

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**



**DISSERTAÇÃO**

**Qualidade de feijão caupi em função de herbicidas dessecantes utilizados  
na pré-colheita e das condições de armazenamento**

**Igor da Silva Lindemann**  
Engenheiro Agrônomo

Pelotas, 2017

**Igor da Silva Lindemann**

**Qualidade de feijão caupi em função de herbicidas dessecantes utilizados  
na pré-colheita e das condições de armazenamento**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**Comitê de orientação:**

Prof. Dr. Nathan Levien Vanier - Orientador

Prof. Dr. Moacir Cardoso Elias - Coorientador

Prof. Dr. Maurício de Oliveira – Coorientador

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

L111q Lindemann, Igor da Silva

Qualidade de feijão caupi em função de herbicidas dessecantes utilizados na pré-colheita e das condições de armazenamento. / Igor da Silva Lindemann ; Nathan Levien Vanier, orientador ; Moacir Cardoso Elias, Maurício de Oliveira, coorientadores. — Pelotas, 2017.

79 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Feijão caupi Bico de Ouro. 2. Dessecação pré-colheita. 3. Estresse pré-colheita. 4. Armazenamento com N2. I. Vanier, Nathan Levien, orient. II. Elias, Moacir Cardoso, coorient. III. Oliveira, Maurício de, coorient. IV. Título.

CDD : 664

**Igor da Silva Lindemann**

**Qualidade de feijão caupi em função de herbicidas dessecantes utilizados  
na pré-colheita e das condições de armazenamento**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Data e local da defesa:

Pelotas, 7 de dezembro de 2017.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Nathan Levien Vanier (orientador). Professor Adjunto da Universidade Federal de Pelotas. Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Fábio Clasen Chaves. Professor Adjunto da Universidade Federal de Pelotas. PhD em Biologia Vegetal pela Rutgers, The State University of New Jersey.

Prof. Dr. Luis Antonio de Avila. Professor Associado da Universidade Federal de Pelotas. PhD em Agronomia pela Texas A&M University.

Prof. Dr. Sidnei Deuner. Professor Adjunto da Universidade Federal de Pelotas. Doutor em Agronomia pela Universidade Federal de Lavras.

## **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus, sem ele nada seria possível.

A minha namorada, Caroline, que sempre esteve ao meu lado, em todos os momentos. Minha companheira.

A minha família, em especial aos meus pais, Gilberto e Regina, ao irmão, Douglas, e a cunhada, Ane, que sempre foram grandes incentivadores e acreditaram em mim. Não tenho dúvidas que são fundamentais nessa conquista.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Nathan Levien Vanier e Prof. Dr. Moacir Cardoso Elias, pelos ensinamentos que me fizeram crescer pessoalmente e profissionalmente durante esse período. No futuro serão sempre lembrados.

Aos colegas e amigos de Pós-graduação, Cristiano Ferreira, Gustavo Lang, Jessica Fernanda Hoffmann, Jorge Tiago Goebel e Valmor Ziegler pelas conversas produtivas, pela oportunidade de trabalharmos juntos e por me ajudarem sempre que precisei, esclarecendo dúvidas.

Aos demais colegas de pós-graduação, Adriano, Aline, Bárbara, Bianca, Bruno, Caroline T., Cristian, Dianini, Estefania, Franciene, Francine, Graziella, Ismael, Jaqueline, Jarine, Jean, Jeferson, Laura, Mariana, Milena, Suzane e Wyller, pela convivência agradável e a troca de conhecimento.

Aos bolsistas de iniciação científica David, Emílio, Ezequiel, Franciele, Gabriela, Gabriela Rosa, James, Jean, João, José, Juciano, Larissa, Newton, Stefânia e Vinícius, pelos serviços prestados.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo profissionalismo e a atenção que me deram nesse período.

Aos Pós-Doutorandos Luciana Prietto, Ricardo Pohndorf, Rosana Colussi e Shanise El Halal, por estarem sempre dispostos a me auxiliar nas atividades.

À Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Polo de Inovação Tecnológica em Alimentos da Região Sul, muito obrigado.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram com seu incentivo ou apoio para essa formação e conquista pessoal.

## Resumo

Lindemann, Igor da Silva. **Qualidade de feijão caupi em função de herbicidas dessecantes utilizados na pré-colheita e das condições de armazenamento.** 2017, 79f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

O feijão caupi (*Vigna unguiculata*) é produzido principalmente em pequenas propriedades da região nordeste do país. Com o déficit na oferta de feijão e os preços atrativos observados na entressafra, grandes produtores da região Centro-Oeste passaram a cultivar feijão caupi, especialmente da variedade Bico de Ouro. Por se tratar de uma dicotiledônea com hábito de crescimento indeterminado, as plantas apresentam vagens secas, vagens no ponto ideal e vagens verdes no momento da colheita. A colheita manual em grandes propriedades é inviável, sendo necessária a aplicação de herbicidas para uniformizar a senescência das plantas e o grau de maturação dos grãos para, então, viabilizar a colheita mecanizada. Desta forma objetivou-se com o presente estudo: (1) Avaliar as consequências da utilização de herbicidas dessecantes em pré-colheita sobre propriedades químicas e tecnológicas do feijão caupi da variedade Bico de Ouro, e (2) Avaliar efeitos da temperatura e da atmosfera de armazenamento sobre propriedades tecnológicas do feijão caupi da variedade Bico de Ouro. Os herbicidas glifosato (GLI), glifosato mais carfentrazone (GLI/CAR) e paraquate (PAR) foram testados em pré-colheita, no primeiro estudo. Grãos colhidos manualmente foram utilizados como controle (SEM). Os grãos foram, também, armazenados a 25°C, por 8 meses, para avaliar a suscetibilidade ao envelhecimento. Para o segundo estudo, grãos de feijão caupi da variedade Bico de Ouro foram armazenados por 8 meses com nitrogênio ou em atmosfera hermética, a 15, 20 ou 25°C. A aplicação de herbicidas dessecantes na pré-colheita proporcionou alterações nos parâmetros de qualidade. Grãos obtidos de plantas tratadas com PAR e GLI apresentaram coloração mais escura logo após a colheita. No entanto, no armazenamento, a cor do tegumento dos grãos obtidos de plantas tratadas com PAR se manteve mais estável. A aplicação de GLI proporcionou acúmulo em níveis mais elevados de compostos fenólicos, principalmente compostos complexos como as proantocianidinas. Foi possível identificar moléculas de discriminação do feijão caupi em função do herbicida utilizado, sendo elas: catequina-3-glicosídeo e epicatequina (para grãos obtidos de plantas tratadas com GLI), ácido cítrico (para grãos de plantas tratadas com GLI/CAR), e quercetina e ácido glucônico (para grãos obtidos de plantas não submetidas ao tratamento com herbicidas). Os teores residuais de glifosato e paraquate foram superiores aos limites máximos tolerados pelo Codex Alimentarius e pela União Européia. Em relação ao segundo objetivo apresentado, o feijão caupi armazenado em atmosfera com nitrogênio a 20°C manteve atributos de cor, cocção e dureza muito próximos aos grãos armazenados pelo mesmo período a 15°C.

**Palavras-chave:** feijão caupi var. Bico de Ouro; dessecação pré-colheita; estresse pré-colheita; armazenamento com N<sub>2</sub>.

## Abstract

Lindemann, Igor da Silva. **Quality of cowpea according to the desiccant used in the pre-harvest and storage conditions.** 2017, 79f. Dissertation (Master in Science and Technology of food) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Cowpea (*Vigna unguiculata*) is produced mainly in small properties in the northeastern region of the country. With the deficit in the supply of beans and the attractive prices observed in the off season, large producers of the central-west region began to grow cowpea beans, especially the Bico de Ouro variety. Because it is a dicotyledon with an indeterminate growth habit, the plants present dry pods, pods at the ideal point and green pods at the time of harvest. The manual harvesting on large properties is impracticable, being necessary the application of desiccants to standardize the senescence of the plants and the degree of maturation of the grains in order to allow the mechanized harvesting. Thus, this study aimed to: 1) To evaluate the consequences of using pre-harvest desiccants, end 2) Evaluate effects of storage temperature and atmosphere on the technological properties of cowpea, variety Bico de ouro. The herbicides glyphosate (GLI), glyphosate with carfentrazone (GLI/CAR), end paraquat (PAR) were tested in pre-harvest, in the first study. Cowpeas collected manually were used as control (SEM). The grains were also stored at 25°C for 8 months to evaluate the susceptibility to aging. In the second study, cowpea of the Bico de ouro variety were stored for 8 months under nitrogen or in a hermetic atmosphere at 15, 20 or 25°C. The application of herbicides in the pre-harvest changed the quality parameters of the cowpea. Cowpeas obtained from PAR and GLI treated plants showed darker coloration soon after harvest. However, in storage, the color of the cowpea coat treated with PAR remained more stable. The application of GLI provided accumulation at higher levels of phenolic compounds, especially complex compounds such as proanthocyanidins. It was possible to identify molecules of cowpea discrimination as a function of the herbicide used, being them: catechin-3-glycoside and epicatechin (for grains obtained from plants treated with GLI), Citric acid (for grains obtained from plants treated with GLI/CAR), end quercetin end gluconic acid (for grains obtained from plants not submitted to treatment with herbicides). Residual levels of glyphosate and paraquat were higher than the maximum levels tolerated by the Codex Alimentarius and the European Union. With regard to the second objective, the cowpea stored in nitrogen atmosphere at 20°C maintained color, firing and hardness attributes very close to the grains stored for the same period at 15°C.

**Key words:** cowpea (*Vigna unguiculata*); pre-harvest stress; storage N<sub>2</sub>

## Lista de tabelas

Tabela 1. Limites dos resíduos de glifosato, carfentrazona e paraquate para grãos de feijão.....	23
Tabela 2. Análise de componentes principais de grãos de feijão caupi tratados com diferentes herbicidas.....	45

## Lista de figuras

- Figura 1. Distribuição geográfica das principais regiões produtoras de feijão caupi no Brasil.....18
- Figura 2. Feijão caupi, variedade Bico de ouro. Próximo à colheita, em uma mesma área ou mesmo entre vagens de uma única planta é possível encontrar algumas partes já secas e outras ainda verdes. ....19
- Figura 3. Estrutura química do glifosato (A), carfentrazone (B) e paraquate (C)...20
- Figura 4. Diferentes grupos de compostos fenólicos e suas estruturas químicas. 24
- Figura 5. Áreas com os diferentes tratamentos, onde “A” corresponde ao tratamento com glifosato, “B” glifosato + carfentrazone, “C” aplicação com paraquate e “D” sem aplicação (plantas colhidas manualmente e deixadas ao solo para secagem natural dos grãos). ....33
- Figura 6. Diagrama para a localização das cores no eixo colorimétrico.....34
- Figura 7. Valor  $a^*$  dos grãos submetidos a diferentes tratamentos, onde GLI, GLI/CAR, PAR e SEM, correspondem a glifosato, glifosato + carfentrazone, paraquate e sem aplicação (controle), respectivamente. Letras diferentes apontam valores que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).....39
- Figura 8. Tempo de cocção dos grãos submetidos a diferentes tratamentos, onde GLI, GLI/CAR, PAR e SEM, correspondem a glifosato, glifosato + carfentrazone, paraquate e sem aplicação, respectivamente. Letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). .....40
- Figura 9. Compostos fenólicos livres (A) e ligados (B) dos grãos submetidos a diferentes tratamentos, onde GLI, GLI/CAR, PAR e SEM, correspondem a glifosato, glifosato + carfentrazone, paraquate e sem aplicação, respectivamente. Letras diferentes indicam valores que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).....41
- Figura 10. Teor de proantocianidinas dos grãos submetidos a diferentes tratamentos, onde GLI, GLI/CAR, PAR e SEM, correspondem a glifosato, glifosato + carfentrazone, paraquate e sem aplicação, respectivamente. Letras diferentes indicam valores que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).....42

Figura 11. Gráfico de análise de componentes principais, onde GLI, GLI/CAR, PAR e SEM, correspondem a Glifosato, Glifosato + Carfentrazone, Paraquate e Sem aplicação, respectivamente. ....	43
Figura 12. Identidades dos metabólitos responsáveis pelas separações, onde GLI, GLI/CAR, PAR e SEM, correspondem a glifosato (A), glifosato + carfentrazona (B), paraquate (C) e sem aplicação (D), respectivamente. ....	44
Figura 13. Suscetibilidade ao escurecimento do feijão caupi submetido a diferentes tratamentos, onde GLI, GLI/CAR, PAR e SEM, correspondem a glifosato, glifosato + carfentrazona, paraquate e sem aplicação, respectivamente. Letras diferentes indicam valores que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).....	49
Figura 14. Feijão caupi submetido a diferentes tratamentos e armazenados por 8 meses, onde GLI, GLI/CAR, PAR e SEM, correspondem a Glifosato, Glifosato + Carfentrozona, Paraquate e Sem aplicação, respectivamente aplicações obtido antes e após 8 meses de armazenamento. ....	50
Figura 15. Suscetibilidade ao aumento no tempo de cocção dos grãos submetidos a diferentes tratamentos, onde GLI, GLI/CAR, PAR e SEM, correspondem a glifosato, glifosato + carfentrazona, paraquate e sem aplicação, respectivamente. Letras diferentes apontam valores que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).....	51
Figura 17. Valor de $a^*$ do feijão caupi antes e após 8 meses de armazenamento em diferentes condições de atmosfera e temperatura. Letras diferentes apontam valores que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). ....	58
Figura 18. Fotografia dos grãos antes e após 8 meses de armazenamento.....	59
Figura 19. Teor de compostos fenólicos obtidos a partir do grão inteiro antes e após 8 meses de armazenamento em diferentes condições de atmosfera e temperatura. Letras diferentes indicam valores que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).....	60
Figura 20. Comportamento de hidratação do feijão caupi obtido antes e após 8 meses de armazenamento em nitrogênio (A) e com restrição de oxigênio (B).....	62

- Figura 21. Tempo de cocção dos grãos obtidos antes e após 8 meses de armazenamento em diferentes condições de atmosfera e temperatura. Letras diferentes indicam valores que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).....63
- Figura 22. Dureza do feijão caupi submetidos ao processo de cocção, obtidos antes e após 8 meses de armazenamento em diferentes condições de atmosfera e temperatura. Letras diferentes indicam valores que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).....64

