumento dos teores de aminoácidos livres totais durante a germinação pode dever-se à ação de enzimas que catalisam reações de proteólise das proteínas armazenadas convertendo-as em péptidos solúveis que, por sua vez, podem ser facilmente convertidos em aminoácidos. Este aumento pode ainda estar relacionado com a degradação proteica que se verifica nos primeiros dias de germinação, ou com a mobilização das reservas proteicas das sementes para a produção de aminoácidos intervenientes no processo germinativo (Aragão, 2013; Sozer et al., 2016).

Na semente *in natura* de *C. cajan*, registou-se uma maior concentração de ácido glutâmico e ácido aspártico, respetivamente $144,2 \pm 5,3$ e $58,9 \pm 1,7$ mg/ 100 g de peso seco, estando de acordo com os resultados encontrados por (Walter et al., 2008), no qual os aminoácidos livres predominantes no arroz foram o aspartato e o glutamato. No entanto, no estudo desenvolvido por Walter et al. (2008), no qual a soma do teor de ácido glutâmico e ácido aspártico totalizava 60% do total de aminoácidos livres, na semente de *C. cajan* apenas representa 42%.

Os aminoácidos presentes em menor quantidade na semente de *C. cajan* foram a hidroxiprolina ($0,51 \pm 0,02$ mg/100g de peso seco), a metionina ($4,99 \pm 0,16$ mg/100g peso seco) e a glicina ($6,32 \pm 0,85$ mg/100g peso seco) (Gráfico 2).

Por outro lado, na amostra germinado encontraram-se concentrações mais elevadas de ácido glutâmico ($394,6 \pm 10,5$ mg/100g peso seco), fenilalanina ($164,5 \pm 4,6$ mg/100g peso seco), alanina ($131,7 \pm 3,8$ mg/100g peso seco) e histidina ($121,0 \pm 3,4$ mg/100g peso seco). O aumento do ácido glutâmico pode dever-se ao facto deste aminoácido ser essencial no processo germinativo, nomeadamente nas reações de transaminação. No início da germinação há um aumento de tirosina que é degradada formando alanina e ácido glutâmico, o que pode justificar o aumento destes dois aminoácidos na amostra germinada Aragão (2013). O aumento dos teores de alanina foi verificado por Kim et al. (2013) durante o processo de germinação da soja. Os teores de fenilalanina aumentaram durante a germinação uma vez que este aminoácido tem como função auxiliar a utilização de outros aminoácidos importantes para o crescimento e desenvolvimento da semente germinada (S. Huang et al., 2018).

Os aminoácidos hidroxiprolina, metionina, glicina e triptofano apresentaram menor concentração na amostra germinada.

Finalmente, a farinha desidratada de germinado foi a amostra da espécie *C. cajan* que apresentou a maior concentração de aminoácidos livres, com $1830,2 \pm 67,9$ mg/100g peso seco, o que indica que o processo de germinação seguido de desidratação promoveu um aumento significativo ($p < 0.05$) do teor total de aminoácidos livres.

A espécie *P. lunatus* apresentou teores totais de aminoácidos livres superiores, tanto na amostra de germinado ($3616,8 \pm 173,9$ mg/100 g peso seco) como na farinha desidratada de germinado ($2814,5 \pm 48,0$ mg/100g de peso seco), quando comparada com a espécie *C. cajan* que continha, respetivamente, $1600,4 \pm 52,7$ e $1830,2 \pm 67,9$ mg/100 g de peso seco.

Em ambas as espécies, a soma dos aminoácidos livres foi menor na semente ($718,4 \pm 12,8$ mg/100 g de peso seco) para a espécie *P. lunatus* e ($475,9 \pm 13,9$ mg/100 g de peso seco) para a espécie *C. cajan*.

Tal como para o *C. cajan*, a semente do feijão Mangalô contém teores de aminoácidos livres inferiores em comparação com a amostra germinado e farinha desidratada de germinado, sendo estas diferenças estatisticamente significativas. Os resultados obtidos estão de acordo com Huang et al. (2017) e Huang et al. (2018), que analisaram sementes in natura e sementes germinadas de soja, e verificaram que o teor de aminoácidos livres presente na semente de soja germinada era superior ao teor de aminoácidos livres na semente *in natura*, e com Kim et al. (2013) e Vidal-Valverde et al. (2002) que indicaram um aumento do teor de aminoácidos livres em leguminosas como o feijão, lentilhas e ervilhas.

Na semente *in natura* do *P. lunatus*, os aminoácidos presentes em maior concentração foram a arginina, seguida da asparagina. Estes aminoácidos foram distintos dos aminoácidos mais abundantes na semente de *C. cajan*, o que mostra que mesmo sendo ambos feijões, o perfil de aminoácidos varia com a espécie, localização e condições de cultivo (Ribeiro et al., 2007). Nesta amostra, não foi possível detetar o aminoácido essencial histidina. Por sua vez, a forma germinada de *P. lunatus* apresentou teores superiores em todos os aminoácidos em estudo comparativamente à semente com exceção dos aminoácidos ácido aspártico e hidroxiprolina, sendo estas diferenças estatisticamente significativas. Os aminoácidos mais abundantes foram a arginina ($466,0 \pm 22,0$ mg/100g peso seco), o ácido glutâmico ($369,3 \pm 18,6$ mg/100g peso seco) e a alanina ($341,3 \pm 15,9$ mg/100g peso seco) como se verifica no gráfico 3. Como minoritários, observam-se a hidroxiprolina, o triptofano e a metionina.

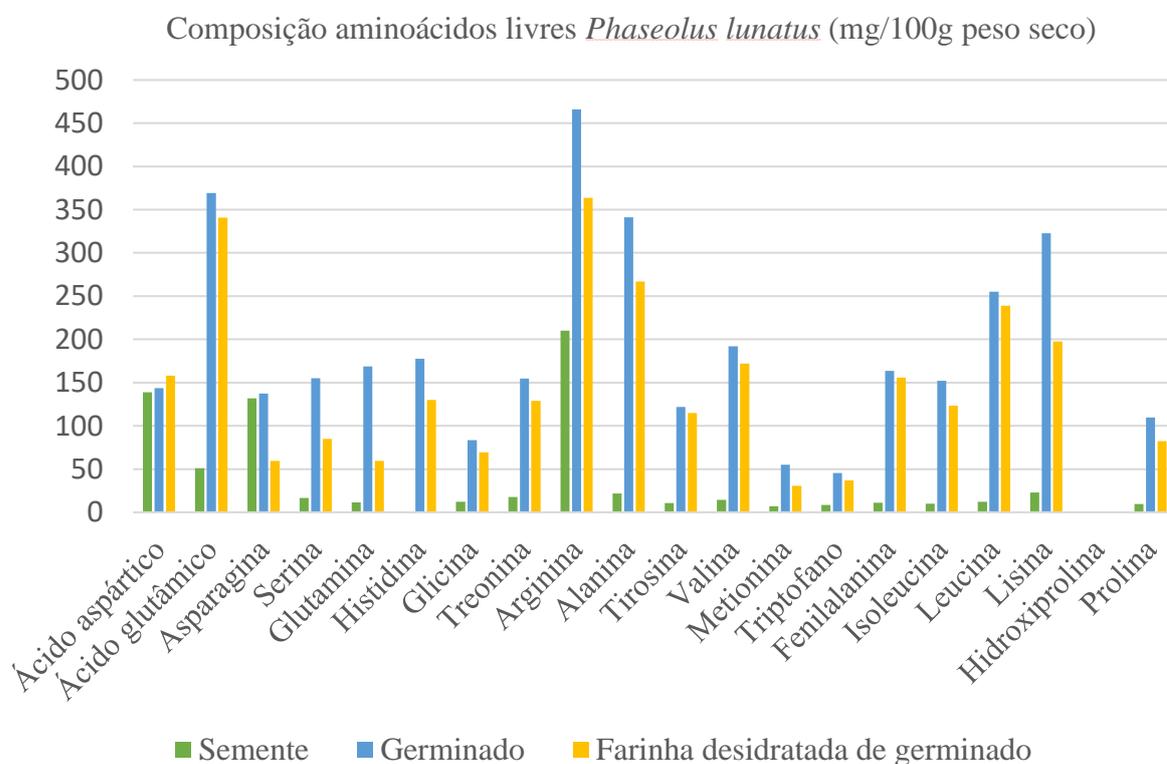


Gráfico 3. Composição aminoácidos livres *Phaseolus lunatus* (mg/100g de peso seco)

No que diz respeito à farinha desidratada de germinado do *P. lunatus*, esta revelou concentrações intermédias em comparação com a semente e com o germinado. Os aminoácidos mais abundantes foram a arginina ($363,7 \pm 5,3$ mg/100g de peso seco) > ácido glutâmico ($341,0 \pm 4,4$ mg/100g de peso seco) > alanina ($267,0 \pm 3,8$ mg/100g de peso seco), ou seja, os mesmos aminoácidos que estavam presentes em maior concentração na amostra de germinado, embora apresentem diferenças estatisticamente significativas entre

si. Os aminoácidos hidroxiprolina, metionina e triptofano representam teores limitantes, tal como na amostra de germinado.