## Sumário

<b>Resumo</b> .....	<b>6</b>
<b>Lista de tabelas</b> .....	<b>8</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>9</b>
<b>1 Introdução</b> .....	<b>14</b>
1.1 Hipóteses .....	15
1.2 Objetivos gerais .....	16
1.3 Objetivos específicos .....	16
<b>2 Revisão bibliográfica</b> .....	<b>17</b>
2.1 Aspectos econômicos e de cultivo do feijão caupi .....	17
2.2 Manejo de pré-colheita do feijão caupi.....	19
São poucos os produtos registrados no sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Agrofit) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a prática de dessecação de feijão em pré-colheita. Os produtos registrados são Sumisoya (Flumioxazina), Finale (Glufosinato de amônio) e Fascinate BR (Glufosinato de amônio) que devem ser utilizados, quando necessário, sempre com orientação de um Engenheiro Agrônomo. ....	23
2.3 Compostos bioativos no feijão caupi.....	23
2.4 Pós-colheita de feijão caupi .....	27
<b>3 CAPÍTULO 1 – Efeitos da utilização dos herbicidas glifosato, carfentrazone e paraquate na dessecação pré-colheita sobre propriedades químicas e tecnológicas do feijão caupi da variedade Bico de Ouro</b> .....	<b>31</b>
3.1 Introdução .....	31
3.2 Material e Métodos.....	32
3.2.1 Material .....	32
3.2.1 Métodos .....	34
3.2.1.1 Cor do tegumento e tempo de cocção.....	34
3.2.1.2 Compostos fenólicos totais e proantocianidinas .....	35
3.2.1.3 Teor de proantocianidinas .....	36
3.2.1.4 Discriminação de metabólitos por LC-ESI-qTOF-MS .....	36
3.2.1.5 Determinação dos resíduos de glifosato, paraquate e carfentrazone .....	38
3.2.1.6 Análise de estatística .....	38
3.3 Resultados e discussão .....	38
3.3.1 Cor do tegumento e tempo de cocção .....	38

3.3.2 Compostos fenólicos totais e proantocianidinas .....	41
3.3.3 Discriminação de metabólitos por LC-ESI-qTOF-MS.....	43
3.3.4 Teor residual de glifosato, carfentrazone e paraquate em feijão caupi..	47
3.3.5 Suscetibilidade às alterações na cor do tegumento e no tempo de cozimento durante o armazenamento .....	48
3.4 Conclusões .....	52
<b>4 CAPÍTULO 2 – Efeitos da temperatura e da atmosfera de armazenamento na qualidade de feijão caupi da variedade Bico de Ouro .....</b>	<b>53</b>
4.1 Introdução .....	53
4.2 Material e Métodos.....	55
4.2.1 Material .....	55
4.2.2 Métodos .....	55
4.2.2.1 Perfil colorimétrico .....	55
4.2.2.2 Determinação dos compostos fenólicos livres na superfície dos grãos .....	56
4.2.2.3 Isotermas de hidratação .....	56
4.2.2.4 Tempo de cocção .....	57
4.2.2.5 Perfil texturométrico.....	57
4.3 Resultados e discussão .....	58
4.3.1 Cor dos grãos armazenados.....	58
4.3.2 Compostos fenólicos livres na superfície dos grãos .....	60
4.3.3 Capacidade de absorção de água, tempo de cocção e dureza dos grãos armazenados .....	61
4.4 Conclusões .....	64
<b>5 Considerações finais .....</b>	<b>65</b>

## 1 Introdução

O Feijão Caupi (*Vigna unguiculata* L.) é considerado uma importante fonte de proteínas, carboidratos, fibras dietéticas, vitaminas e minerais. O carboidrato é o componente majoritário, podendo representar de 50 a 60% da constituição do grão, seguido pelas proteínas. Por estas características, possui importância no combate à desnutrição em países de baixo poder econômico, onde a proteína animal não está disponível.

Além da importante função nutricional, o feijão caupi é importante fonte de compostos bioativos, atribuindo a este alimento caráter funcional, com capacidade antioxidante, antimutagênica, anti-inflamatória e anti-hipertensiva, desempenhando, assim, um papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares e crônicas degenerativas, como o câncer.

No Brasil, os maiores níveis de consumo são observados na região nordeste. A produção nacional está dividida nas regiões Nordeste e Centro-Oeste. Na safra de 2016/17, o Centro-Oeste brasileiro passou a concentrar os maiores volumes de produção. O grande potencial como alimento para o combate à desnutrição, a praticidade de produção e a capacidade da cultura de se adaptar a condições onde outras culturas não se desenvolvem, fez com que o feijão caupi ganhasse a atenção de grandes produtores do Centro-Oeste brasileiro e do mercado internacional.

A produção em grandes áreas tende a aumentar. Entretanto, a cultura apresenta algumas limitações no cultivo, como seu porte, hábito de crescimento indeterminado e produtividade limitada.

O hábito de crescimento indeterminado é característico do feijão, desta forma, ao final do ciclo, as plantas podem apresentar vagens secas, vagens no ponto ideal de colheita e vagens verdes. Em pequenas propriedades, as plantas são arrancadas ou até mesmo cortadas para perderem a água e uniformizarem a umidade para, então, possibilitar o desprendimento dos grãos da planta. No entanto, essa prática é inviável em propriedades maiores, sendo necessária a aplicação de dessecantes para uniformizar a senescência e o teor de umidade das plantas, viabilizando, assim, a colheita mecanizada.

É importante considerar que os herbicidas utilizados para a dessecação, além de não possuírem registro para essa finalidade, podem acumular teor residual nos grãos acima dos teores tolerados pelos órgãos reguladores. Além disso, não há conhecimento sobre consequências da dessecação para a qualidade dos grãos.

Qualidade de feijão, em geral, compreende baixo tempo de cocção, formação de caldo espesso e maciez após a cocção. Os consumidores e os comerciantes associam esses atributos de qualidade à mudança na coloração dos grãos. Estas mudanças na coloração ocorrem durante o armazenamento e são intensificadas quando as condições de temperatura, umidade do ar e dos grãos são elevadas.

No caso do feijão caupi, da variedade Bico de Ouro, os grãos tendem a escurecer durante o armazenamento, de forma semelhante ao que ocorre com o feijão carioca, como resultado de reações químicas e enzimáticas, que alteram, também, a qualidade físico-química e sensorial dos grãos. Desta forma, a redução de temperatura e a mudança na atmosfera de armazenamento surgem como ferramentas para minimizar essas perdas de qualidade durante o armazenamento.

Práticas de mudança na temperatura e da atmosfera durante o armazenamento são ferramentas viáveis, tendo em visto a valorização do feijão caupi na entressafra, quando o valor do produto pode ser quatro vezes maior do que o valor praticado durante a safra.

## **1.1 Hipóteses**

A aplicação de herbicidas dessecantes na pré-colheita compromete a qualidade dos grãos, refletindo em danos latentes que se manifestarão ao longo do armazenamento.

Grãos de feijão caupi tratados com herbicidas dessecantes na pré-colheita apresentam teor residual de herbicidas acima dos limites máximos estabelecidos pela legislação.

O armazenamento em atmosfera com nitrogênio a 20°C mantém a cor e o tempo de cocção desejados pelo consumidor.

## **1.2 Objetivos gerais**

Avaliar a qualidade de grãos de feijão caupi em função do herbicida dessecante utilizado na pré-colheita e das condições de armazenamento.

## **1.3 Objetivos específicos**

1.3.1. Avaliar efeitos da aplicação de herbicidas na pré-colheita sobre a qualidade de feijão caupi da variedade Bico de Ouro.

1.3.2. Verificar a suscetibilidade dos grãos às alterações de qualidade durante o armazenamento, em função do estresse causado pela aplicação de herbicidas na pré-colheita.

1.3.3. Determinar condições ótimas de atmosfera e temperatura de armazenamento para a manutenção da qualidade dos grãos de feijão caupi da variedade Bico de Ouro durante 12 meses de armazenamento.

## 2 Revisão bibliográfica

### 2.1 Aspectos econômicos e de cultivo do feijão caupi

O feijão, pertencente à família das Fabáceas, antiga família das leguminosas, é considerado o segundo grão em importância mundial dentre os grãos desta família, ficando somente atrás da soja (*Glycine max* L.). No Brasil e no mundo são cultivadas várias espécies de feijão. As espécies mais conhecidas são *Phaseolus vulgaris* L. e *Vigna unguiculata* L., popularmente conhecidas como feijão comum e feijão caupi, respectivamente.

O feijão caupi possui composição básica semelhante ao feijão comum e é considerado uma importante fonte de proteínas, carboidratos, fibras, vitaminas e minerais (MAHADEVAMMA, 2003; VAINIO et al., 2015; THARANATHAN). Os carboidratos são os componentes majoritários, podendo representar de 50 a 60% da constituição do grão, seguido por proteínas (17 a 28%), lipídeos (3%) e cinzas (3%) (HUGHES et al., 2009; PHILLIPS et al., 2003).

A proteína do feijão caupi é considerada de qualidade inferior à dos produtos de origem animal devido ao baixo teor de aminoácidos sulfurados e pela resistência à proteólise em virtude da natureza dos grãos e da presença de fatores antinutricionais (DURANTI, 2006). Embora a proteína do feijão seja considerada de qualidade inferior, ela é rica em lisina e é geralmente consumida juntamente com cereais, os quais são ricos em aminoácidos sulfurados e pobres em lisina. Portanto, com essa combinação, obtêm-se pratos com boa qualidade proteica (DILIS; TRICHOPOULOU, 2009).

Por essas características que o feijão caupi exerce grande importância no combate à desnutrição em diversos países, sendo, por isso, cultivado em regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia, América, Europa e Oceania, abrangendo 97 países. Dentre os países produtores, Nigéria e Brasil são os que têm a maior área cultivada e as maiores produções, porém, esses mesmos países, não detêm os maiores níveis de produtividade (FILHO et al., 2011; NGALAMU et al., 2014).

Somente no Brasil, a produção de feijão caupi na safra 2016/17, segundo levantamento realizado pela Conab (2017), foi de 649 mil toneladas, o que representou um aumento de 79% superior às 362,5 mil toneladas da safra anterior.

Nesse cenário, o Mato grosso figurou como o principal produtor individual do grão, com participação de 34,7% do total.

Diferentemente da realidade de outras culturas, a produção média por hectare de feijão caupi ainda é baixa (próximo a  $0,5 \text{ ton} \cdot \text{ha}^{-1}$ ), quando comparada com soja, milho e o próprio feijão comum. Isso se deve, principalmente, aos escassos investimentos em melhoramento genético e ao fato de ainda ser produzido em pequenas áreas, de agricultura familiar, que geralmente despendem pouco investimento no manejo do solo e no manejo fitossanitário (FILHO et al., 2011; NEDUMARAN et al., 2013).

No Brasil, o feijão caupi ainda é cultivado predominantemente em regiões semiáridas do nordeste brasileiro (Figura 1), em pequenas propriedades, onde outras culturas leguminosas anuais, em razão da irregularidade das chuvas e das altas temperaturas, não se desenvolvem satisfatoriamente. No entanto, essa realidade está mudando, e nos últimos anos o feijão caupi passou a ser cultivado no Centro-Oeste brasileiro, como “safrinha”, após as culturas da soja, do milho, do arroz e, em alguns locais, até como cultura principal (CONAB, 2015; NGALAMU et al., 2014).

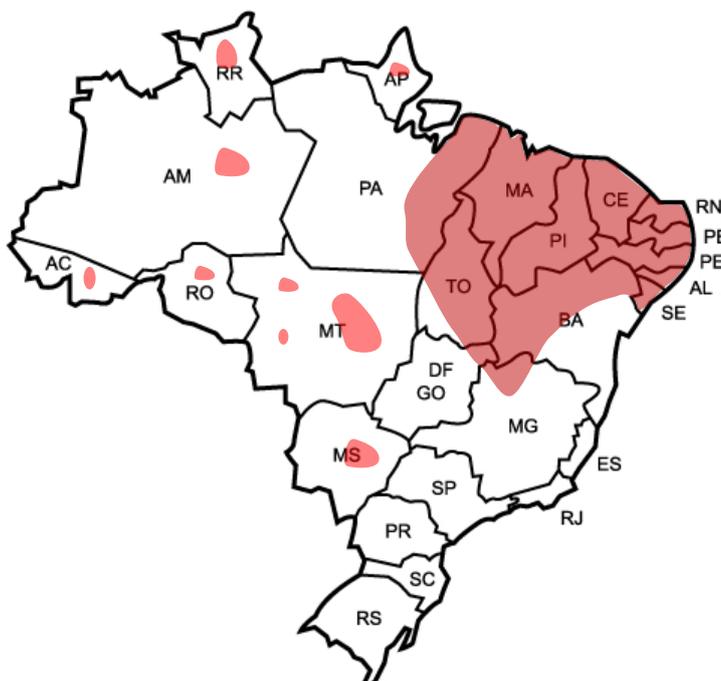


Figura 1. Distribuição geográfica das principais regiões produtoras de feijão caupi no Brasil  
Fonte: Dados obtidos da CONAB (2012).

O interesse de produtores do Centro-Oeste brasileiro por cultivar o feijão caupi é atribuído à perspectiva de crescimento do mercado interno e externo para o consumo. O grande número de países que comercializam feijão caupi, o volume de produção, sua qualidade nutricional e a escassez de alimentos no mundo são algumas das justificativas para o possível crescimento do mercado consumidor. O mercado para o feijão caupi ainda é restrito pelo fato dos países produtores serem, também, grandes consumidores. Desta forma, a comercialização internacional é restrita, atribuindo a cultura uma característica de produto regional.

## 2.2 Manejo de pré-colheita do feijão caupi

O feijão caupi, como a maioria das leguminosas, apresenta crescimento indeterminado. Isso significa que a área de cultivo não seca uniformemente e as vagens de uma mesma planta não atingem a senescência ao mesmo tempo, podendo apresentar regiões verdes e outras já secas durante a maturação (Figura 2). Para a redução no teor de água das plantas de maneira uniforme e rápida, e ainda diminuir a presença de plantas daninhas, produtores usam, frequentemente, herbicidas com ação dessecante (IQBAL et al., 2015; SOLTANI et al., 2013).



Figura 2. Feijão caupi, variedade Bico de ouro. Próximo à colheita, em uma mesma área ou mesmo entre vagens de uma única planta é possível encontrar algumas partes já secas e outras ainda verdes.

Dentre os herbicidas, o mais utilizado nas operações de pré-colheita é o glifosato (Figura 3A) (*N*-fosfometil glicina). Esse dessecante é utilizado geralmente em pós-emergência, não é seletivo e é capaz de controlar efetivamente diversas plantas invasoras (MARZABADI et al., 1992). Em contraste com muitos herbicidas de contato, os sintomas fitotóxicos causados pelo glifosato geralmente aparecem lentamente, podendo levar a morte vários dias após a aplicação. Os sintomas mais comuns observados após a aplicação são a clorose foliar, seguida de necrose, enrugamento ou malformações, necrose de meristema, rizomas e estolões de plantas perenes (MICHAEL et al., 1993).

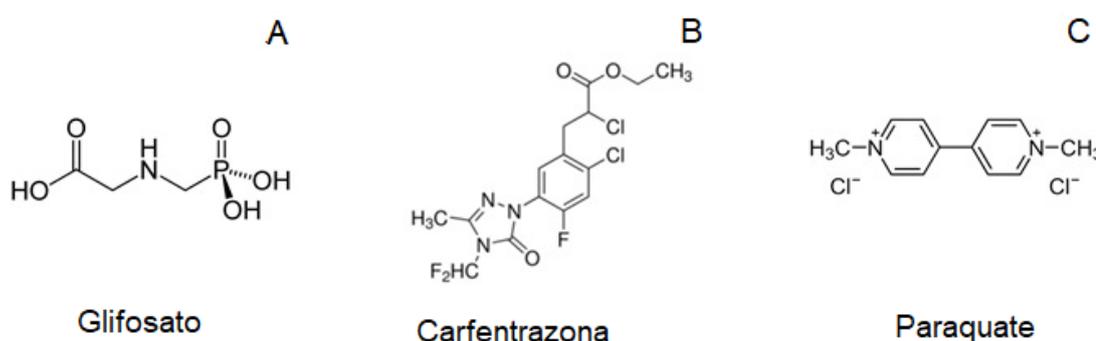


Figura 3. Estrutura química do glifosato (A), carfentrazona (B) e paraquate (C).

A translocação do glifosato se dá, predominantemente, via floema e também pelo xilema. O ingrediente ativo pode se mover via apoplasto, uma vez que a parede celular e a plasmalema possuem cargas negativas, que repelem o glifosato por seu caráter aniônico (YAMADA, 2007). Na planta, atua na via do chiquimato, especificamente inibindo a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), que catalisa a formação de 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato (EPSP) a partir de chiquimato-3-fosfato e fosfonolpiruvato (STEINRÜCKEN; AMRHEIN, 1980).

Com a inibição da enzima, há o bloqueio da via do chiquimato, que é responsável por fixar 20% do carbono em plantas, e a suspensão da síntese de três aminoácidos aromáticos essenciais: triptofano, fenilalanina e tirosina (KIELAK et al., 2011 READE; COBB, 2002; REDDY; DUKE, 2014).

Além disso, relatos sobre efeitos da aplicação de glifosato na síntese de fenóis específicos são numerosos. Uma revisão detalhada foi realizada por Egley et al. (1985) e seu estudo indicou que o glifosato pode aumentar a atividade da enzima

fenilalanina amônia-liase (PAL), concomitantemente com o decréscimo na concentração de fenóis secundários, provavelmente devido a uma redução no controle da inibição da PAL. Assim, além de suprimir os aminoácidos aromáticos, os níveis tóxicos de produtos da atividade da PAL, que são os íons amônio e cinamato (e seus derivados) podem sobrecarregar os processos metabólicos da célula vegetal (EGLEY et al., 1985).

Outros estudos, como o realizado por Maroli et al. (2016), destacaram que a utilização de glifosato em doses reduzidas induz a acumulação de aminoácidos recém formados devido à redução na síntese de novas proteínas. Gomes et al. (2016) avaliaram efeitos secundários do glifosato e do ácido aminometilfosfônico (AMPA), que é produto oriundo da metabolização do glifosato, e concluíram que além de atuações na rota do chiquimato, esses produtos atuam na biossíntese de clorofila, com efeitos diretos na fotossíntese. Além disso, os autores relataram aumentos de espécies reativas de oxigênio (ERO) acima do limite sensível das plantas, provocando a degradação da clorofila e diminuições na taxa fotossintética ou na eficiência da fotossíntese.

São inúmeros os relatos sobre a atuação do glifosato nas plantas e que indicam que compostos tóxicos intermediários são sintetizados quando o glifosato é metabolizado, mas este mecanismo ainda não está totalmente elucidado (GOMES et al., 2016). Em alguns estudos, pesquisadores buscaram determinar as consequências da exposição contínua ao glifosato. O que sabe até então, e não de forma unanime, é que a exposição conduz a efeitos indesejáveis para microrganismos do solo (KREMER; MEANS, 2009), insetos (SASKA et al., 2016), para a saúde reprodutiva de roedores machos (CAI et al., 2017), humanos (WILLIAMS et al., 2016) e para peixes (GIANNINI, 2013).

O mesmo nível de estudos relatados para o glifosato ainda não é observado com outros herbicidas. São escassos os relatos na literatura sobre o comportamento de herbicidas do grupo protoporfirinogênio oxidase (Protox). Herbicidas desse grupo são sistêmicos e são utilizados em combinação com glifosato para a dessecação de feijão caupi. Os inibidores de Protox, como a carfentrazone etílica (Figura 3B), são descritos como poderosos inibidores da enzima Protox, responsável pela biossíntese de clorofila e heme. Esta enzima catalisa a oxidação do protoporfirinogênio IX em protoporfirina IX, e conclui com a formação de radicais de oxigênio singlete e tripleto,

que são considerados potentes oxidantes de células vegetais (READE; COBB, 2002; ZHANG et al., 2004).

Outro herbicida muito utilizado para uniformizar a senescência de feijões em pré-colheita, porém com ação de contato, é o paraquate (Figura 3C) (SOLTANI et al., 2013). O paraquate atua especificamente no cloroplasto, reagindo com os elétrons produzidos pelo Fotosistema I. O paraquate inibe a redução do NADP ao NADPH, durante a fotossíntese. Essa interrupção leva à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e hidroxila livre ( $OH^\cdot$ ) (ANANIEVA et al., 2002; FUERST; VAUGHN, 1990). ERO interagem rapidamente com lipídeos, promovendo a peroxidação lipídica irreversível com danos subsequentes em organelas celulares, proteínas e destruição de ácidos nucleicos (AKSAKAL, 2013).

O uso generalizado do paraquate na agricultura é relatado como um dos responsáveis pela detecção de resíduos em amostras ambientais, alimentares e biológicas (AWADALLA, 2012; CHEN et al., 2012). A toxicidade causada pelo paraquate está essencialmente relacionada à sua rápida redução e posterior reoxidação, para produzir as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (DINIS-OLIVEIRA et al., 2006). Nos vertebrados, a exposição aguda a níveis elevados de paraquate provoca toxicidade pulmonar. A exposição crônica pode causar grandes danos ao fígado, aos pulmões e aos rins (AWADALLA, 2012; CHEN et al., 2012) e aumenta o risco de ocorrência da doença de Parkinson (GOLDMAN, 2014; HOU et al., 2017).

É importante ressaltar que os herbicidas utilizados para a dessecação não são registrados para tal função e podem apresentar teor residual nos grãos em níveis não tolerados pelo Codex Alimentarius (2016) e pela União Européia (2011). Na tabela 1 são apresentados os limites máximos de glifosato, carfentrazona e paraquate em grãos de feijão, estabelecidos pela Codex Alimentarius (2016) e pela União Européia (2011).

Tabela 1. Limites dos resíduos de glifosato, carfentrazone e paraquate para grãos de feijão.

<b>Produto</b>	<b>Codex Alimentarius (mg/Kg)</b>	<b>União Européia (mg/Kg)</b>
Glifosato	2,00	0,10
Carfentrazone	--*	0,01
Paraquate	0,50	0,02

\* Limites não estabelecidos.

São poucos os produtos registrados no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Agrofit) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a prática de dessecação de feijão em pré-colheita. Os produtos registrados são Sumisoya (Flumioxazina), Finale (Glufosinato de amônio) e Fascinate BR (Glufosinato de amônio), que devem ser utilizados, quando necessário, sempre com orientação de um Engenheiro Agrônomo.

### 2.3 Compostos bioativos no feijão caupi

Os compostos bioativos presentes nos grãos podem ser classificados em compostos fenólicos livres ou ligados à componentes de parede celular (ADOM; LIU, 2002). Os compostos fenólicos ligados, geralmente estão unidos por ligações covalentes a estruturas de parede celular, tais como celulose, hemicelulose, lignina, pectina e proteínas estruturais (WONG, 2006), enquanto os compostos fenólicos livres estão presentes, predominantemente, no vacúolo das células vegetais (PANDEY; RIZVI, 2009).

Os compostos fenólicos apresentam um anel aromático ou mais, com um ou mais grupos hidroxila ligados (Figura 4). Os compostos fenólicos são produzidos a partir da fenilalanina ou de outro intermediário da rota do chiquimato. A fenilalanina amonialiase (PAL) é a enzima-chave responsável por catalisar a biossíntese. Dependendo do grau de complexidade, os compostos fenólicos podem ser classificados em ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos e flavonoides (Figura 4) (CARTEA et al., 2011; ZUITER, 2014).

No feijão caupi, os ácidos fenólicos são descritos como ésteres de ácidos aldárico e metilaldárico, de ácidos trans-ferúlico, trans-*p*-cumárico e protocatecóico,

bem como derivados comuns de ésteres de ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido caféico, ácido gálico e ácido siríngico (CAI et al. 2003, NDERITU et al., 2013).

Em um estudo mais detalhado, realizado por Cai et al. (2003), foram identificados e quantificados ácidos fenólicos em 17 variedades de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.) e as concentrações variaram de 14,8 até 117,6mg/100g. Luthria e Pastor-corrales (2006), em um estudo semelhante conduzido com 15 variedades de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), reportaram teores entre 19,1 e 48,3mg/100g.

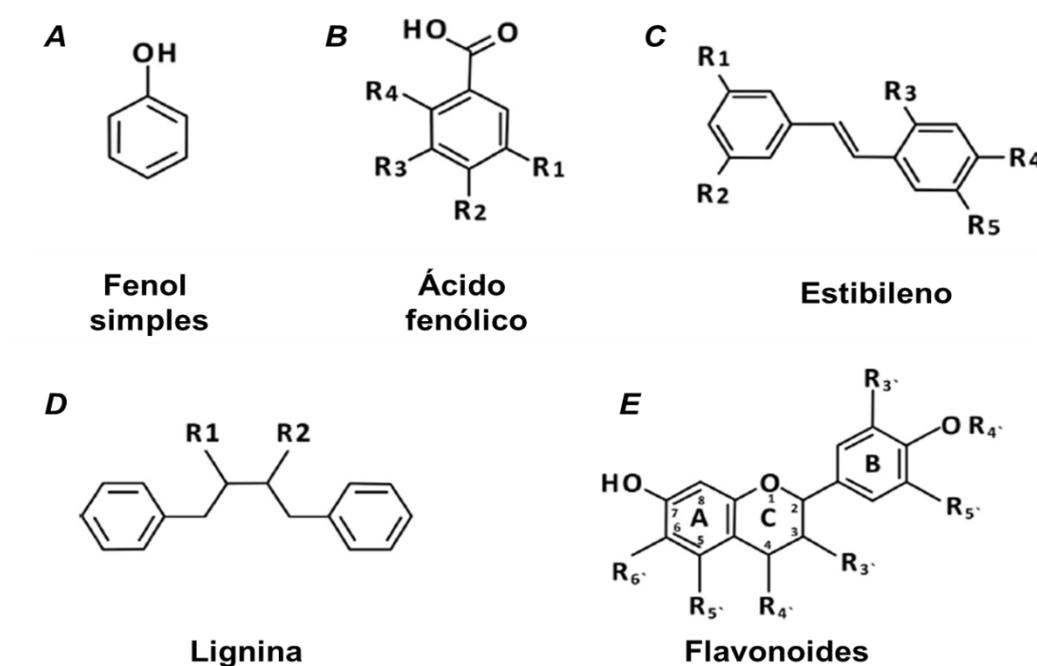


Figura 4. Diferentes grupos de compostos fenólicos e suas estruturas químicas.  
Fonte: ZUITER, 2014.

Os ácidos fenólicos são uma das classes de compostos bioativos que mais aparecem no feijão caupi e são descritos como compostos simples (Figura 4A e B), definidos como compostos intermediários ou de início de rota dos metabolitos secundários. Ao final da rota estão localizados compostos mais complexos, como os pertencentes ao grupo dos flavonoides (Figura 4E).

Os flavonoides existem naturalmente em formas conjugadas, geralmente como glicosídeos. Cada grupo de flavonoide consiste em um grande número de flavonoides específicos, que diferem no número e na posição de substituição por hidroxilação, hidrogenação, metilação, glicosilação, malonilação e sulfatação. As

principais classes de flavonoides são: flavonóis, flavonas, flavanonas, proantocianinas (catequinas), antocianinas, isoflavonas, dihidroflavonóis e chalconas (TAIZ; ZEIGLER, 2004; ZUITER, 2014).

Os flavonoides podem influenciar na cor do tegumento dos grãos. De modo geral, o feijão caupi de tegumento vermelho tende a acumular mais proantocianidinas, enquanto que genótipos de tegumento preto tendem a acumular mais antocianinas. No entanto, a cor do tegumento do grão não é um indicativo fiel sobre a quantidade de compostos fenólicos acumuladas no tegumento dos grãos (OJWANG et al. 2013).

Em variedades de feijão caupi de tegumento preto foram reportados de 20 a 25mg/100g de antocianinas no tegumento e de 3 a 100mg/100g de antocianinas no grão inteiro (CHANG; WONG, 2004; HA, et al. 2010; OJWANG, et al. 2012). Em todas as variedades de tegumento preto os elementos dominantes no grão inteiro foram delphinidina-3-O-glicosídeo, seguido de cianidina-3-O-glicosídeo e de petunidina-3-O-glicosídeo, enquanto que no tegumento dos grãos foram 3-O-glucosídeos delphinidina e cianidina. No entanto, até o momento, não há relatos de proantocianidinas nesses grãos.