Em comparação com as restantes cinco amostras, o germinado de *P. lunatus* apresentou proporções individuais de aminoácidos superiores em todos os aminoácidos em estudo, com a exceção dos aminoácidos ácido aspártico, ácido glutâmico e hidroxiprolina. Estas diferenças foram estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

Contrariamente ao que ocorreu na espécie *C. cajan*, em que a maior concentração em aminoácidos livres encontrada foi na amostra da farinha desidratada de germinado, na espécie *P. lunatus* a maior concentração de aminoácidos verificou-se na amostra germinado, o que pode dever-se a reações Maillard que correspondem a reações entre aminoácidos e hidratos de carbono ou entre proteínas e hidratos de carbono quando o alimento é aquecido, o que pode ter contribuído para a perda de aminoácidos livres. Estas reações ocorrem mais facilmente em alimentos com elevados teores de lisina como as leguminosas, uma vez que a lisina é cerca de duas a três vezes mais reativa que outros aminoácidos devido à presença de grupamentos amino ϵ com glicose, lactose e maltose (Delgado-Andrade et al., 2007). O aparecimento destas reações destaca a necessidade de adaptar o método de processamento e/ou conservação em função do tipo de amostra.

Tabela 7- Perfil de aminoácidos livres expressos em mg aminoácido/ 100g peso seco.

Aminoácidos	Feijão Andu (<i>Cajanus cajan</i>)			Feijão Mangalô (<i>Phaseolus lunatus</i>)		
	Semente	Germinado	Farinha desidratada de germinado	Semente	Germinado	Farinha desidratada de germinado
Ácido Aspártico	58,87 ± 1,68 ^{b,D}	38,28 ± 1,44 ^{c,E}	69,37 ± 2,47 ^{a,C}	138,89 ± 0,65 ^{b,B}	143,74 ± 7,63 ^{b,B}	157,96 ± 3,74 ^{a,A}
Ácido Glutâmico	144,18 ± 5,30 ^{c,D}	394,64 ± 10,45 ^{b,B}	461,59 ± 18,48 ^{a,A}	51,04 ± 0,28 ^{c,E}	369,31 ± 18,62 ^{a,B}	340,97 ± 4,40 ^{b,C}
Asparagina	20,38 ± 0,46 ^{c,D}	54,73 ± 2,42 ^{a,B}	26,90 ± 0,91 ^{b,C}	131,70 ± 1,23 ^{a,A}	137,50 ± 6,01 ^{a,A}	59,55 ± 1,42 ^{b,B}
Serina	11,89 ± 0,47 ^{c,E}	48,19 ± 2,36 ^{a,C}	37,18 ± 1,28 ^{b,D}	16,52 ± 0,39 ^{c,E}	155,11 ± 8,02 ^{a,A}	84,98 ± 1,22 ^{b,B}
Glutamina	9,97 ± 0,36 ^{c,E}	88,00 ± 2,06 ^{a,B}	45,37 ± 1,43 ^{b,D}	11,24 ± 0,16 ^{c,E}	168,76 ± 7,30 ^{a,A}	59,38 ± 0,98 ^{b,C}
Histidina	22,81 ± 1,08 ^{c,D}	120,98 ± 3,37 ^{a,B}	71,41 ± 3,10 ^{b,C}	n.d.	177,65 ± 6,37 ^{a,A}	130,05 ± 6,53 ^{b,B}
Glicina	6,32 ± 0,85 ^{c,F}	22,40 ± 0,97 ^{b,D}	35,36 ± 1,29 ^{a,C}	12,20 ± 0,53 ^{c,E}	83,34 ± 5,11 ^{a,A}	69,48 ± 0,99 ^{b,B}
Treonina	9,88 ± 0,25 ^{b,E}	55,41 ± 1,50 ^{a,C}	56,94 ± 2,04 ^{a,C}	17,83 ± 0,40 ^{c,D}	154,78 ± 7,22 ^{a,A}	128,68 ± 1,57 ^{b,B}
Arginina	42,69 ± 1,58 ^{c,E}	97,89 ± 3,12 ^{b,D}	109,30 ± 4,53 ^{a,D}	210,03 ± 6,96 ^{c,C}	466,00 ± 22,01 ^{a,A}	363,71 ± 5,28 ^{b,B}
Alanina	16,60 ± 0,50 ^{c,D}	131,74 ± 3,81 ^{a,C}	121,30 ± 4,92 ^{b,C}	21,84 ± 0,50 ^{c,D}	341,33 ± 15,91 ^{a,A}	267,00 ± 3,75 ^{b,B}
Tirosina	14,39 ± 0,49 ^{c,D}	92,55 ± 2,90 ^{b,C}	108,18 ± 4,45 ^{a,B}	10,71 ± 0,26 ^{b,D}	121,99 ± 5,23 ^{a,A}	114,64 ± 4,00 ^{a,AB}
Valina	16,86 ± 0,85 ^{c,E}	54,83 ± 3,13 ^{b,D}	74,26 ± 2,89 ^{a,C}	14,28 ± 0,34 ^{c,E}	192,06 ± 9,24 ^{a,A}	171,95 ± 2,10 ^{b,B}
Metionina	4,99 ± 0,16 ^{c,E}	13,60 ± 0,53 ^{a,C}	8,99 ± 0,26 ^{b,D}	7,09 ± 0,13 ^{c,D}	55,02 ± 2,41 ^{a,A}	30,70 ± 0,56 ^{b,B}
Triptofano	16,71 ± 0,63 ^{b,D}	24,78 ± 0,67 ^{a,C}	25,01 ± 1,09 ^{a,C}	8,55 ± 0,18 ^{c,E}	45,50 ± 2,10 ^{a,A}	36,76 ± 0,47 ^{b,B}
Fenilalanina	27,63 ± 0,83 ^{c,C}	164,47 ± 4,60 ^{b,B}	291,28 ± 11,81 ^{a,A}	10,97 ± 0,24 ^{b,D}	163,67 ± 8,50 ^{a,B}	155,67 ± 3,03 ^{a,B}
Isoleucina	7,31 ± 0,18 ^{c,E}	34,44 ± 1,30 ^{b,D}	55,41 ± 1,94 ^{a,C}	9,78 ± 0,25 ^{c,E}	152,24 ± 7,25 ^{a,A}	123,23 ± 3,03 ^{b,B}
Leucina	9,81 ± 0,55 ^{c,E}	49,63 ± 2,03 ^{b,D}	88,54 ± 3,61 ^{a,C}	11,98 ± 0,38 ^{c,E}	255,18 ± 12,55 ^{a,A}	238,74 ± 4,42 ^{b,B}
Lisina	21,66 ± 2,59 ^{c,E}	74,01 ± 4,60 ^{b,D}	91,62 ± 1,75 ^{a,C}	23,03 ± 2,12 ^{c,E}	322,57 ± 21,30 ^{a,A}	197,68 ± 5,68 ^{b,B}
Hidroxiprolina	0,51 ± 0,02 ^{a,D}	0,44 ± 0,02 ^{b,D}	0,49 ± 0,02 ^{a,D}	1,15 ± 0,04 ^{a,A}	0,86 ± 0,04 ^{c,C}	1,01 ± 0,08 ^{b,B}
Prolina	11,69 ± 0,94 ^{c,E}	39,35 ± 2,25 ^{b,D}	51,70 ± 1,49 ^{a,C}	9,55 ± 0,41 ^{c,E}	109,48 ± 7,04 ^{a,A}	82,38 ± 6,67 ^{b,B}
ΣAAL	475,9 ± 13,9 ^{c,F}	1600,4 ± 52,7 ^{b,D}	1830,2 ± 67,9 ^{a,C}	718,4 ± 12,8 ^{c,E}	3616,8 ± 173,9 ^{a,A}	2814,5 ± 48,0 ^{b,B}

Dados expressos em média ± desvio-padrão (n=4). Em cada linha, letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas (p<0,05) entre as 3 amostras de cada espécie de feijão (dados de cada espécie analisados individualmente). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas (p<0,05) entre as 6 amostras analisadas.

5.2. ANÁLISE DOS AMINOÁCIDOS TOTAIS

A composição em aminoácidos totais do feijão Andu e feijão Mangalô nos três estados (semente *in natura*, sementes germinadas e farinha das sementes germinadas) é apresentada na Tabela 8.

A análise dos resultados permite verificar que ambas as espécies apresentam um perfil de aminoácidos semelhante, embora existam para alguns aminoácidos diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

O teor proteico de um alimento pode ser determinado, na maior parte das vezes, recorrendo a duas metodologias: ao método Kjeldahl e ao somatório dos aminoácidos totais.

O método Kjeldahl é um método antigo e de referência para a determinação dos teores de proteína bruta presentes nos alimentos. Este método baseia-se no facto de que as proteínas são constituídas por aproximadamente 16 % de azoto, assim, ao determinar indiretamente o conteúdo em azoto de uma amostra e multiplicar o valor pelo fator de conversão 6,25 obtém-se o teor proteico bruto. No entanto, este método não possibilita a distinção do conteúdo em azoto proteico e não-proteico (correspondente a compostos de azoto como ácidos nucleicos, bases de purina e pirimidinas) (Aremu et al., 2017; M. Souza et al., 2016).

A quantidade/qualidade proteica de um alimento pode atualmente ser averiguada através da análise dos aminoácidos presentes na amostra. Sendo que, o somatório dos aminoácidos totais constitui uma metodologia para determinar o teor proteico real, não existindo a interferência de compostos de azoto não-proteico, como no método Kjeldahl. Para além disso, a determinação dos aminoácidos totais por HPLC tem vantagens como a rapidez, sensibilidade, robustez e reprodutibilidade (Machado et al., 2020; Otter, 2012).

Relativamente ao somatório dos aminoácidos totais de todas as amostras de *C. cajan*, a farinha desidratada de germinado apresentou o teor mais elevado ($19,6 \pm 1,4$ g/100g de peso seco), comparativamente com a semente ($18,1 \pm 0,6$ g/100g de peso seco) e o germinado ($18,6 \pm 2,4$ g/100g de peso seco) (Gráfico 4). Apesar destas diferenças nos teores médios, estas não se revelaram estatisticamente significativas.

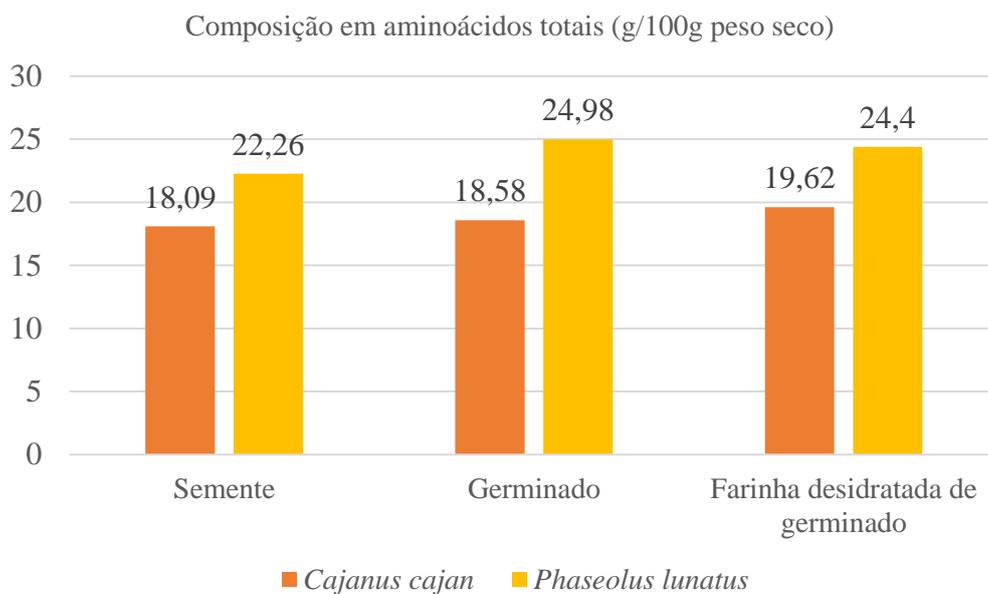


Gráfico 4. Composição em aminoácidos totais (g/100g de peso seco)

Comparando o somatório dos aminoácidos totais das amostras de *C. cajan* com o valor de proteína total determinado num estudo anterior para a mesma amostra (Benevides et al., 2019), verifica-se que o valor determinado através da presente metodologia foi inferior. Além disso, contrariamente ao estudo de Benevides et al. (2019), em que a amostra de semente foi a que apresentou maior teor proteico ($22,1 \pm 0,2\%$), seguida da amostra de farinha desidratada de germinado ($21,3 \pm 0,2\%$) e da amostra germinado ($20,5 \pm 0,0\%$), no presente trabalho foi a amostra de germinado que obteve um maior valor de aminoácidos totais ($19,6 \pm 1,4$ g/100g de peso seco). Estas diferenças podem dever-se ao método de determinação do teor proteico. No estudo realizado por Benevides et al. (2019) o teor proteico total foi determinado pelo método de Kjeldahl, enquanto que o valor proteico no presente estudo foi determinado pelo somatório dos aminoácidos totais.

A soma dos aminoácidos totais, contrariamente ao método de Kjeldahl (no qual se considera o azoto proteico e não proteico), permite calcular o conteúdo proteico real. Os resultados obtidos neste estudo revelam mostram que as leguminosas são uma fonte de aminoácidos relevante com potencial para serem utilizadas em produtos alimentares e suplementos com o intuito de melhorar as características nutricionais dos alimentos e promover um melhor desempenho pelos consumidores (Machado et al., 2020).

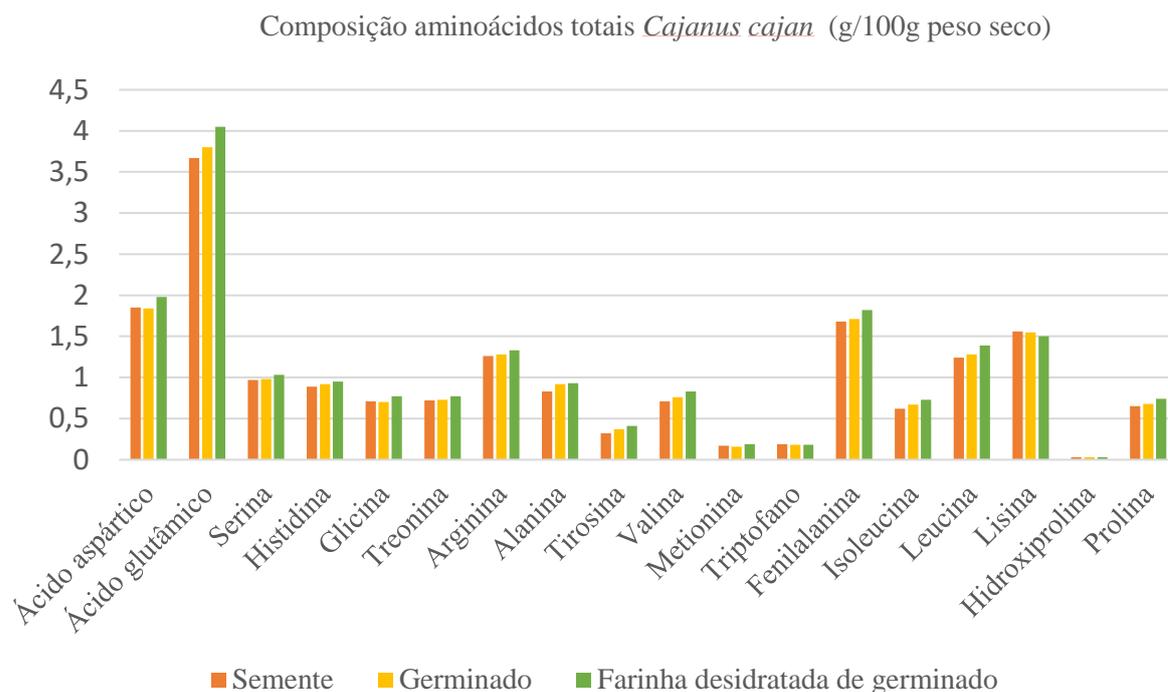


Gráfico 5. Composição aminoácidos totais *Cajanus cajan* (g/1000g de peso seco)

Relativamente à semente, os aminoácidos mais abundantes foram o ácido glutâmico ($3,7 \pm 0,1$ g/100g de peso seco), o ácido aspártico ($3,7 \pm 0,1$ g/100g de peso seco), a fenilalanina (1,7 g/100g de peso seco), a lisina ($1,6 \pm 0,1$ g/100g de peso seco) e a arginina ($1,3 \pm 0,0$ g/100g de peso seco)(Gráfico 5).

Iqbal et al. (2006) estudou a composição de aminoácidos de quatro leguminosas, o grão de bico, feijão-frade, lentilha e ervilha. O feijão-frade foi o que apresentou uma composição mais semelhante aos feijões Andu e Mangalô. A análise do perfil de aminoácidos do feijão-frade permitiu verificar que a maior percentagem de aminoácido pertencia ao ácido glutâmico (17,2%), seguido do ácido aspártico (10,8%), seguido da lisina, arginina e fenilalanina com (7,5%) cada, sendo estes semelhantes aos resultados encontrados neste trabalho.

Os aminoácidos menos abundantes na semente foram a hidroxiprolina, a metionina e o triptofano, o que está também de acordo com Sharma et al. (2011), que após análise do perfil de aminoácidos do *C.cajan* reportou que a metionina, a cisteína, o triptofano e a treonina foram os aminoácidos essenciais limitantes.

Estudos realizados com isolados proteicos da espécie *C. cajan* observaram que os aminoácidos mais abundantes foram o ácido glutâmico ($121,22 \pm 0,02$ mg/g) e o ácido aspártico ($114,41 \pm 0,02$ mg/g), o que está de acordo com os resultados obtidos neste estudo. Contudo, os teores de aminoácidos encontrados foram superiores aos obtidos no

presente trabalho, ácido glutâmico ($3,67 \pm 0,12$ g/100g) e o ácido aspártico ($1,85 \pm 0,06$ g/100g), o que pode dever-se ao facto de Ishaya & Aletor et al. (2019) terem analisado isolados proteicos que correspondem a refinados a partir de proteínas, contendo uma maior quantidade de proteína com melhor digestibilidade.

Relativamente à amostra germinado, o perfil de aminoácidos foi semelhante ao perfil encontrado na semente e na farinha desidratada germinadas da mesma espécie.

Os teores de lisina, fenilalanina e tirosina, apesar de presentes em proporções significativas em todas as amostras do estudo, revelaram variações entre as duas espécies de feijão, o que poderá estar relacionado essencialmente com a espécie, mas também com a localização e com o ambiente de cultivo, como referido na literatura por (Ribeiro et al., 2007).