As proantocianidinas (também denominadas de taninos condensados) são encontradas predominantemente no tegumento de feijão caupi de coloração vermelha, marrom e castanha. Os principais compostos incluem polímeros de (epi) catequina, (epi) galocatequina e (epi) afzelequina (DÍAZ et al. 2010). Ojwang et al. (2013), avaliando a presença de proantocianinas em feijão caupi, reportaram teores que variaram de 20 a 63mg/100g. Ainda de acordo com os autores, a variedade castanha clara continha cerca de 22mg/100g, enquanto que outra variedade marrom clara apresentou aproximadamente 63mg/100g.

A cor do tegumento de algumas variedades pode alterar durante o armazenamento, principalmente por alterações nos compostos fenólicos, enquanto em outras variedades, embora ocorram alterações nos constituintes dos grãos, o tegumento permanece com a mesma cor (FILHO et al., 2011; OJWANG et al., 2012). Essas alterações no armazenamento também implicam em modificações na disponibilidade e na estrutura desses compostos.

A alteração no comportamento dos compostos fenólicos não se restringe ao armazenamento. O processo de cocção e a digestão gastrointestinal também podem alterar o comportamento dos compostos fenólicos no alimento (GIL-IZQUIERDO et al., 2001; XU; CHANG, 2009). O conhecimento do destino dos metabolitos após o cozimento e potencial biodisponibilidade e bioatividade no organismo são fundamentais para que possam ser conhecidos os reais benefícios para a saúde. A digestibilidade gastrointestinal simulada é uma maneira fácil e barata de estudar a estabilidade dos componentes de alimentos durante a digestão (FAILLA; CHITCHUMRONCHOKCHAI, 2005).

A digestão do alimento pode liberar compostos fenólicos ligados (LIYANA; SHAHIDI, 2004; MANDALARI et al., 2010), melhorando sua bioacessibilidade. Hachibamba et al. (2013) avaliaram o comportamento do extrato do feijão caupi após a cocção e a digestão enzimática simulada, e concluíram que esse processo pode tornar alguns fenólicos menos extraíveis, promovendo a ligação com outros componentes de alimentos, ou mais extraíveis, devido a liberação de formas complexadas.

Nderitu et al. (2013) relataram que o processo de digestão de feijão caupi cozido afeta a composição fenólica. Os ácidos fenólicos, seus derivados e as proantocianinas, tais como a epicatequina e dímeros de procianidina, podem sofrer degradação, enquanto que os glicosídeos de flavonol e a catequina se mostram relativamente estáveis. No entanto, nos dois estudos, os extratos de feijão caupi mantiveram suas propriedades de eliminação de espécies reativas de oxigênio, responsáveis por causar doenças crônicas degenerativas (HACHIBAMBA et al. 2013; NDERITU et al., 2013).

Avaliações de Hachibamba et al. (2013) concluíram que após a cocção e a digestão do feijão caupi o seu extrato manteve uma taxa significativa de inibição na oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL - *Low Density Lipoproteins*) humano a uma concentração de 2mg/mL, comprovando que os compostos fenólicos podem potencialmente prevenir doenças cardiovasculares. Além disso, Gutiérrez-uribe et al. (2011) concluíram que o feijão caupi é um importante agente antioxidante, pois inibe o crescimento de células cancerígenas. A atividade

antioxidante foi atribuída principalmente aos compostos fenólicos livres, presentes, predominantemente, no tegumento do grão.

O benefício da ingestão de compostos fenólicos livres ou ligados depende do impacto desejado na saúde. A ingestão dietética de formas insolúveis (ou ligadas) terá uma atividade quimiopreventiva contra o câncer de cólon, por exemplo. Já a ingestão dietética de formas livres será mais rapidamente absorvida no estômago e no intestino delgado e distribuída por todo o corpo com outros benefícios para a saúde (CHANDRASEKARA; SHAHIDI, 2011).

Dessa forma, esses compostos atribuem ao feijão um caráter de alimento funcional com capacidade antioxidante, antimutagênica, anti-inflamatória e anti-hipertensiva, desempenhando, assim, um papel importante na prevenção de doenças crônicas degenerativas cardiovasculares e na prevenção de câncer (AWIKA; DUODU, 2016; HAYAT et al., 2014; OJWANG et al., 2012).

## **2.4 Pós-colheita de feijão caupi**

A produção de feijão caupi não ocorre durante todo o ano e para que a oferta seja garantida de forma uniforme é necessário o armazenamento dos grãos. Durante o armazenamento os grãos podem passar por alterações químicas e físicas que podem reduzir o valor de mercado. Segundo Njorge et al. (2014), as maiores alterações durante o armazenamento são observadas com a combinação de elevada temperatura, umidade relativa do ambiente e elevado teor de água dos grãos.

As alterações durante o armazenamento estão associadas, também, com a suscetibilidade da cultivar. Algumas variedades não apresentam alteração de cor durante o armazenamento, enquanto outras alteram a cor de maneira muito significativa, como é o caso da do feijão caupi da variedade Bico de Ouro.

O processo de escurecimento está associado com o envelhecimento do feijão, que, por sua vez, faz parte do desenvolvimento do defeito “HTC” (do inglês “*hard to cook*” ou “difícil de cozinhar”), que está relacionado ao aumento no tempo de cocção e na dureza dos grãos cozidos e com a redução nos atributos de palatabilidade, aceitabilidade e valor nutricional (GRANITO et al., 2008; NASAR-

ABBAS et al., 2008; NJOROGÉ et al., 2014; NJOROGÉ et al., 2016; SIQUEIRA et al., 2016).

O HTC não é necessariamente desenvolvido pelo tempo que transcorreu após a colheita, mas sim, principalmente, pelas condições nas quais os grãos foram mantidos nesse período. Há um consenso entre diversos autores de que o desenvolvimento desse defeito é um processo complexo, que engloba uma série de reações químicas e enzimáticas (NASAR-ABBAS, et al., 2008; NJOROGÉ et al., 2014; NJOROGÉ et al., 2016; SIQUEIRA et al., 2016).

De acordo com a literatura, há vários fatores externos e internos ao grão que contribuem simultaneamente para o desenvolvimento do fenômeno HTC (MAURER et al., 2004). Os fatores são categorizados como estruturais (degradação de organelas citoplasmáticas, baixa integridade do plasmalema e lignificação de lamelas médias) e alterações de composição (formação de pectina insolúvel, oxidação lipídica, polimerização, catabolismo do ácido fítico, interações entre proteínas, compostos fenólicos e polímeros, deposição de material semelhante à lignina) (AGUILERA; RIVERA, 1992; HINCKS; SANLEY, 1986; STANLEY; AGUILERA, 1985).

Um estudo realizado por Hincks e Stanley (1986) propôs que o fenômeno HTC nas leguminosas ocorre em altas temperaturas e umidade. Segundo os autores, essas condições propiciam a hidrólise de fitato e a deposição de material semelhante à lignina nas paredes celulares. Essas alterações causam a redução da separação celular dos grãos durante o cozimento e, conseqüentemente, um aumento no tempo de cocção.

Em outro estudo, realizado por Shiga e Lajolo (2006), foi observado que os constituintes de parede celular, dentre eles fibras detergentes ácidas e neutras, lignina, celulose e hemicelulose foram aumentados durante o armazenamento. Outros estudos, abordaram as mudanças que ocorrem na lignina, nos taninos condensados e na fitase durante o armazenamento e sua contribuição para o desenvolvimento de HTC em diferentes grãos, como feijão comum e caupi. (GÓMEZ-GARZA; MILÁN-CARRILLO, 2000; MEDOUA; MBOFUNG, 2006; PIRHAYATI et al., 2011). De acordo com os relatos, o mecanismo de lignificação se dá através da migração de compostos aromáticos de camadas mais externas dos

grãos para superfícies de paredes celulares onde atuam como precursores em reações semelhantes a lignificação.

Hincks e Stanley (1986) buscaram estabelecer a contribuição potencial da lignificação no fenômeno HTC em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) usando microscopia eletrônica de varredura. Nas suas descobertas, o material da parede celular de grãos duros apresentava a deposição de celulose, que é um precursor do processo de lignificação. Esse comportamento não foi observado no seu tratamento controle.

Em outra abordagem, Molina et al. (1983) relataram um aumento do teor de proteína lignificada em cotilédones de feijão (*Phaseolus vulgaris*) durante o armazenamento a 25°C e 70% de umidade relativa. Hincks e Stanley (1986) e Srisuma et al. (1989) também relataram aumentos significativos no teor de lignina e nos teores de proteínas lignificadas, os quais foram correlacionados com um aumento no tempo de cocção.

Hohlberg e Stanley (1987) relataram aumento significativo em pequenos polipeptídeos e aminoácidos aromáticos livres durante o armazenamento de feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.) sob diferentes condições de armazenamento. Pequenos polipeptídeos e aminoácidos aromáticos livres são produtos de hidrólise de proteínas. Desta forma, o aumento dessas proteínas simples e o desenvolvimento de HTC em grãos sugerem uma possível ligação, principalmente pela migração dos pequenos polipeptídeos e aminoácidos aromáticos livres para a lamela média, onde são polimerizados e lignificados, possivelmente pela ação de enzimas que atuam em temperaturas mais elevadas.

Kruger et al. (2014) e Njoroge et al. (2016) investigaram o papel que os minerais desempenham no desenvolvimento do defeito HTC no feijão caupi. Os autores observaram que Ca e Mg se movem e se concentram em torno da lamela da parede celular, onde provavelmente se ligam à pectina, reduzindo sua solubilidade. De acordo com Njoroge et al. (2016), o comportamento no desenvolvimento do defeito HTC varia durante o armazenamento de acordo com a temperatura e a umidade relativa de armazenamento, devido à redução da solubilidade da pectina, não como resultado da demetoxilação de pectina catalisada pela pectina metilesterase, mas sim, devido a ligação cruzada covalente com açúcares.

O desenvolvimento do HTC durante o armazenamento não é interessante porque, para o consumidor, o feijão de qualidade possui baixo tempo de cocção, forma caldo espesso e é macio após o preparo. No momento da compra, os consumidores associam a cor do tegumento clara do produto ao grão recém-colhido, com baixo tempo de cocção e macio após o preparo. Já os grãos escuros, são considerados velhos e com características tecnológicas indesejáveis. Hughes e Sandstead (1975) reportaram que os consumidores e os processadores de feijão evitam comprar o produto escuro, pois a cor é considerada como um índice de qualidade.

Para minimizar a perda de qualidade durante o armazenamento de feijão existem algumas técnicas, como o uso de atmosfera modificada com nitrogênio (BRACKMANN et al., 2002; NASAR-ABBAS et al., 2008a) e de baixas temperaturas (CAFFIN, 2002; MARIA et al. 2007; NASAR-ABBAS et al., 2009; YOUSIF, DEETH; YOUSIF et al., 2003), os quais parecem ser eficazes na preservação de características físicas, químicas e tecnológicas de feijões durante o armazenamento.

Existem muitos estudos em que pesquisadores avaliaram efeitos da temperatura e da umidade relativa durante o armazenamento sobre propriedades físico-químicas e tecnológicas de feijões comuns. No entanto, há poucos relatos na literatura sobre o uso de atmosfera modificada de armazenamento com nitrogênio.

Nasar-Abbas et al. (2008) armazenaram fava (*Vicia faba*) sob atmosfera modificada com nitrogênio e concluíram que este é o melhor sistema de armazenamento para preservar a cor do tegumento e o comportamento de cocção após 12 meses de armazenamento. As mudanças na cor e no teor de fenólicos parecem ocorrer em conjunto com o endurecimento do grão, de acordo com a pesquisa realizada por Brackmann et al. (2002) e Nasar-Abbas et al. (2008a).

Em outro estudo, realizado por Vanier et al. (2014), com feijão carioca (*Phaseolus vulgaris* L.), a utilização de nitrogênio no sistema de armazenamento reduziu os estresses celulares causados pelo armazenamento adverso na atmosfera normal (com presença de oxigênio). Desta forma, o nitrogênio no ambiente de armazenamento manteve a qualidade dos grãos por um período maior do que o armazenamento sob sistema convencional (com oxigênio).

### **3 CAPÍTULO 1 – Efeitos da utilização dos herbicidas glifosato, carfentrazone e paraquate na dessecação pré-colheita sobre propriedades químicas e tecnológicas do feijão caupi da variedade Bico de Ouro**

#### **3.1 Introdução**

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.) é considerado resistente às condições de tempo seco e quente, observadas principalmente nas regiões semiáridas em todo o mundo (FAO, 2017). No Brasil, o feijão caupi foi inicialmente cultivado em pequenas fazendas localizadas no Norte e no Nordeste do país (FILHO et al., 2011). No entanto, hoje em dia, o feijão caupi está sendo cultivado em grandes fazendas localizadas no centro-oeste do país, onde a colheita manual deu espaço à colheita mecânica, já que a área colhida em cada fazenda pode variar de poucas centenas a mais de 1000 hectares.

O feijão caupi naturalmente apresenta hábito de crescimento indeterminado. Isso significa que as plantas podem reter folhas verdes durante a maturação do grão, o que prejudica ou atrasa a colheita mecanizada (IQBAL et al., 2015). Assim, o tratamento com herbicidas é necessário para permitir a colheita mecanizada. A estratégia é amplamente empregada em grandes áreas de cultivo, especialmente em espécies e cultivares que expressam o hábito de crescimento indeterminado (SOLTANI et al., 2013).

Os herbicidas mais utilizados pelos agricultores brasileiros são o glifosato, os inibidores de protox e o paraquate, bem como a combinação de inibidores de glifosato e protox nos mesmos tratamentos de pulverização. É importante ressaltar que os herbicidas citados não podem ser utilizados no feijão caupi durante a fase de maturação. No entanto, os agricultores ainda assim utilizam esses tratamentos, uma vez que é a única maneira de viabilizar a colheita mecanizada com bom rendimento.

Os efeitos dos herbicidas na dessecação das culturas estão bem estabelecidos, mas poucos relatos na literatura informam sobre o impacto da dessecação na qualidade dos grãos. De acordo com Unver et al. (2010), as plantas podem apresentar respostas diferentes aos estresses bióticos e abióticos, o que afeta o teor dos compostos bioativos das plantas. Komives e Schröder (2016) publicaram um artigo de revisão sobre o mecanismo de ação do glifosato e seus

efeitos sobre os metabólitos secundários das plantas e declararam que mais estudos são necessários para elucidar a síntese de metabólitos especializados em função dos tratamentos de dessecação.

Objetiva-se, com o presente estudo, avaliar efeitos do uso de glifosato, glifosato mais carfentrazona, e paraquate como herbicidas dessecantes pré-colheita sobre propriedades químicas e tecnológicas dos grãos de feijão caupi da variedade Bico de Ouro. Os teores residuais dos herbicidas nos grãos também foram avaliados.

## **3.2 Material e Métodos**

### **3.2.1 Material**

Foram utilizados grãos de feijão caupi da variedade "Bico de ouro" produzidos na safra 2015/2016, no interior de Primavera do Leste, Mato Grosso, Brasil. Foram utilizadas quatro parcelas de campo de 25ha cada. Em cada parcela de 25ha, três áreas de 10mx20m foram consideradas como repetições para análises de amostras. As práticas agronômicas de semeadura, adubação e manejo de insetos e fungos foram idênticas em todos os campos. Além disso, a fertilidade do solo foi semelhante entre as parcelas de campo.

Foram testados três tratamentos: 1) o tratamento A (GLI) consistia em 1824g de ingrediente ativo de glifosato (Glizmax® Prime, Monsanto do Brasil, São Paulo, Brasil) por hectare; 2) o tratamento B (GLI/CAR) consistia em 1824g de ingrediente ativo de glifosato + 0,032g de ingrediente ativo de carfentrazona (Aurora®, FMC Corporation, Filadélfia, EUA) por hectare; e 3) o tratamento C (PAR), referente a aplicação de 552g de ingrediente ativo de paraquate (Tocha®, HuBei XianLong Chemical Industry Co., China) por hectare. Uma das áreas de cultivo (25ha) foi mantida sem aplicação de herbicida pré-colheita (SEM). Na figura 3 são apresentadas imagens das diferentes áreas após 24h de dessecação ou colheita manual, no caso do tratamento sem aplicação de herbicida.



Figura 5. Áreas com os diferentes tratamentos, onde “A” corresponde ao tratamento com glifosato, “B” glifosato + carfentrazona, “C” aplicação com paraquate e “D” sem aplicação (plantas colhidas manualmente e deixadas ao solo para secagem natural dos grãos).

Os herbicidas foram aplicados 70 dias após a semeadura, utilizando um pulverizador autopropelido (Jacto, Uniport3030, Brasil). As parcelas tratadas com GLI, GLI/CAR e PAR foram colhidas mecanicamente com 4, 3 e 2 dias, respectivamente, após o tratamento com herbicida, quando as plantas apresentaram abscisão total das folhas e os grãos estavam com grau de umidade de 13%. As plantas de feijão caupi não tratadas (sem aplicação) foram manualmente colhidas após 70 dias e colocadas sobre o solo (figura 5D). As plantas foram mantidas nessa condição até os grãos atingirem 13% de teor de água, para então os grãos serem desprendidos das plantas.

Os grãos de feijão caupi foram limpos, acondicionados em sacos de rafia e imediatamente transportados para o Laboratório de Pós-Colheita, Industrialização e Qualidade de Grãos (LABGRÃOS) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), onde foram armazenados e analisados.

### 3.2.1 Métodos

#### 3.2.1.1 Cor do tegumento e tempo de cocção

Os atributos de cor das amostras de feijão foram determinados utilizando um colorímetro Minolta (CR-410, Konica Minolta, Japão). O parâmetro colorimétrico  $a^*$  foi obtido e utilizado para comparação de amostras. O valor  $a^*$  expressa vermelho (+) ou verde (-) (figura 6), sendo calibrado com um padrão de fundo branco que acompanha o aparelho.

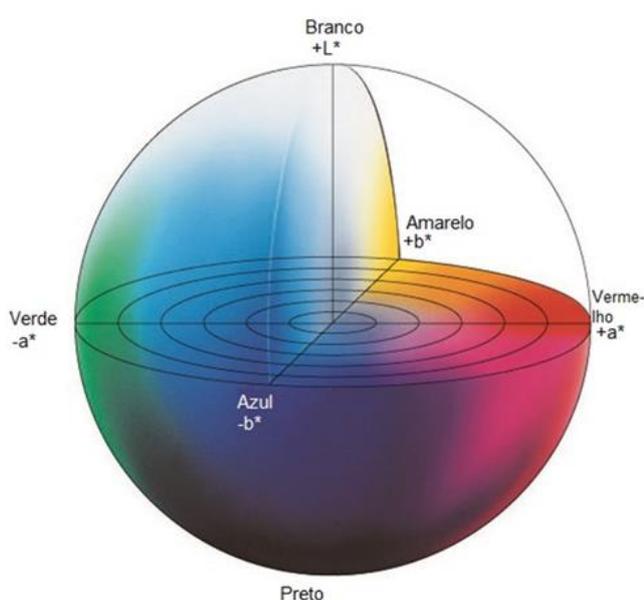


Figura 6. Diagrama para a localização das cores no eixo colorimétrico.

O tempo de cocção foi determinado segundo o método proposto por Mattson (1946) e alterado por Wang e Daun (2005). O tempo de cocção foi avaliado com 25 grãos uniformes e inteiros previamente embebidos em 80mL de água destilada, por 14h, a 25°C, e colocados no equipamento de Mattson modificado, com 25 hastes. Cada haste apresenta comprimento de 2,0mm e massa de 89g, possuindo, na extremidade, uma ponta afunilada com 2,05mm de diâmetro e comprimento de 9mm, para a penetração no grão em análise. O equipamento com os grãos foi colocado em copo de Becker de 2000mL, contendo 400mL de água destilada, fervendo em chapa elétrica. Em continuidade, o tempo de cocção das amostras passou a ser cronometrado em minutos após a água atingir a temperatura de 90°C. O tempo de cocção era finalizado pela queda da 13ª vareta, perfurando, deste modo, mais de 50% dos grãos.

Foram também determinadas as alterações no valor  $a^*$  ( $\Delta a^*$ ) e no tempo de cocção ( $\Delta_{\text{tempo de cocção}}$ ) do feijão caupi durante 8 meses de armazenamento. O caupi foi armazenado a 25°C em sacos de polietileno de 0,16mm de espessura de filme e capacidade para 1,5kg de feijão caupi. Os grãos foram acondicionados em uma nova embalagem de polietileno a cada 30 dias para evitar a ausência de oxigênio.

### **3.2.1.2 Compostos fenólicos totais e proantocianidinas**

#### **3.2.1.2.1 Extração de fenólicos livres**

A extração de compostos fenólicos livres foi realizada de acordo com o método descrito por Qiu et al. (2010), com algumas modificações. O grão moido (2g) foi extraída duas vezes com solvente Acetona/Água (70:30 v/v). Para cada extração, a mistura foi mantida num agitador mecânico (*Certomat Biotech International*, Alemanha) durante 1h a 150rpm, em temperatura ambiente. Após centrifugação (5430-R, *Eppendorf AG*, Alemanha) a 1430 x g durante 5min, os sobrenadantes obtidos a partir de cada extração foram combinados e concentrados até à secura utilizando um evaporador rotativo a 35°C. Os extratos secos foram redissolvidos em 20mL de solvente Acetona/Água (70:30 v/v) e utilizados como extratos brutos para a quantificação total dos compostos fenólicos livres.

#### **3.2.1.2.2 Extração de fenólicos ligados**

A extração de compostos fenólicos ligados foi realizada de acordo com o método descrito por Alves et al. (2016), com pequenas modificações. Lavou-se o resíduo obtido após duas fases da extração de fenólicos livres utilizando Acetona/Água (70:30 v/v) com água destilada, filtrou-se e deixou-se secar, sob escuro. Inicialmente, adicionou-se 5,0mL de água destilada ao resíduo da extração de compostos fenólicos livres. Em seguida, o resíduo foi hidrolisado com 5 $\mu$ L de  $\alpha$ -amilase (50 unidades/ $\mu$ L) de *Bacillus licheniformis* (*Sigma-Aldrich*, Estados Unidos) a 37°C durante 15min. A reação enzimática foi então interrompida, deixando o material a 90°C durante 5min. O material foi submetido a hidrólise alcalina com 40mL de NaOH 4M em um homogeneizador durante 4h. Após digestão, a solução foi ajustada para um pH entre 1,5 e 2,0, com HCl 6M, e depois extraída três vezes com alíquotas de 70mL de acetato de etila. As frações de acetato de etila combinadas foram

evaporadas até à secura e avolumadas em 5mL de solvente Acetona/Água (70:30 v/v), constituindo o extrato de compostos fenólicos ligados (ou também denominados “complexados” ou “insolúveis”).

#### **3.2.1.2.3 Quantificação de fenóis**

O teor de compostos fenólicos livres e ligados foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, com modificações (SINGLETON; ROSSI, 1965). Resumidamente, foram misturados 100µL dos extratos, 400µL de água destilada e 0,25mL de reagente Folin-Ciocalteu 1N para, após 8 minutos, adicionar 1,25mL de carbonato de sódio 7,5%. Depois de reagir durante 120min, a absorbância da mistura foi medida a 725nm (espectrofotômetro UV 17000, *Shimadzu*, Japão). A quantificação foi realizada utilizando uma curva de calibração feita com ácido gálico dissolvido em solvente Acetona/Água (70:30 v/v), que foi o mesmo solvente utilizado para avolumar os extratos das diferentes amostras. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100g de feijão caupi, com base no peso seco.

#### **3.2.1.3 Teor de proantocianidinas**

O teor de proantocianidinas foi determinado conforme método descrito por Díaz et al. (2010). Basicamente, 0,5 mL do extrato foram pipetados (mesmo extrato utilizado para quantificação de compostos fenólicos livres) em tubos de vidro. Em seguida, foram adicionados 3,0mL de butanol acidificado (butanol: HCl, 950mL: 50mL) e 100mL de reagente férrico. A mistura foi fervida (97-100°C) durante 30min. A absorbância foi medida a 550nm e os resultados foram expressos em mg de leucocianidinas por 100g de feijão caupi, com base no peso seco.

#### **3.2.1.4 Discriminação de metabólitos por LC-ESI-qTOF-MS**

O mesmo extrato utilizado para determinação de compostos fenólicos totais foi utilizado para análise em cromatógrafo líquido acoplado à espectrômetro de massas com ionização por *electrospray* e analisador de massas por tempo de voo (LC-ESI-qTOF-MS). As amostras foram filtradas através de um filtro de membrana de nylon de 0,45 µm (*Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Hesse, Alemanha*). A

análise de LC-ESI-qTof-MS foi realizada num sistema *Prominence - UFLC* (*Shimadzu*, Japão) acoplado a analisadores de massas do tipo quadrupolo e tempo de voo (*Impact HD, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha*). Os metabólitos foram separados utilizando uma coluna C18 Bidentate (100 x 2,1mm, *MicroSolv Technology Corp., Leland, NC, USA*). As fases móveis foram: água com 0,1% de ácido fórmico (pH 2,8, solvente A) e acetonitrila (solvente B). O gradiente foi ajustado como segue: iniciado a 5% de B, aumentado linearmente para 90% de B com 15min, e mantido durante 3min a 90% de B; Voltou a 5% B em 2min e manteve-se a 5% B por 6min, em fluxo de 0,2ml/min. O volume de injeção foi de 10µL. Todas as amostras foram injetadas duas vezes.

Os parâmetros para análise de MS foram ajustados usando o modo de ionização negativo com espectros adquiridos numa gama de massa de m/z 50 a 1200. Os parâmetros foram: Tensão capilar de +4,0kV; Temperatura do gás de secagem de 180°C; Fluxo de gás de secagem de 8,0L/min; Pressão do gás de nebulização de 2 bar; Colisão RF de 150Vpp; Tempo de transferência de 70µs; e pré-pulso de armazenamento de 5µs. Além disso, experimentos de MS/MS foram realizados ajustando valores de energia de colisão conforme segue: m/z 100, 15eV; M/z 500, 35eV; M/z 1000, 50eV, e utilizando ozônio como gás de colisão.

Os dados de MS foram analisados utilizando o *software Data Analysis 4.0* (*Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha*). A busca e o alinhamento de dados (m/z, tempo de retenção e intensidade) de LC-MS/MS foram realizados no *software ProfileAnalysisTM* (Versão 2.0, *Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha*) e submetidas à análise de componentes principais (PCA).

A identificação dos metabólitos referentes aos picos significativos na análise de componentes principais foi realizada combinando os valores precisos de m/z e os padrões de fragmentação MS<sup>n</sup> com dados de bases de dados (*Metlin, Kegg Phathay, PubChem*, banco de massa, *Maven, FooDB e ReSpect*) e literatura de referência com uma janela de precisão de massa de 5ppm. As identidades do ácido cítrico e da epicatequina foram confirmadas com padrões externos (*Sigma-Aldrich*).

### 3.2.1.5 Determinação dos resíduos de glifosato, paraquate e carfentrazone

Os residuais de glifosato e paraquate foram determinados de acordo com o método descrito pela *European Union Reference Laboratory for Residues of Pesticides* (ANASTASSIADES et al., 2010). O conteúdo residual de carfentrazone foi determinado utilizando o método AOAC 2007.01 (AOAC, 2007). Os resultados foram expressos em mg por quilograma de peso seco.

### 3.2.1.6 Análise de estatística

As determinações analíticas para as amostras foram realizadas em triplicata e os desvios padrão foram apresentados. Uma comparação das médias foi determinada com o teste de Tukey para um nível de significância de 5%, usando análise da variância (ANOVA).

Os dados de LC-ESI-qTOF-MS (intensidades de pico, massas e tempos de retenção) dos quatro tratamentos (GLI, GLI/CAR, PAR e controle) foram analisados através de análise de componentes principais (PCA), para identificar metabólitos potenciais para discriminação dos mesmos. A PCA foi realizada utilizando o *MetaboAnalyst 3.0*.