Os aminoácidos essenciais presentes em maior concentração nos três estados em estudo da espécie *C. cajan* foram por ordem decrescente, a fenilalanina, a lisina e a leucina (Gráfico 6), o que está de acordo com o descrito por Oshodi et al. (1993) que também descreve que a fenilalanina, a leucina e a lisina foram os aminoácidos essenciais encontrados em maior quantidade na análise da composição de aminoácidos da espécie *C.cajan*.

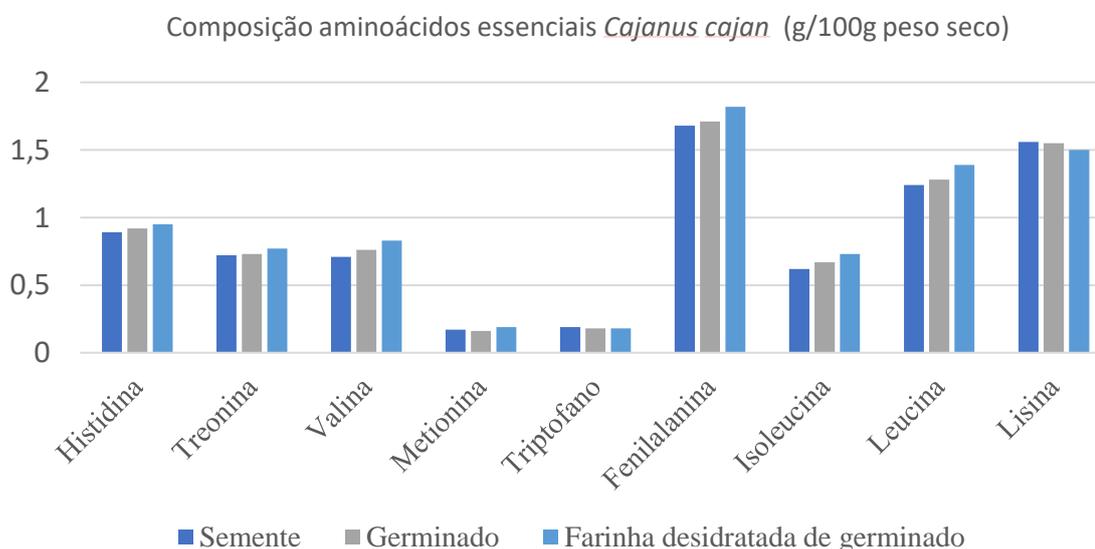


Gráfico 6. Composição aminoácidos essenciais *Cajanus cajan* (g/100g de peso seco)

Os elevados teores de lisina encontrados são benéficos para a saúde, uma vez que a lisina tem um papel importante na construção muscular, manutenção da estrutura/densidade óssea, recuperação de lesões, regulação de hormonas, anticorpos e enzimas. (Berry, 2019; S. Huang et al., 2018; Pimentel, 2016).

Os elevados teores de lisina encontrados nas amostras de feijão e baixos teores de aminoácidos sulfurados como a metionina e cisteína, revelam que o consumo desta leguminosa juntamente com os cereais poderá ser uma estratégia de obtenção de uma proteína completa uma vez que, as proteínas dos cereais são ricas em metionina e cisteína e pobres em lisina (Sozer et al., 2016).

A análise dos aminoácidos essenciais permite afirmar que a semente, embora tenha uma concentração de aminoácidos inferior ao germinado e à farinha desidratada de germinado, apresenta uma maior percentagem de aminoácidos essenciais ($43,1 \pm 0,1\%$) e menor percentagem de aminoácidos não essenciais ($56,9 \pm 0,1\%$). Estas diferenças podem dever-se à utilização dos aminoácidos essenciais no processo germinativo como transportadores de azoto, como maquinaria para a síntese proteica, como intermediários. Por exemplo, a treonina é um aminoácido essencial que ao converter-se em isoleucina, participa na produção de energia celular e processos de fotorrespiração (Aragão, 2013). A amostra farinha desidratada de germinado, por oposição, contém maior concentração de aminoácidos totais, comparativamente com os outros dois estados, mas uma menor percentagem de aminoácidos essenciais, apresentando conseqüentemente o menor rácio entre AAE/AANE, o que indica que a germinação promoveu o aumento do valor total de aminoácidos, através do aumento da concentração de aminoácidos não essenciais, tal como o ácido glutâmico que apresenta um papel importante no processo germinativo, como referido anteriormente.

Os aminoácidos não essenciais representados em maior teor nas amostras em análise foram os aminoácidos: ácido glutâmico, ácido aspártico e arginina, pela respetiva ordem decrescente, estando de acordo estudos realizados por Betancur-Ancona et al., 2004 que verificou em isolados proteicos de *P.lunatus* uma maior concentração dos aminoácidos não essenciais, ácido glutâmico, ácido aspártico e serina; e de leucina e lisina como aminoácidos essenciais presentes em maior quantidade. Iqbal et al., 2006 analisou o perfil de aminoácidos do feijão-frade, grão-de-bico, lentilha e ervilha e verificou que, os maiores teores de aminoácidos não essenciais, em todas as leguminosas em estudo foram o ácido glutâmico, o ácido aspártico e a arginina.

A análise do rácio entre AAE/AANE permite constatar que a maior razão entre os AAE e AANE foi encontrada na semente ($0,8 \pm 0,0$), sendo este ligeiramente inferior ao encontrado na literatura para o isolado proteico de *C. cajan* ($0,9 \pm 0,0$) (Ishaya & Aletor, 2019).

Na análise da % AAE, % AANE e da razão AAE/AANE constatou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre a amostra de semente e de germinado.

As percentagens de aminoácidos essenciais (43%) e não essenciais (57%) encontradas para a espécie *C.Cajan*, em proporção são semelhantes às encontradas por Ishaya & Aletor (2019) nos isolados proteicos do *C.cajan*, de aproximadamente 48% de aminoácidos essenciais e 52% de aminoácidos não essenciais. Os resultados obtidos neste trabalho foram discordantes aos encontrados por Aremu et al. (2017), que encontraram nas amostra de *C.cajan* um teor de aminoácidos essenciais (68,8%) superior ao de aminoácidos não essenciais (31,5%), podendo estas diferenças dever-se a diferenças na origem e composição nutricional da amostra em estudo.

Tabela 8-Perfil Aminoácidos totais expressos em g aminoácido/ 100g peso seco.

Aminoácidos	Feijão Andu			Feijão Mangalô		
	Semente	Germinado	Farinha desidratada de germinado	Semente	Germinado	Farinha desidratada de germinado
Ácido Aspártico	1,85 ± 0,06 ^{a,B}	1,84 ± 0,06 ^{a,B}	1,98 ± 0,13 ^{a,B}	2,91 ± 0,03 ^{a,A}	2,99 ± 0,04 ^{a,A}	3,06 ± 0,13 ^{a,A}
Ácido Glutâmico	3,67 ± 0,12 ^{a,C}	3,80 ± 0,14 ^{a,BC}	4,05 ± 0,28 ^{a,AB}	3,83 ± 0,04 ^{b,BC}	4,25 ± 0,06 ^{a,A}	4,37 ± 0,19 ^{a,A}
Serina	0,97 ± 0,03 ^{a,C}	0,98 ± 0,03 ^{a,C}	1,03 ± 0,07 ^{a,C}	1,42 ± 0,02 ^{b,B}	1,51 ± 0,02 ^{a,AB}	1,53 ± 0,06 ^{a,A}
Histidina	0,89 ± 0,03 ^{a,B}	0,92 ± 0,03 ^{b ^{a,AB}}	0,95 ± 0,08 ^{a,AB}	0,91 ± 0,02 ^{b,AB}	0,98 ± 0,02 ^{a,AB}	1,00 ± 0,05 ^{a,A}
Glicina	0,71 ± 0,02 ^{a,C}	0,70 ± 0,03 ^{a,C}	0,77 ± 0,05 ^{a,C}	0,98 ± 0,02 ^{b,B}	1,02 ± 0,01 ^{ab,AB}	1,07 ± 0,05 ^{a,A}
Treonina	0,72 ± 0,03 ^{a,C}	0,73 ± 0,02 ^{a,C}	0,77 ± 0,06 ^{a,C}	0,89 ± 0,01 ^{b,B}	0,97 ± 0,01 ^{a,A}	1,00 ± 0,04 ^{a,A}
Arginina	1,26 ± 0,04 ^{a,C}	1,28 ± 0,04 ^{a,C}	1,33 ± 0,10 ^{a,C}	1,84 ± 0,04 ^{b,B}	2,02 ± 0,03 ^{a,A}	1,99 ± 0,09 ^{a,A}
Alanina	0,83 ± 0,03 ^{b,D}	0,92 ± 0,03 ^{a,CD}	0,93 ± 0,06 ^{a,BC}	1,01 ± 0,01 ^{b,B}	1,26 ± 0,02 ^{a,A}	1,24 ± 0,06 ^{a,A}
Tirosina	0,32 ± 0,01 ^{b,D}	0,37 ± 0,02 ^{ab,CD}	0,41 ± 0,04 ^{a,C}	0,58 ± 0,02 ^{b,B}	0,64 ± 0,01 ^{a,A}	0,65 ± 0,02 ^{a,A}
Valina	0,71 ± 0,03 ^{b,D}	0,76 ± 0,04 ^{ab,CD}	0,83 ± 0,06 ^{a,C}	0,94 ± 0,01 ^{b,B}	1,14 ± 0,03 ^{a,A}	1,19 ± 0,05 ^{a,A}
Metionina	0,17 ± 0,01 ^{a,AB}	0,16 ± 0,01 ^{a,BC}	0,19 ± 0,02 ^{a,A}	0,14 ± 0,00 ^{c,C}	0,15 ± 0,00 ^{b,BC}	0,18 ± 0,01 ^{a,AB}
Triptofano	0,19 ± 0,00 ^{a,B}	0,18 ± 0,00 ^{b,B}	0,18 ± 0,00 ^{b,B}	0,24 ± 0,01 ^{a,A}	0,25 ± 0,02 ^{a,A}	0,27 ± 0,05 ^{a,A}
Fenilalanina	1,68 ± 0,05 ^{a,A}	1,71 ± 0,07 ^{a,A}	1,82 ± 0,13 ^{a,A}	1,12 ± 0,01 ^{b,C}	1,27 ± 0,02 ^{a,BC}	1,33 ± 0,07 ^{a,B}
Isoleucina	0,62 ± 0,03 ^{b,D}	0,67 ± 0,03 ^{ab,DC}	0,73 ± 0,05 ^{a,D}	0,83 ± 0,01 ^{b,C}	1,02 ± 0,02 ^{a,B}	1,05 ± 0,05 ^{a,A}
Leucina	1,24 ± 0,05 ^{b,D}	1,28 ± 0,05 ^{ab,CD}	1,39 ± 0,10 ^{a,C}	1,75 ± 0,02 ^{b,B}	1,98 ± 0,03 ^{a,A}	2,06 ± 0,09 ^{a,A}
Lisina	1,56 ± 0,07 ^{a,B}	1,55 ± 0,07 ^{a,B}	1,50 ± 0,10 ^{a,B}	1,95 ± 0,04 ^{a,A}	1,95 ± 0,03 ^{a,A}	1,93 ± 0,10 ^{a,A}
Hidroxiprolina	0,03 ± 0,00 ^{a,C}	0,03 ± 0,00 ^{a,C}	0,03 ± 0,00 ^{a,C}	0,11 ± 0,01 ^{a,AB}	0,10 ± 0,01 ^{a,B}	0,11 ± 0,01 ^{a,A}
Prolina	0,65 ± 0,02 ^{b,D}	0,68 ± 0,03 ^{ab,CD}	0,74 ± 0,05 ^{a,BC}	0,81 ± 0,01 ^{b,B}	0,91 ± 0,01 ^{a,A}	0,94 ± 0,06 ^{a,A}
∑AAT	18,09 ± 0,63 ^{a,B}	18,58 ± 2,41 ^{a,B}	19,62 ± 1,38 ^{a,B}	22,26 ± 0,26 ^{b,B}	24,98 ± 1,15 ^{a,A}	24,40 ± 0,32 ^{a,A}
% AAE	43,08 ± 0,08 ^{a,A}	42,91 ± 0,18 ^{a,AB}	42,59 ± 0,12 ^{b,B}	39,43 ± 0,21 ^{b,D}	40,07 ± 0,17 ^{a,C}	39,78 ± 0,09 ^{a,C}
% AANE	56,92 ± 0,08 ^{b,D}	57,09 ± 0,18 ^{b,CD}	57,41 ± 0,12 ^{a,C}	60,57 ± 0,21 ^{a,A}	59,93 ± 0,17 ^{b,B}	60,23 ± 0,09 ^{b,B}
AAE/AANE	0,76 ± 0,00 ^{a,A}	0,75 ± 0,00 ^{a,AB}	0,74 ± 0,01 ^{b,B}	0,65 ± 0,01 ^{b,D}	0,67 ± 0,00 ^{a,C}	0,66 ± 0,00 ^{a,CD}

Dados expressos em média ± desvio-padrão (n=4). Em cada linha, letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas (p<0,05) entre as 3 amostras de cada espécie de feijão (dados de cada espécie analisados individualmente). Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas (p<0,05) entre as 6 amostras analisadas.

Na espécie *P. lunatus*, a soma dos aminoácidos totais foi superior na amostra germinado ($25,0 \pm 1,2$ g/100g de peso seco), seguido da amostra farinha desidratada de germinado ($24,4 \pm 0,3$ g/100g de peso seco) e da semente *in natura* ($22,3 \pm 0,3$ g/100g de peso seco) (Gráfico 4).

O aumento do teor de proteínas ao fim de cinco dias de germinação poderá estar relacionado com a síntese de proteínas enzimáticas necessárias para o desenvolvimento da semente na germinação, pela mudança da composição proteica após degradação de alguns constituintes da semente e pela síntese de proteínas recém-formadas durante a germinação (Bau et al., 1997; Xu et al., 2019).

Comparando, para esta espécie, o teor proteico determinado pela soma dos aminoácidos totais com o teor proteico determinado por Kjeldahl num estudo anterior que analisou as mesmas amostras (Benevides et al., 2019), observa-se que neste estudo o valor encontrado é ligeiramente inferior, muito provavelmente pelas mesmas razões já descritas relativamente às amostras de *C. cajan*. No entanto, as diferenças verificadas podem ainda dever-se ao facto de no estudo de Benevides et al. (2019), o teor proteico ser expresso em g/100g de amostra e os dados que apresentados neste trabalho estarem expressos em g/100g de peso seco. Ao expressar os dados em peso seco, eliminamos a interferência da humidade de cada amostra. Este facto pode justificar as diferenças verificadas anteriormente.

Contrariamente aos resultados de Benevides et al. (2019), em que a amostra farinha desidratada de germinado foi a que apresentou maior percentagem proteica ($27,3 \pm 0,2\%$), seguida da amostra de semente ($26,5 \pm 0,2\%$) e da amostra germinado ($26,1 \pm 0,2\%$), no presente estudo foi a amostra germinado que apresentou a maior concentração de aminoácidos totais ($25,0 \pm 1,2$ g/100g de peso seco). Confirmando mais uma vez, a influência do processo germinativo no aumento do teor proteico do alimento em estudo.

O somatório de aminoácidos totais da semente *in natura* da espécie *P. lunatus* foi semelhante à encontrada por Aremu et al. (2017) de 21,9%.

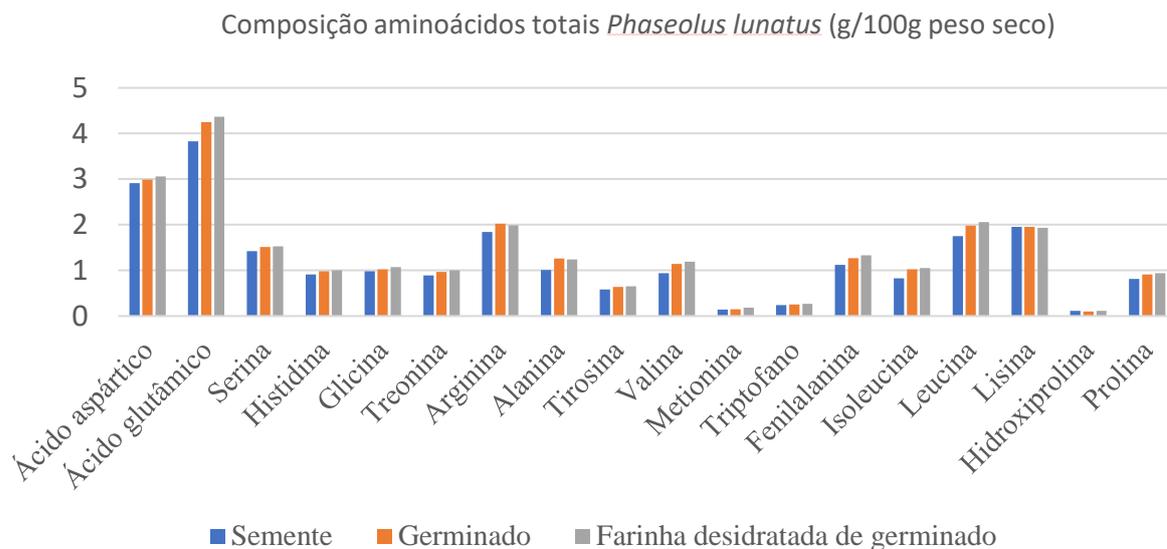


Gráfico 7. Composição aminoácidos totais *Phaseolus lunatus* (g/100g de peso seco)

A semente do feijão Mangalô revelou concentrações mais elevadas de ácido glutâmico, ácido aspártico, lisina, arginina e leucina, tal como se verificou na espécie *C. cajan*. As concentrações mais baixas pertenceram aos aminoácidos hidroxiprolina, metionina e triptofano (Gráfico 7). Na amostra germinado, embora em proporções diferentes, os aminoácidos mais e menos abundantes foram semelhantes aos encontrados na semente e na farinha desidratada de germinado.

Os teores de lisina, embora presentes em grande percentagem nas amostras em estudo, diminuíram ligeiramente na amostra de farinha desidratada de germinado, o que poderá dever-se às reações de Maillard.

Os elevados teores de lisina encontrados no feijão poderão ajudar na compensação de uma dieta à base de cereais, cuja composição em lisina é normalmente baixa. A farinha do feijão, rica em lisina, pode por exemplo ser útil na indústria da panificação, colmatando assim os défices em lisina do cereal (Mattila et al., 2018). Além disso, alimentos com elevado teor em lisina juntamente com arginina e serina, como é o caso das amostras em estudo, parecem promover um aumento de absorção de cálcio pelo organismo, dado que influenciam o pH intestinal, e por sua vez a formação de compostos solúveis cálcio-aminoácidos (Ribeiro et al., 2007).