## 3.3 Resultados e discussão

### 3.3.1 Cor do tegumento e tempo de cocção

O valor  $a^*$  obtido a partir da análise colorimétrica dos grãos de feijão caupi está apresentado na figura 7. Os grãos obtidos das plantas tratadas com PAR apresentaram o maior valor de  $a^*$ . De acordo com Fujii et al. (1990) e Pinto et al. (2008), o uso de PAR aumenta a produção de ERO, o que intensifica a atividade da enzima polifenol oxidase (PPO) em plantas. A ativação da PPO pode aumentar a produção de quinonas, escurecendo a cor do tegumento dos grãos (MARLES et al., 2008), explicando o aumento do valor de  $a^*$  observado nos grãos colhidos de plantas tratadas com PAR.

O feijão caupi obtido de plantas tratadas com GLI apresentou um valor a\* superior ao dos tratamentos GLI/CAR e de SEM. Embora GLI atue inibindo a via do chiquimato, aparentemente não é tão estressante para as plantas em comparação com herbicidas que geram diretamente grande quantidade de ERO, como o paraquate. Nesse sentido, o uso de glifosato pode ter aumentado a síntese de compostos fenólicos nas plantas, bem como a polimerização destes compostos fenólicos do tegumento, promovendo coloração avermelhada.

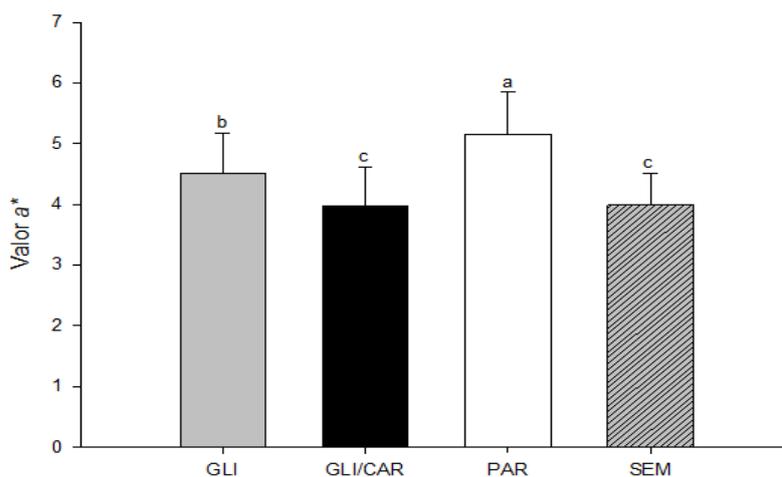


Figura 7. Valor a\* dos grãos submetidos a diferentes tratamentos, onde GLI, GLI/CAR, PAR e SEM, correspondem a glifosato, glifosato + carfentrazone, paraquate e sem aplicação (controle), respectivamente. Letras diferentes apontam valores que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

O tempo de cocção mais alto foi verificado nos grãos oriundos de plantas não tratadas com herbicidas, conforme pode ser observado na Figura 8.

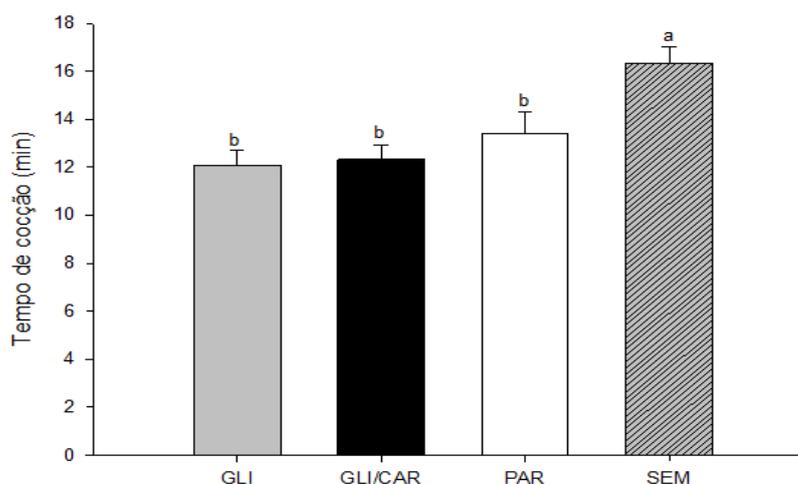


Figura 8. Tempo de cocção dos grãos submetidos a diferentes tratamentos, onde GLI, GLI/CAR, PAR e SEM, correspondem a glifosato, glifosato + carfentrazona, paraquate e sem aplicação, respectivamente. Letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

A lignificação da parede celular e a polimerização de constituintes fenólicos, principalmente a partir do tegumento dos grãos, foram descritas como os principais fenômenos que contribuem para o aumento do tempo de cocção dos grãos armazenados (NASAR-ABBAS et al., 2008). O amolecimento do feijão caupi durante a cocção depende da gelatinização do amido, que, por sua vez, depende da quantidade e da capacidade de entrada de água através do cotilédone. O menor tempo de cocção do feijão caupi submetido à aplicação de GLI, GLI/CAR e PAR pode ser resultado da destruição de membranas e organelas de células que facilitaram a entrada de água através do cotilédone, melhorando, assim, a transferência de calor durante a cocção.

Isto provavelmente favoreceu a gelatinização do amido e o amolecimento do cotilédone ao analisar o feijão caupi recém colhido. Outro fator que pode ter contribuído para o maior tempo de cozimento do feijão caupi não tratado (SEM) é o maior tempo que os grãos oriundos de plantas não tratadas (tratamento sem aplicação) levaram para alcançar o teor de umidade ótimo antes da operação de trilha.

### 3.3.2 Compostos fenólicos totais e proantocianidinas

Os compostos fenólicos livres e ligados foram primeiramente quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu. De acordo com Zhang et al. (2010), fitoquímicos, tais como fenólicos, existem principalmente como glicosídeos ligados a açúcares ou como outros complexos ligados a ácidos orgânicos, aminas, lípideos, carboidratos e outros fenóis.

Paiva et al. (2014) relataram que os compostos fenólicos estão normalmente presentes na forma ligada no arroz e são componentes típicos de estruturas complexas, tais como ligninas e taninos. No presente estudo, os compostos fenólicos livres corresponderam a cerca de 88% do total de compostos fenólicos presentes no feijão caupi. O maior teor de compostos fenólicos livres e ligados foi observado nos grãos colhidos a partir de plantas tratadas com glifosato (GLI) (figuras 9A e 9B).

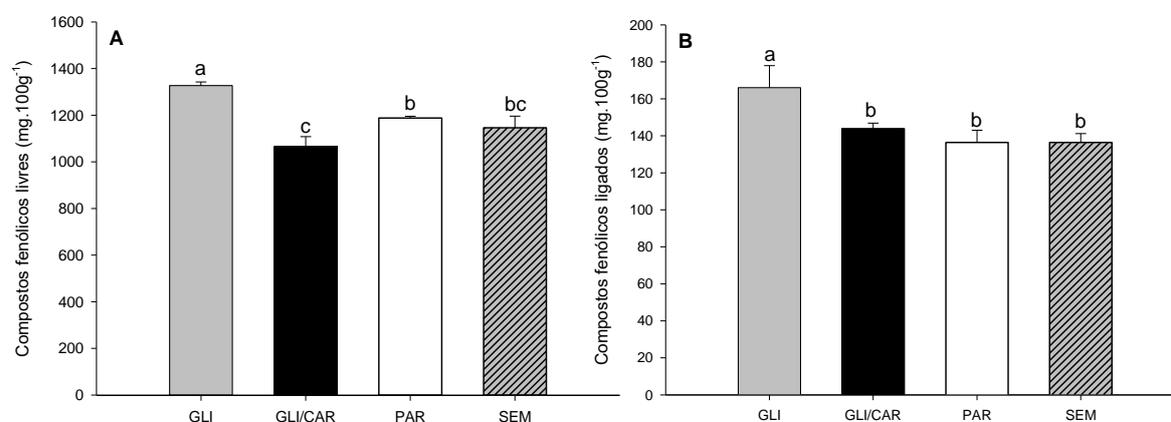


Figura 9. Compostos fenólicos livres (A) e ligados (B) dos grãos submetidos a diferentes tratamentos, onde GLI, GLI/CAR, PAR e SEM, correspondem a glifosato, glifosato + carfentrazone, paraquate e sem aplicação, respectivamente. Letras diferentes indicam valores que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

O tratamento GLI também proporcionou o maior teor de proantocianidinas no feijão caupi, tal como apresentado na figura 10. Acredita-se que o tratamento com GLI tenha regulado a atividade de enzimas ligadas à síntese fenólica, como um mecanismo natural de produção de metabólitos especializados. O GLI não é tão abrupto na promoção da senescência das plantas em comparação com GLI/CAR e

PAR, e, enquanto as plantas demoram 1 ou 2 dias a mais para estarem prontas para a colheita mecanizada, continuaram a produzir esses metabolitos.

Os resultados de proantocianidinas totais estão apresentados na figura 10. Os resultados seguiram uma tendência semelhante aos resultados do teor de compostos fenólicos livres e ligados (figuras 9A e 9B). As proantocianidinas são também conhecidas como taninos condensados e são consideradas como polímeros de unidades de flavan-3-ol, como catequina e epicatequina, que são descritas como produtos finais da biossíntese de flavonoides (ZUITER, 2014).

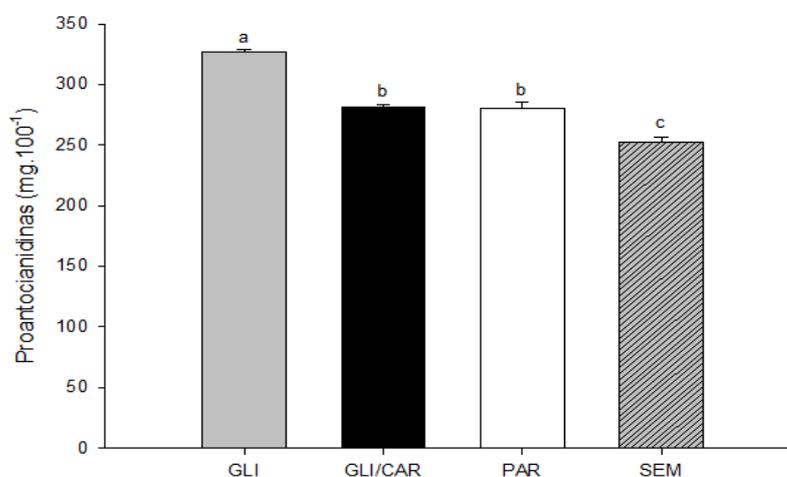


Figura 10. Teor de proantocianidinas dos grãos submetidos a diferentes tratamentos, onde GLI, GLI/CAR, PAR e SEM, correspondem a glifosato, glifosato + carfentrazone, paraquate e sem aplicação, respectivamente. Letras diferentes indicam valores que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

De acordo com Ávila et al. (2013), as proantocianidinas exibem capacidade antioxidante de 15 a 30 vezes superior aos ácidos fenólicos. Os baixos teores de proantocianidinas e de compostos fenólicos livres e ligados dos grãos do tratamento SEM sugerem que houve pouca relação entre a polimerização fenólica e o tempo de cocção inicial do feijão caupi recém-colhido, levando à conclusão de que a integridade das células do cotilédone foi o principal fator que contribuiu para as diferenças no tempo de cocção observadas entre grãos de plantas sem dessecação e dessecadas.



heptulose-7-fosfato sintase (DAHPS), que é a primeira enzima da via do chiquimato, induzindo a acumulação de metabólitos anteriores a ação da EPSPS.

Em suma, os achados de Zabalza et al. (2016) esclareceram que a atividade de fenilalanina-amônia-liase (PAL) é regulada positivamente devido ao tratamento com glifosato, acompanhada pela síntese de precursor de flavonóis e flavonoides.

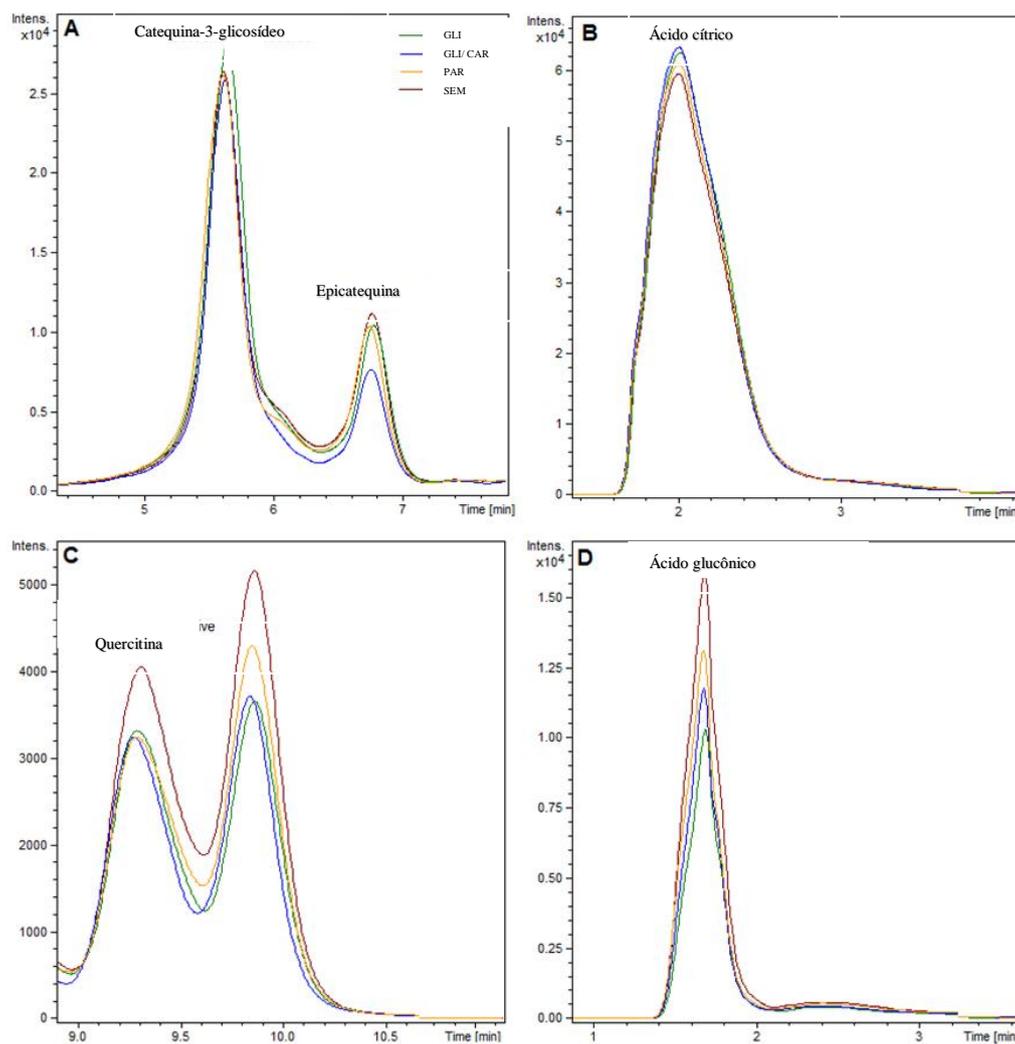


Figura 12. Identities dos metabólitos responsáveis pelas separações, onde GLI, GLI/CAR, PAR e SEM, correspondem a glifosato (A), glifosato + carfentrazona (B), paraquate (C) e sem aplicação (D), respectivamente.