As principais proteínas das leguminosas, neste caso o feijão, são globulinas ($\approx 70\%$), glutelinas (10-20%) e albuminas (10-20%). As globulinas (maior percentagem proteica) são pobres em enxofre, logo contém pouco aminoácidos sulfurados como a metionina e o triptofano, e são ricas em lisina e ácido glutâmico, o que está de acordo com os resultados deste estudo (Baudoin & Maquet, 1999).

Na amostra germinada, para ambas as espécies em estudo, verificou-se um aumento dos teores de treonina, valina e isoleucina, o que está de acordo com A. Singh et al. (2015), que encontrou um aumento destes aminoácidos após germinação de sementes de aveia.

Os valores dos aminoácidos sulfurados como o triptofano e a metionina mantiveram-se constantes, em todos os estados de ambas as espécies, o que está de acordo com Bau et al. (1997) e que provavelmente significará que estes aminoácidos não desempenham um papel preponderante no processo germinativo.

Relativamente às percentagens de aminoácidos essenciais e não essenciais, a amostra germinado do *P.lunatus* foi a que apresentou uma maior percentagem de aminoácidos essenciais (40,1%), enquanto que as sementes *in natura* revelaram a menor percentagem de aminoácidos essenciais (39,4%). Embora os valores encontrados sejam semelhantes, as diferenças foram estatisticamente significativas.

Analisando os rácios de AAE/AANE, é possível verificar que este rácio foi superior na espécie *C.cajan* em todos os estados em estudo, em comparação com a espécie *P.lunatus*, o que poderá indicar que a espécie *C.cajan* possui um menor teor proteico, no entanto um maior valor nutricional, devido a uma maior percentagem de aminoácidos essenciais. O maior rácio AAE/AANE na espécie *C.cajan* verificou-se na semente e na espécie *P.lunatus* na amostra germinado (Gráfico 8).

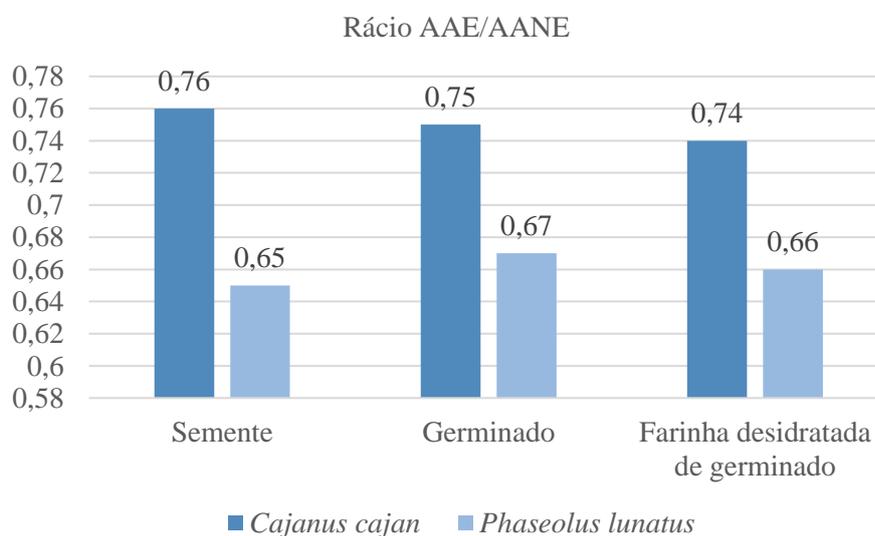


Gráfico 8. Rácio AAE/AANE

Comparando as duas espécies em estudo, a amostra que apresentou maiores concentrações de aminoácidos totais foi a amostra germinada do feijão Mangalô ($25,0 \pm 1,2$ g/100g de peso seco).

A leguminosa em estudo revelou ser uma fonte rica de aminoácidos essenciais (leucina, isoleucina, valina, fenilalanina, lisina e treonina) responsáveis pela melhoria do valor nutricional dos alimentos, e de aminoácidos não essenciais (ácido glutâmico, ácido aspártico, glicina, arginina e tirosina).

As espécies de feijão em estudo apresentaram teores de aminoácidos totais em quantidades adequadas para suprir as necessidades proteicas do organismo. De acordo com as recomendações da FAO e da Organização Mundial de Saúde (OMS), indivíduos adultos deverão consumir um teor proteico capaz de fornecer 10-15% da ingestão total de energia (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013; WHO/FAO/UNU Expert Consultation, 2007). Os teores proteicos dos feijões em estudo variaram entre 18-25%

Concluindo, em ambas as espécies, verificou-se um aumento da concentração de aminoácidos totais com o processo germinativo, o que indica que a germinação das amostras durante cinco dias promoveu um aumento no teor de proteína bruta do feijão Andu e Mangalô, o que está de acordo com a literatura (Aragão, 2013; Benevides et al., 2019; Kim et al., 2013) Para além disso, estudos referem uma associação positiva entre a germinação e a redução substancial de fatores antinutricionais presentes no feijão, tais como o ácido fítico, melhorando desta forma a aceitabilidade do alimento (Gupta et al., 2013).

5. CONCLUSÃO

A desnutrição é uma realidade bem próxima que afeta essencialmente países em desenvolvimento, que apresentam carências nutricionais graves, pois nem todos têm o mesmo acesso físico, social e económico à alimentação.

As leguminosas apresentam um papel importante no combate à subnutrição proteica. Estas constituem uma alternativa proteica mais saudável, ecológica, económica, e mais sustentável. No geral, caracterizam-se pelo seu elevado teor proteico, pelo teor elevado em hidratos de carbono de absorção lenta, ainda pelos seus teores em fibras, vitaminas do complexo B e minerais.

Este estudo permitiu verificar que o feijão Andu (*Cajanus cajan*) e Mangalô (*Phaseolus lunatus*) são culturas alimentares interessantes, devido ao perfil proteico que apresentam. Mostraram ser ricos em aminoácidos essenciais e não essenciais, sendo o seu consumo benéfico para a saúde.

A espécie *P.lunatus* caracterizou-se por um teor proteico mais elevado comparativamente com a espécie *C. cajan*, tanto nos aminoácidos livres como nos totais. Para cada espécie foi avaliado o perfil de aminoácidos da semente, do germinado e da farinha desidratada de germinado. A amostra de germinado foi a que apresentou um teor proteico mais elevado em ambas as espécies, o que permite constatar que a germinação promove o aumento do teor proteico do feijão. O menor teor proteico detetado verificou-se na amostra de semente.

Ambas as espécies de feijão em estudo contêm todos os aminoácidos essenciais em proporções diferentes como histidina, treonina, valina, metionina, triptofano, fenilalanina, isoleucina, leucina e lisina. Os teores de aminoácidos essenciais encontrados são importantes na medida em que, podem ser usados para melhorar o valor nutricional dos alimentos.

O feijão germinado ou a farinha do germinado poderá ser considerado uma boa opção para a indústria alimentar na medida em que, aumenta a qualidade nutricional do alimento, reduzindo grande parte dos fatores antinutricionais presentes, melhorando assim a aceitabilidade do seu consumo.

Em suma, os teores de aminoácidos individuais apresentados pelas espécies de feijão em estudo, a sua integração na indústria poderá ser capaz de suprir necessidades proteicas em países em desenvolvimento, auxiliando no combate à desnutrição proteica.

6. REFERÊNCIAS

- Adeparusi, E. O. (2001). Effect of processing on the nutrients and anti-nutrients of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) flour. *Nahrung/Food*, 45(2), 94–96. [https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20010401\)45:2<94::AID-FOOD94>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20010401)45:2<94::AID-FOOD94>3.0.CO;2-E)
- Akibode, S., Maredia, M. (2011). Global and regional trends in production , trade and consumption of food legume crops. *January 2011*.
- Aragão, V. P. M. (2013). Alterações bioquímicas durante a germinação e desenvolvimento de brotações in vitro em *Cedrela fissilis* Vell. (*Meliaceae*) Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Aremu, M., Audu, S., Lyambée Gav, B. (2017). Comparative review of crude protein and amino acids of leguminous seeds grown in Nigeria. *International Journal of Sciences*, 3(08), 88–97. <https://doi.org/10.18483/ijsci.1390>
- Awoyinka, O., Illeola, A., Imeoria, C., Tijani, T., Oladele, F., Asaolu, M. (2016). Comparison of phytochemicals and anti-nutritional factors in some selected wild and edible bean in Nigeria. *Food and Nutrition Sciences*, 07(02), 102–111. <https://doi.org/10.4236/fns.2016.72012>
- Barroso, M.R., Magalhães, M. J., Carnide, V., Martins, S., Vegas, C. A., Cachón, M.R. (2007). Caracterização e avaliação de diferentes espécies de leguminosas grão na região de Trás-os-Montes.
- Bau, H. M., Villaume, C., Nicolas, J. P., Méjean, L. (1997). Effect of germination on chemical composition, biochemical constituents and antinutritional factors of soya bean (*Glycine max*) seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73(1), 1–9. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0010\(199701\)73:1<1::aid-jsfa694>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0010(199701)73:1<1::aid-jsfa694>3.0.co;2-b)
- Baudoin, J. P., & Maquet, A. (1999). Improvement of protein and amino acid contents in seeds of food legumes. A case study in *Phaseolus*. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 3(4), 220–224.
- Benevides, C. M. J., Costa, A. S. G., Pinto, D., Alves, R. C., Nunes, A. M., & Oliveira, M. B. P. (2019). Germinação e Desidratação de Leguminosas: Efeito na Composição Nutricional , Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante de Feijão Andu e Mangalô do Peru. *Revista Virtual de Química*, 11(4).
- Berry, J. (2019). What to know about essential amino acids. *Medical News Today*.