Tabela 2. Análise de componentes principais de grãos de feijão caupi tratados com diferentes herbicidas.

Tempo de retenção (min)	Experimental <i>m/z</i>	Teórica <i>m/z</i>	Erro (ppm)	<i>mSigma</i>	Fragmentação <i>m/z</i>	Identificação	Quantificação (mg . 100g <sup>-1</sup> )			
							GLI	GLI/CAR	PAR	SEM
6,86	289,0723	289,0718	-0,60	45	-	Epicatequina <sup>1</sup>	0,92±0,0	0,66±0,0	0,89±0,1	1,12±0,1
1,69	195,0515	195,0510	-0,4	8,8	129,0216 75,0088	Ácido glucônico <sup>2</sup>	2,65±0,0	2,78±0,0	3,12±0,0	3,77±0,0
9,52	625,1426	625,1410	-2,5	46,2	300,0266	Quercetina glicosídeo <sup>2</sup>	1,69±0,0	1,62±0,0	1,65±0,0	1,87±0,0
1,98	191,0205	191,0197	-4,0	15,6	111,0088 85,0299	Ácido cítrico <sup>1</sup>	33,79±0,1	34,22±0,0	30,95±0,1	30,19±0,2
5,72	451,1258	451,1246	-2,7	59,8	289,0722 245,0821 137,0239	Catequina-3-glicosídeo <sup>2</sup>	1,95±0,0	1,58±0,0	1,64±0,0	1,65±0,0

<sup>1</sup> Confirmado em comparação com o composto padrão externo; <sup>2</sup> Confirmado em MS/MS; *mSigma* = encaixam entre o padrão isotópico medido e teórico. Quanto menor o valor *mSigma*, melhor será o ajuste isotópico.

O ácido cítrico ([M-H] - m/z 191,0205) foi responsável pela discriminação do feijão caupi tratado com GLI/CAR (figura 12B). Um trabalho anterior, conduzido por Wells e Appleby (1992), forneceu evidências de que outra molécula de inibidor de protóx – chamada "Lactofen" –, associada ao glifosato, potencializou o transporte de glifosato, lançando a molécula no simplasto e facilitando, assim, a penetração de glifosato em células vegetais.

A hipótese é de que comportamento semelhante ocorreu no presente trabalho, com a carfentrazona favorecendo a penetração do glifosato nas células dos grãos, o que, por sua vez, favoreceu a acumulação de ácido cítrico.

Zhu et al. (2008) observaram um aumento na expressão de cinco cDNAs que codificam para enolases, quando soja suscetível ao glifosato foi tratada com glifosato. A enolase é a nona enzima da via de glicólise, atuando na conversão de 2-fosfoglicolato a fosfoenolpiruvato. Os autores concluíram que maiores quantidades de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico são acumuladas nessa situação. As declarações de Zhu et al. (2008) dão suporte à hipótese mencionada.

A quercetina ([M-H] - m/z 625,1426) e o ácido glucônico ([M-H] m/z 195,0515) foram responsáveis pela discriminação do tratamento SEM (figuras 12C e 12D, tabela 2). De acordo com os estudos realizados por Ojwang et al. (2012), a quercetina é o principal flavonol encontrado nos feijões branco, preto, vermelho e marrom.

De Abreu et al. (2005), relataram que a quercetina é um antioxidante potencial de ERO. Embora os níveis de ERO não tenham sido determinados no presente estudo, os dessecantes aplicados são conhecidos por aumentar os níveis de ERO. Assim, pressupõe-se que um maior teor de quercetina foi determinado em amostras do tratamento de SEM porque menores teores de ERO foram sintetizados na ausência de tratamento com herbicidas.

Além da quercetina, o ácido glucônico foi responsável por discriminar o tratamento SEM. Baxter et al. (2007) relataram aumentos no teor de ácido glucônico em células de *Arabidopsis* quando submetidas a estresse oxidativo e justificaram esse comportamento pelo reencaminhamento do fluxo de carbono glicolítico para a via oxidativa das pentoses-fosfato.

Os autores também relataram uma diminuição na atividade das enzimas relacionadas ao ciclo do ácido tricarboxílico. Este fato dá suporte ao baixo teor de ácido cítrico (figura 12B), bem como ao maior teor de ácido glucônico determinado em amostras do tratamento SEM.

No tratamento PAR foi observado nível intermediário de ácido glucônico (figura 12C), quando comparado aos demais. O nível intermediário pode ser um resultado do reencaminhamento do fluxo de carbono para a via oxidativa das pentoses-fosfato associada à geração de ERO e uma dessecação abrupta da planta. Neste caso, a acumulação de ácido glucônico foi estimulada, mas durante menos tempo do que o tratamento de SEM.

### **3.3.4 Teor residual de glifosato, carfentrazona e paraquate em feijão caupi**

O teor residual dos herbicidas foi determinado após 30 dias de armazenamento a 15°C. Foi preparada farinha do feijão caupi SEM e dos feijões obtidos dos tratamentos GLI, GLI/CAR e PAR. Grãos de feijão caupi dos tratamentos GLI e GLI/CAR apresentaram teor residual de glifosato de 13 e 14mg/kg de peso seco, respectivamente. Os teores residuais de carfentrazona foram inferiores ao limite de quantificação de 0,01mg/kg de peso seco no feijão caupi tratado com GLI/CAR.

Os valores de glifosato de ambos os tratamentos foram superiores ao limite máximo de 2 e 0,1mg/kg estabelecidos pelo Codex Alimentarius (2016) e pela União Européia (2011).

O teor de paraquate foi de 0,84mg/kg de peso seco no feijão caupi tratado com PAR. O valor do paraquate determinado no presente estudo é superior aos limites máximos de 0,5 e 0,02mg/kg de grãos permitidos pelo Codex Alimentarius (2016) e pela União Européia (2011), respectivamente. Os efeitos da exposição ao glifosato na saúde humana são estudados há anos e ainda não há um consenso entre os pesquisadores sobre seus reais prejuízos.

O uso generalizado do paraquate na agricultura é relatado como um dos responsáveis pela detecção de resíduos em amostras ambientais, alimentares e biológicas (AWADALLA, 2012; CHEN et al., 2012). A toxicidade causada pelo paraquate está essencialmente relacionada à sua rápida redução e posterior

reoxidação, para produzir as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (DINIS-OLIVEIRA et al., 2006).

Nos vertebrados, a exposição aguda a níveis elevados de paraquate provoca toxicidade pulmonar. A exposição crônica, pode causar grandes danos ao fígado, ao pulmão e aos rins (AWADALLA, 2012; CHEN et al., 2012) e aumenta o risco do desenvolvimento da doença de Parkinson (GOLDMAN, 2014, HOU et al., 2017).

### **3.3.5 Suscetibilidade às alterações na cor do tegumento e no tempo de cocção durante o armazenamento**

Uma vez que o feijão caupi é submetido à dessecação, ocorrem diferentes respostas metabólicas dependendo do herbicida utilizado, como visto anteriormente nas seções 3.1, 3.2 e 3.3. Um problema que surge é a suscetibilidade do feijão caupi às mudanças de cor e no tempo de cocção durante o armazenamento.

Dessa forma, grãos dos tratamentos GLI, GLI/CAR, PAR e SEM foram armazenados a 25°C durante 8 meses, para avaliar diferenças na cor do tegumento ( $\Delta a^*$ ) e no tempo de cocção ( $\Delta_{\text{tempo de cocção}}$ ). Os resultados estão apresentados nas figuras 13 e 14.

Grãos do tratamento GLI/CAR apresentaram maior suscetibilidade a mudanças na cor do tegumento e no tempo de cocção durante o armazenamento (figuras 13 e 14), que são fenômenos envolvidos no aparecimento do defeito HTC em feijões armazenados (NASAR-ABBAS et al., 2008).

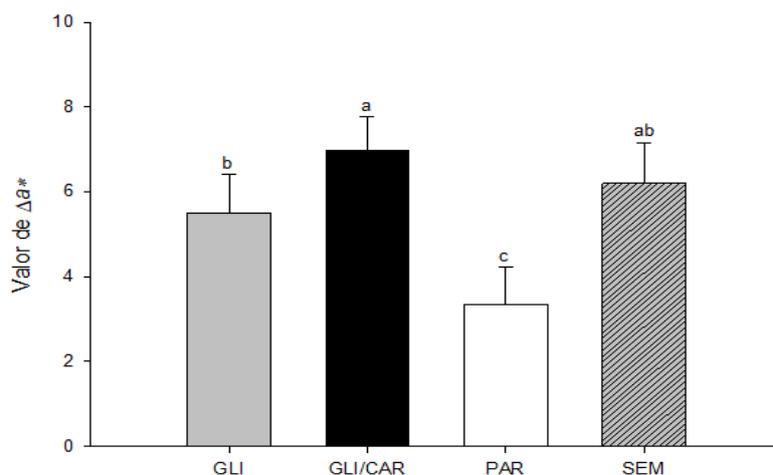


Figura 13. Suscetibilidade ao escurecimento do feijão caupi submetido a diferentes tratamentos, onde GLI, GLI/CAR, PAR e SEM, correspondem a glifosato, glifosato + carfentrazone, paraquate e sem aplicação, respectivamente. Letras diferentes indicam valores que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Os tratamentos com GLI e GLI/CAR aumentaram a cor do tegumento do feijão caupi em níveis similares ao tratamento SEM. O tratamento PAR proporcionou o  $\Delta a^{\#}$  mais baixo, o que pode ser um reflexo de um metabolismo de grãos mais lento (ou mais curto, se levado em conta o menor tempo de senescência após aplicação dos herbicidas).

Com a finalidade de verificar a atividade metabólica do feijão caupi, utilizou-se teste de germinação. Os resultados indicaram que o tratamento PAR apresentou apenas 58% de germinação quando comparado aos 86%, 87% e 94% de germinação dos tratamentos GLI, GLI/CAR e SEM (dados não apresentados).

Na figura 14, percebe-se certa desuniformidade na cor do do tegumento do feijão caupi. Em um mesmo tratamento, alguns grãos mais escuros e outros mais claros estão misturados nas amostras do oitavo mês de armazenamento, principalmente em tratamentos de PAR e SEM. Isto pode ser um resultado das variações nas respostas metabólicas dos grãos em função da sua maturidade no momento da aplicação dos herbicidas. Quando o dessecante é aplicado, alguns grãos estão totalmente maduros, enquanto outros estão verdes. Esta questão deve ser respondida em estudos futuros.

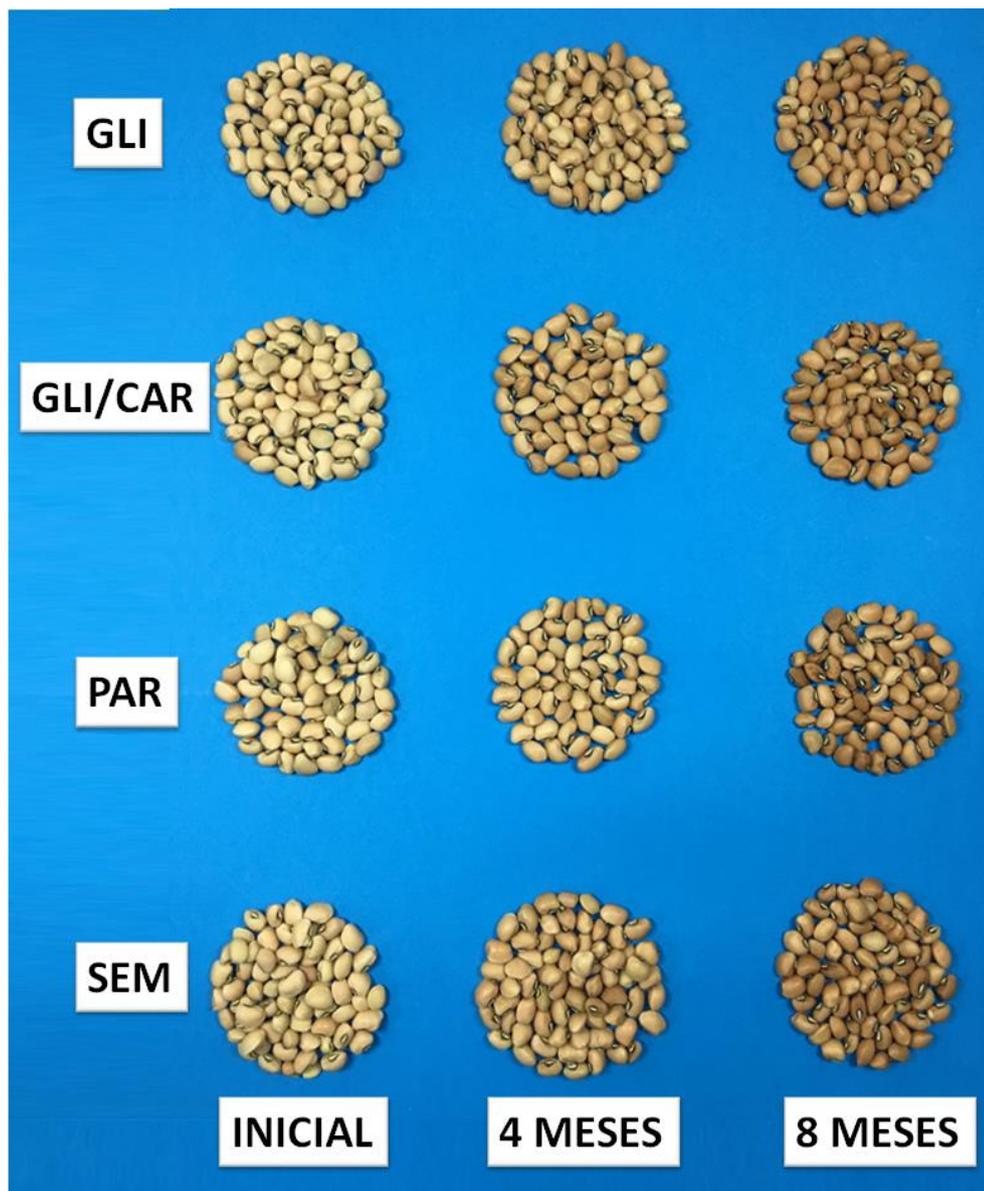


Figura 14. Feijão caupi submetido a diferentes tratamentos e armazenados por 8 meses, onde GLI, GLI/CAR, PAR e SEM, correspondem a Glifosato, Glifosato + Carfentrozona, Paraquate e Sem aplicação, respectivamente aplicações obtido antes e após 8 meses de armazenamento.