<https://www.medicalnewstoday.com/articles/324229>. Consultado a 25/05/2020.

- Bessada, S. M. F., Barreira, J. C. M., & Oliveira, M. B. P. P. (2019). Pulses and food security: Dietary protein, digestibility, bioactive and functional properties. *Trends in Food Science and Technology*, 93(228), 53–68. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.022>
- Chandrasiri, V., Bau, H. M., Villaume, C., Giannangeli, F., & Mejean, L. (1990). Effect of germinated and heated soybean meals on plasma cholesterol and triglycerides in rats. *Reproduction Nutrition Development*, 30(5), 611–618. <https://doi.org/10.1051/rnd:19900506>
- Chel-Guerrero, L., Gallegos-Tintoré, S., Martínez-Ayala, A., Castellanos-Ruelas, A., & Betancur-Ancona, D. (2011). Functional properties of proteins from Lima bean (*Phaseolus lunatus L.*) seeds. *Food Science and Technology International*, 17(2), 119–126. <https://doi.org/10.1177/1082013210381433>
- Dai, Z., Wu, Z., Jia, S., & Wu, G. (2014). Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthaldialdehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 964, 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.03.025>
- Dakora, F. D., & Belane, A. K. (2019). Evaluation of protein and micronutrient levels in edible cowpea (*Vigna Unguiculata L. Walp.*) leaves and seeds. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00070>
- Delgado-Andrade, C., Seiquer, I., Navarro, M. P., & Morales, F. J. (2007). Maillard reaction indicators in diets usually consumed by adolescent population. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(3), 341–351. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600070>
- Doria, E., Campion, B., Sparvoli, F., Tava, A., & Nielsen, E. (2012). Anti-nutrient components and metabolites with health implications in seeds of 10 common bean (*Phaseolus vulgaris L.* and *Phaseolus lunatus L.*) landraces cultivated in southern Italy. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1–2), 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.03.005>
- FAO. (2018). *The future of food and agriculture – Alternative pathways to 2050*. <http://www.fao.org/3/l8429EN/i8429en.pdf>
- Farinde, E., Olanipekun, O., & Olasupo, R. (2018). Nutritional composition and

- antinutrients content of raw and processed Lima Bean (*Phaseolus lunatus*). *Annals: Food Science and Technology*, 19(2), 250–264.
- Faris, M., & Attlee, A. (2016). Lentils (*Lens culinaris, L.*): a novel functional food. *Medical Information Science Reference*, August, 1–523. <https://doi.org/10.4018/978-1-5225-0591-4>
- Flight, I., & Clifton, P. (2006). Cereal grains and legumes in the prevention of coronary heart disease and stroke: A review of the literature. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60(10), 1145–1159. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602435>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2013). Dietary protein quality evaluation in human nutrition. Report of an FAQ Expert Consultation. *FAO*, 92, 1–66.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2015). 2016 International Year of Pulses nutritious seeds for a sustainable future. *Global Pulse Confederation*. <https://pulses.org/what-are-pulses>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2016). *Save and Grow: In Practice*.
- Fuller, D. Q., Murphy, C., Kingwell-Banham, E., Castillo, C. C., & Naik, S. (2019). *Cajanus cajan (L.) Millsp.* origins and domestication: the South and Southeast Asian archaeobotanical evidence. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 66(6), 1175–1188. <https://doi.org/10.1007/s10722-019-00774-w>
- Gebrelibanos, M., Tesfaye, D., Raghavendra, Y., & Sintayeyu, B. (2013). Nutritional and health implications of legumes. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research IJPSR*, 4(4), 1269–1279.
- Gharachorloo, M., Ghiassi Tarzi, B., & Baharinia, M. (2013). The effect of germination on phenolic compounds and antioxidant activity of pulses. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(3), 407–411. <https://doi.org/10.1007/s11746-012-2170-3>
- Gupta, R. K., Gangoliya, S. S., & Singh, N. K. (2013). Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. *Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 676–684. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0978-y>
- Hamid, N. T., & Kumar, P. (2017). Anti-nutritional factors, their adverse effects and need for adequate processing to reduce them in food. *AgricInternational*, 4(1), 56. <https://doi.org/10.5958/2454-8634.2017.00013.4>

- Hefnawy, T. H. (2011). Effect of processing methods on nutritional composition and anti-nutritional factors in lentils (*Lens culinaris*). *Annals of Agricultural Sciences*, 56(2), 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2011.07.001>
- Hernán, A. (2019). *BCAA + Glutamina, a combinação ganhadora!* Nutritienda. <https://blog.nutritienda.com/pt/bcaa-glutamina-la-combinacion-ganadora/>. Consultado a 25/04/2020.
- Hesse, A., & Weller, M. G. (2016). Protein quantification by derivatization free High-Performance Liquid Chromatography of Aromatic Amino Acids. *Journal of Amino Acids*, 2016, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/7374316>
- Hintz, H.F. (2000). Nutritional benefits of Pulses. *Equine Practice*, 22(2), 15. <http://www.fao.org/3/a-i5384e.pdf>
- Hsu, D., Leung, H. K., Finney, P. L., & Morad, M. M. (1980). Effect of germination on nutritive value and baking properties of dry peas, lentils, and faba beans. *Journal of Food Science*, 45(1), 87–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1980.tb03877.x>
- Huang, G., Cai, W., & Xu, B. (2017). Improvement in beta-carotene, vitamin B2, GABA, free amino acids and isoflavones in yellow and black soybeans upon germination. *LWT-Food Science and Technology*, 75, 488–496. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.09.029>
- Huang, S., Wang, L. M., Sivendiran, T., & Bohrer, B. M. (2018). Review: Amino acid concentration of high protein food products and an overview of the current methods used to determine protein quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(15), 2673–2678. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1396202>
- Ishaya, F., & Aletor, O. (2019). Nutritive potential and functional attributes of Lima Bean (*Phaseolus Lunatus*) and Pigeon Pea (*Cajanus Cajanus*) protein isolates. *Journal of Integrative Food Sciences & Nutrition*, 3(1), 6.
- Jukanti, A. K., Gaur, P. M., Gowda, C. L. L., & Chibbar, R. N. (2012). Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum L.*): A review. *British Journal of Nutrition*, 108(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1017/S0007114512000797>
- Khalil, A. H., & Mansour, E. H. (1995). The effect of cooking, autoclaving and germination on the nutritional quality of faba beans. *Food Chemistry*, 54(2), 177–182. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00024-D](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00024-D)
- Kim, S., Lee, J., Kwon, Y., Kim, W., Jung, G., Kim, D., Lee, C., Lee, Y.Y., Kim, M.J.,

- Kim, Y.H., Hwang, T.Y., & Chung, I.M. (2013). Introduction and nutritional evaluation of germinated soy germ. *Food Chemistry*, 136(2), 491–500. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.022>
- Kumar, A., Jawla, S., & Yadav, G. (2013). Recent analytical method developed by RP-HPLC. *Global Journal of Pharmacology*, 7(3), 232–240. <https://doi.org/10.5829/idosi.gjp.2013.7.3.7579>
- Machado, S., Costa, A. S. G., Pimentel B., F., Oliveira, M. B. P. P., & Alves, R. C. (2020). A study on the protein fraction of coffee silverskin: Protein/non-protein nitrogen and free and total amino acid profiles. *Food Chemistry*, 326(November 2019). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126940>
- Marques, J. P., & Lopes, G. C. (2015). Alcalóides como agentes antitumorais: considerações químicas e biológicas. *Revista Uningá Review*, 24, 56–61.
- Mattila, P., Mäkinen, S., Eurola, M., Jalava, T., Pihlava, J. M., Hellström, J., & Pihlanto, A. (2018). Nutritional value of commercial protein-rich plant products. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(2), 108–115. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0660-7>
- Messina, M. J. (1999). Legumes and soybeans: Overview of their nutritional profiles and health effects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70. <https://doi.org/10.1093/ajcn/70.3.439s>
- Mizubuti, I. Y., Júnior, O. B., Souza, L. W.O., Silva, L.W.S.F., & Iouko, I.E. (2000). Propriedades funcionais da farinha e concentrado protéico de feijão guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 50(3), 274–280.
- Monirujjaman, M., & Ferdouse, A. (2014). Metabolic and Physiological Roles of Branched-Chain Amino Acids. *Advances in Molecular Biology*, 2014, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/364976>
- Motta, C., Bento, C., Nascimento, A. C., & Santos, M. (2016). A importância das leguminosas na alimentação, nutrição e promoção da saúde. *Instituto Nacional de Saúde*, 4–7.
- Naia, I. I. P. (2015). *Produção de alimentos funcionais inovadores a partir de tremço e ervilha com base no método de produção de tempeh de soja*. 102 f. [http://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/8547/1/Dissertação Definitiva_Inês Naia 10_03_15%281%29.pdf](http://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/8547/1/Dissertação%20Definitiva_Inês%20Naia%2010_03_15%281%29.pdf)
- Ngozi, K., Dialoke, S. A., Onuegbu, N., & Nwosu, J. N. (2015). Utilization of tender

- Pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) in Nigéria. *Food Science and Quality Management*, 37, 110–116.
- Odeny D A. (2007). The potential of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) in Africa. *Natural Resources Forum*, 31, 297–305.
- Oliveira, L., Afonso, C., & Pinho, O. (2013). Tremoço (*Lupinus albus*): composição nutricional , propriedades nutraceuticas e aplicações na indústria alimentar. *August 2015*, 65–66.
- Oshodi, A. A., & Adeladun, M. O. A. (1993). Proximate composition, some nutritionally valuable minerals and functional properties of three varieties of Lima bean (*Phaseolus lunatus* Linn.) flour. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 43(4), 181–186. <https://doi.org/10.3109/09637489309027540>
- Oshodi, A. A., Olaofe, O., & Hall, G. M. (1993). Amino acid, fatty acid and mineral composition of pigeon pea (*Cajanus cajan*). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 43(4), 187–191. <https://doi.org/10.3109/09637489309027541>
- Otter, D. E. (2012). Standardised methods for amino acid analysis of food. *British Journal of Nutrition*, 108(SUPPL. 2), 230–237. <https://doi.org/10.1017/S0007114512002486>
- Pal, R. S., Bhartiya, A., Yadav, P., Kant, L., Mishra, K. K., Aditya, J. P., & Pattanayak, A. (2017). Effect of dehulling, germination and cooking on nutrients, anti-nutrients, fatty acid composition and antioxidant properties in lentil (*Lens culinaris*). *Journal of Food Science and Technology*, 54(4), 909–920. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2351-4>
- Paula, A., Moreira, B., De, R., Gonçalves, C., De Cássia, R., Alfenas, G., Ferreira, L., Sant'ana, R., Priore, S. E., Do Carmo, S., & Franceschini, C. (2012). Evolução e interpretação das recomendações nutricionais para os macronutrientes. *Rev Bras Nutr Clin*, 27(1), 51–60.
- Pavanelli, L. da C. (2014). *Química Orgânica- Funções e Isomeria* (1ª). Érica.
- Pereira, T. M. S. M. da G. (2003). Utilização de fontes proteicas de origem vegetal em dietas para dourada. *Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas*.
- Pieruzzi, F. P., Dias, L. L. C., Balbuena, T. S., Santa-Catarina, C., Dos Santos, A. L. W., & Floh, E. I. S. (2011). Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera*

- (Angiosperm). *Annals of Botany*, 108(2), 337–345. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr133>
- Pimentel, F. A. B. (2016). Protein and amino acids composition of *Anas platyrhynchos* reared in semi-extensive conditions: are they comparable to wild ones?
- Poggiogalle, E., Fontana, M., Giusti, A. M., Pinto, A., Iannucci, G., Lenzi, A., & Donini, L. M. (2019). Amino acids and hypertension in adults. *Nutrients*, 11(7), 1–10. <https://doi.org/10.3390/nu11071459>
- Real, H., Barbosa, M., & Pimenta, P. (2016). Leguminosa a leguminosa, encha o seu prato de saúde.
- Ribeiro, N. D., Londero, P. M. G., Cargnelutti Filho, A., Jost, E., Poersch, N. L., & Mallmann, C. A. (2007). Composição de aminoácidos de cultivares de feijão e aplicações para o melhoramento genético. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42(10), 1393–1399. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2007001000004>
- Romero-Aguilera, F., Alonso-Esteban, J. I., Torija-Isasa, M. E., Cámara, M., & Sánchez-Mata, M. C. (2017). Improvement and validation of phytate determination in edible seeds and derived products, as mineral complexing activity. *Food Analytical Methods*, 10(10), 3285–3291. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0890-6>
- Sabaté, J., Sranachoenpong, K., Harwatt, H., Wien, M., & Soret, S. (2015). The environmental cost of protein food choices. *Public Health Nutrition*, 18(11), 2067–2073. <https://doi.org/10.1017/S1368980014002377>
- Sánchez-Chino, X., Jiménez-Martínez, C., Dávila-Ortiz, G., Álvarez-González, I., & Madrigal-Bujaidar, E. (2015). Nutrient and nonnutrient components of legumes, and its chemopreventive activity: A review. *Nutrition and Cancer*, 67(3), 401–410. <https://doi.org/10.1080/01635581.2015.1004729>
- Sangronis, E., & Machado, C. J. (2007). Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. *LWT -Food Science and Technology*, 40(1), 116–120. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.08.003>
- Schummer, C., Delhomme, O., Appenzeller, B. M. R., Wennig, R., & Millet, M. (2009). Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta*, 77(4), 1473–1482. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.09.043>
- Sharma, S., Agarwal, N., & Verma, P. (2011). Pigeon pea (*Cajanus cajan* L.): a hidden treasure of regime nutrition. *Journal of Functional And Environmental Botany*,

1(2), 91. <https://doi.org/10.5958/j.2231-1742.1.2.010>

- Singh, A., Rehal, J., Kaur, A., & Jyot, G. (2015). Enhancement of attributes of cereals by germination and fermentation: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(11), 1575–1589. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.706661>
- Singh, M., Muralidhara Rao, D., Pande, S., Battu, S., Mahalakshmi, K., Rajeswar Dutt, K., & Ramesh, M. (2011). Medicinal uses of L-Lysine: Past and future. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 2(4), 637–642.
- Singh, U., & Jambunathan, R. (1982). Distribution of seed protein fractions and amino acids in different anatomical parts of chickpea (*Cicer arietinum L.*) and pigeonpea (*Cajanus cajan L.*). *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition*, 31(4), 347–354. <https://doi.org/10.1007/BF01094046>
- Souza, C. G. de, Moura, A. K. B. de, Silva, J. N. P. da, Soares, K. O., Silva, J. V. C. da, & Vasconcelos, P. C. (2019). Fatores anti-nutricionais de importância na nutrição animal: Composição e função dos compostos secundários. *Pubvet*, 13(5), 1–19.
- Souza, M., Detmann, E., Franco, M., Batista, E., Rocha, G., Valadares, S., & Saliba, E. (2016). Estudo colaborativo para avaliação dos teores de proteína bruta em alimentos utilizando o método de Kjeldhal. *Revista Brasileira Saúde Produção Animal*, 696–709.
- Sozer, N., Holopainen-Mantila, U., & Poutanen, K. (2016). Traditional and New Food Uses of Pulses. *VTT Technical Research Centre of Finland Ltd.* 1–33.
- Stivari, T. S. S., Monteiro, A. L. G., Paula, E. F. E. de, Fernandes, S. R., Souza, D. F. de, & Gilaverte, S. (2011). Leguminosas na alimentação de ovinos: possibilidades de uso e resposta animal. *Pubvet*, 5(32). <https://doi.org/10.22256/pubvet.v5n32.1209>
- Suárez-Martínez, S. E., Ferriz-Martínez, R. A., Campos-Vega, R., Elton-Puente, J. E., De La Torre Carbot, K., & García-Gasca, T. (2016). Bean seeds: Leading nutraceutical source for human health. *CYTA - Journal of Food*, 14(1), 131–137. <https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1063548>
- Thakur, S., Kumar Shrivastava, S., & Shrivastava, M. (2017). Amino acid profile of some new varieties of leguminous seeds. *Iioabj*, 8, 48–53. www.iioab.org
- Vasconcelos, I. M., Maia, F. M. M., Farias, D. F., Campello, C. C., Carvalho, A. F. U., de Azevedo Moreira, R., & de Oliveira, J. T. A. (2010). Protein fractions, amino acid composition and antinutritional constituents of high-yielding cowpea cultivars.

Journal of Food Composition and Analysis, 23(1), 54–60.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.05.008>

Venn, B. J., Perry, T., Green, T. J., Skeaff, C. M., Aitken, W., Moore, N. J., Mann, J. I., Wallace, A. J., Monro, J., Bradshaw, A., Brown, R. C., Skidmore, P. M. L., Doel, K., O'Brien, K., Frampton, C., & Williams, S. (2010). The effect of increasing consumption of pulses and wholegrains in obese people: A randomized controlled trial. *Journal of the American College of Nutrition*, 29(4), 365–372.
<https://doi.org/10.1080/07315724.2010.10719853>

Vidal-Valverde, C., Frias, J., Sierra, I., Blazquez, I., Lambein, F., & Kuo, Y. H. (2002). New functional legume foods by germination: Effect on the nutritive value of beans, lentils and peas. *European Food Research and Technology*, 215(6), 472–477. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0602-2>

Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. . (2000). *Fundamentos de Bioquímica*. Porto Alegre: ArtMed.

Wallace, T. C., Murray, R., & Zelman, K. M. (2016). The nutritional value and health benefits of chickpeas and hummus. *Nutrients*, 8(12), 1–10.
<https://doi.org/10.3390/nu8120766>

Walter, M., Marchezan, E., & Avila, L. A. de. (2008). Arroz: composição e características nutricionais. *Ciência Rural*, 38(4), 1184–1192.
<https://doi.org/10.1590/s0103-84782008000400049>

WHO/FAO/UNU Expert Consultation. (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Joint*, 35, 1–13.

Wu, G. (2009). Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, 37(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>

Wu, G. (2013). Functional amino acids in nutrition and health. *Amino Acids*, 45(3), 407–411. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1500-6>

Xu, M., Jin, Z., Simsek, S., Hall, C., Rao, J., & Chen, B. (2019). Effect of germination on the chemical composition, thermal, pasting, and moisture sorption properties of flours from chickpea, lentil, and yellow pea. *Food Chemistry*, 295(March), 579–587. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.167>