Os tratamentos GLI e PAR proporcionaram o menor tempo de cocção (figura 14). O metabolismo reduzido do feijão caupi tratado com PAR, com suporte dos resultados dos testes de germinação, provavelmente manteve as células do cotilédone apresentaram menor grau de lignificação.

O feijão caupi tratado com glifosato (GLI) foi o menos suscetível ao aumento no tempo de cocção após 8 meses de armazenamento a 25°C. Este fato indica que o tratamento com GLI impacta principalmente no metabolismo de flavonoides do

tegumento do feijão caupi, sem tanto efeito no processo de lignificação de paredes celulares das células do cotilédone.

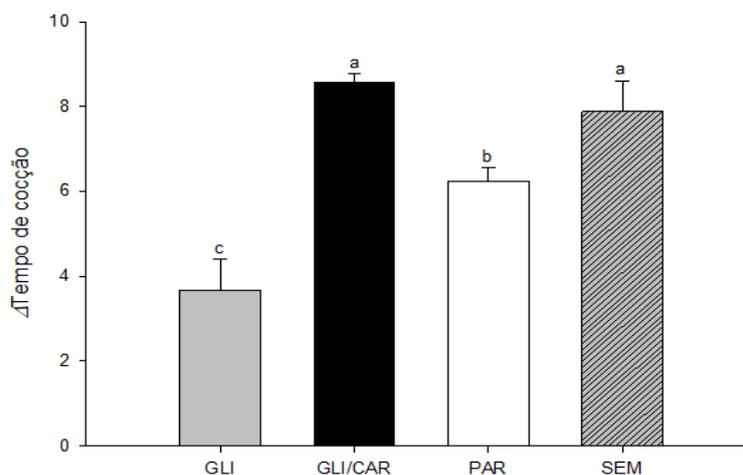


Figura 15. Suscetibilidade ao aumento no tempo de cocção dos grãos submetidos a diferentes tratamentos, onde GLI, GLI/CAR, PAR e SEM, correspondem a glifosato, glifosato + carfentrazone, paraquate e sem aplicação, respectivamente. Letras diferentes apontam valores que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Todos os dessecantes estudados proporcionaram menor tempo de cozimento para o feijão caupi logo após a colheita. No entanto, a cor do tegumento do feijão caupi tratado com PAR e GLI/CAR apresentou-se mais avermelhada do que o tratamento controle, sem a aplicação de herbicida. Isto não é desejado pelos agricultores, pelos comerciantes, pela indústria e nem pelos consumidores.

No armazenamento, o feijão caupi tratado com GLI e PAR apresentou melhor resistência às mudanças na cor do tegumento e no tempo de cozimento do que os tratamentos SEM e GLI/CAR. Isto pode ser considerado positivo, haja vista que o feijão caupi com cores menos avermelhadas é comercializado com preço mais elevado.

Entretanto, qualquer possibilidade de melhorias nas propriedades químicas e tecnológicas do feijão caupi não pode ser sobreposta pelos riscos que esses dessecantes apresentam quando excedem os limites máximos de tolerância nos alimentos.

Estudos de transcriptoma, proteoma e metaboloma podem ajudar a compreender as respostas metabólicas do caupi frente aos diferentes herbicidas dessecantes utilizados. Além disso, estudos com outros tipos de herbicidas, outras

doses dessecantes, outros períodos de aplicação e com outras condições de aplicação ajudarão agricultores e indústrias de feijão a encontrarem alternativas para uma colheita segura de feijão caupi nas grandes propriedades do país.

### **3.4 Conclusões**

Os herbicidas glifosato e paraquate promoveram maior escurecimento dos grãos logo após a colheita, porém esses mesmos grãos se mostraram menos suscetíveis às mudanças de cor no armazenamento. Os grãos que não foram submetidos ao tratamento com herbicidas apresentaram maior tempo de cocção logo após a colheita e, após o armazenamento, juntamente com os grãos tratados com glifosato mais carfentrazone, foram os que apresentaram maior tempo de cocção.

A aplicação de glifosato e paraquate propiciou teores residuais acima dos limites máximos estabelecidos pela legislação internacional. Desta forma, é imprescindível que os produtores respeitem as recomendações agronômicas, utilizando, quando necessário, produtos e manejos permitidos pela legislação.

## **4 CAPITULO 2 – Efeitos da temperatura e da atmosfera de armazenamento na qualidade de feijão caupi da variedade Bico de Ouro**

### **4.1 Introdução**

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.) é considerado uma importante fonte de proteínas, carboidratos, fibras, vitaminas e minerais (THARANATHAN; MAHADEVAMMA, 2003; VAINIO et al., 2015). O carboidrato é o componente majoritário, podendo representar de 50 a 60% da sua constituição (HUGHES et al., 2009). A proteína, com aproximadamente 25%, é um dos componentes mais importantes, pois serve como alternativa barata para quem não tem acesso a proteína de origem animal.

O feijão caupi é produzido predominantemente em países subdesenvolvidos da América Latina e da África (FILHO et al., 2011; NGALAMU et al., 2014). No Brasil, é cultivado principalmente em pequenas propriedades, localizadas nas regiões norte e nordeste. Porém, recentemente, o feijão caupi passou a ser incorporado ao arranjo produtivo do centro-oeste brasileiro como “safrinha” após as culturas da soja, do milho, do arroz e, em alguns locais, como cultura principal (FILHO et al., 2011).

Após a colheita, os grãos são geralmente submetidos à secagem e armazenados. Os grãos são organismos vivos e devem ser mantidos assim até o consumo. Para isso, é imprescindível que o armazenamento seja realizado com grau de umidade entre 11% e 13%, pois desta forma a atividade respiratória é mantida em níveis baixos, prolongando a manutenção da qualidade dos grãos. Graus de umidade elevados aceleram o processo respiratório dos grãos, ocorrendo alterações nas propriedades químicas e tecnológicas dos mesmos (BRAGANTINI, 2005).

Além do controle de umidade, a redução na temperatura de armazenamento é uma técnica utilizada para a manutenção da qualidade de feijão, sendo considerada uma ferramenta eficaz para a redução na atividade metabólica dos grãos, de insetos-praga e da microflora presente no ambiente de armazenamento (DEMITO; AFONSO, 2009; REED et al., 2007; RIGUEIRA, et al., 2009). O manejo de temperatura e umidade ainda pode ser combinado com mudança na atmosfera de armazenamento, pela redução da presença de oxigênio, via substituição por nitrogênio ou dióxido de carbono.

Estudos realizados por Nassar-abbas et al. (2008), com fava (*Vicia faba*), apontaram que a cor do tegumento e o teor de compostos fenólicos são preservados quando o armazenamento é realizado em atmosfera modificada com nitrogênio. Segundo Beninger e Hosfield (2003), a restrição ou a troca de oxigênio no ambiente de armazenamento é uma ferramenta fundamental para minimizar reações de oxidação de compostos fenólicos, que é apontada como um dos principais responsáveis pela mudança de cor do tegumento do feijão.

De acordo com Ojwang et al. (2012), a cor do tegumento dos grãos de feijão é uma base primária sobre a qual o consumidor faz a seleção dos grãos para o consumo. Isto porque o consumidor associa o grão de coloração clara ao produto recém-colhido, com baixo tempo de cocção e macio após o preparo. Já os grãos escuros, mais avermelhados, são considerados velhos e com características tecnológicas indesejáveis. Hughes e Sandstead (1975) reportaram que os consumidores e os processadores de feijão evitam comprar o produto escuro, pois a cor é considerada como índice de qualidade.

Qualidade para o consumidor de feijão compreende, basicamente, baixo tempo de cocção, maciez após a cocção e formação de caldo espesso após a cocção (NASAR-ABBAS, et al., 2008; NJOROGÉ et al., 2014). As condições de temperatura, umidade e teor de água dos grãos inadequadas no armazenamento e a suscetibilidade da cultivar são apontadas como principais responsáveis pela perda destes atributos, principalmente pela complexação pectina-cátion-fitato (NJOROGÉ et al., 2014), compactação das células de parede (SHIGA, 2004), interação entre proteínas e amido (LIU et al., 1992), ligações de taninos e outros compostos fenólicos com proteínas (MARIA et al., 2007) e lignificação da parede celular das células do cotilédone do feijão (HINCKS, 1986; SARMENTO et al., 2016).

Objetiva-se, com o presente estudo, avaliar efeitos do uso de nitrogênio e restrição de oxigênio (hermético) no armazenamento de feijão caupi da variedade Bico de Ouro em diferentes temperaturas (15, 20 e 25°C), por 8 meses, sobre propriedades tecnológicas dos grãos.

## 4.2 Material e Métodos

### 4.2.1 Material

Grãos de feijão caupi da variedade Bico de Ouro foram produzidos na safra 2015/2016 no município de Primavera do Leste, Mato Grosso, Brasil. A colheita dos grãos foi realizada de forma mecanizada, quando estes atingiram teor de água próximo a 13%. Os grãos foram limpos, acondicionados em sacos de rafia e imediatamente transportados para o Laboratório de Pós-Colheita, Industrialização e Qualidade de Grãos (LABGRÃOS) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), onde foram realizados o armazenamento e as análises.

As amostras foram homogeneizadas e quarteadas até 1,5kg e acondicionadas em embalagens de polietileno de 0,2mm de espessura, dimensões de 30x30x30cm. A vedação e alteração da atmosfera ( $N_2$  e Hermético) foram realizadas com a máquina Webomatic<sup>®</sup>. O armazenamento foi realizado no escuro, nas temperaturas de 15, 20 e 25°C e em diferentes atmosferas, sendo parte com nitrogênio e outra parte com restrição de oxigênio (hermético), em triplicata. Para simular o sistema convencional, as amostras foram acondicionadas nas embalagens de polietileno de 0,2mm de espessura e mantidas a 25°C. No sistema convencional, a cada mês as embalagens foram trocadas para que os grãos fossem expostos ao ar ambiente, simulando a aeração e evitando anaerobiose.

As avaliações foram realizadas em triplicata para cada uma das variáveis dependentes, no início do armazenamento (inicial) e ao final de 8 meses de armazenamento. Para cada tratamento foram coletadas três repetições.

### 4.2.2 Métodos

#### 4.2.2.1 Perfil colorimétrico

Os atributos de cor das amostras de feijão foram determinados utilizando um colorímetro Minolta (*CR-410*, *Konica Minolta*, Japão). O parâmetro colorimétrico  $a^*$  foi obtido e utilizado para comparação de amostras. O valor  $a^*$  expressa vermelho (+) ou verde (-) (figura 6), sendo ajustado com um padrão de fundo branco fornecido pelo fabricante do equipamento.

#### **4.2.2.2 Determinação dos compostos fenólicos livres na superfície dos grãos**

##### **4.2.2.2.1 Extração de compostos fenólicos**

Para a extração de compostos fenólicos solúveis em Acetona 70%, foram pesados exatamente 5,0g de grãos inteiros e, em seguida, adicionados 25ml de solvente Acetona/Água (70:30 v/v). As amostras ficaram 24 horas em agitação moderada e, após esse período, foram centrifugadas (*Eppendorf Centrifuga 5430R*) a 5300 x g durante 10 min e o sobrenadante coletado.

##### **4.2.2.2.2 Quantificação dos compostos fenólicos**

O teor de compostos fenólicos do grão inteiro foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, com algumas modificações (SINGLETON; ROSSI, 1965). Resumidamente, foram misturados 100µL dos extratos com 400µL de água destilada e 0,25mL de reagente Folin-Ciocalteu 1N para, depois, adicionar 1,25mL de carbonato de sódio 7,5%. Depois de reagir durante 120 minutos, a absorbância da mistura foi medida a 725nm (espectrofotômetro UV 17000, *Shimadzu*, Japão). A quantificação foi realizada utilizando uma curva de calibração feita com ácido gálico dissolvido em solvente Acetona/Água (70:30 v/v). Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100g de feijão caupi, com base no peso seco.

##### **4.2.2.3 Isotermas de hidratação**

As isotermas de hidratação dos diferentes tratamentos de feijão caupi foram avaliadas em triplicata, utilizando 30g de feijão caupi para cada repetição. No encharcamento, as amostras de feijão foram colocadas em sacos de tule e dispostas em béquer de vidro com capacidade para 250mL. Em seguida o material foi mantido em banho-maria (*Dubnoff Microprocessado - Q226M*, Brasil) a 40°C. A cada 5min as amostras foram retiradas do banho-maria, submetidas a centrifugação (*Eppendorf Centrifuga 5430R*) a 5300 x g durante 10min para, então, serem pesadas e a umidade determinada. A máxima capacidade de absorção de água do feijão caupi

foi estabelecida quando o peso da amostra estabilizou. A umidade foi expressa em porcentagem.

#### **4.2.2.4 Tempo de cocção**

O tempo de cocção foi determinado segundo o método proposto por Mattson (1946) e alterado por Wang e Daun (2005). O tempo de cocção foi avaliado com 25 grãos uniformes e inteiros previamente embebidos em 80mL de água destilada, por 14h, a 25°C, e colocados no equipamento de Mattson modificado, com 25 hastes. Cada haste apresenta comprimento de 210mm e massa de 89g, possuindo, na extremidade, uma ponta afunilada com 2,05mm de diâmetro e comprimento de 9mm, para a penetração no grão em análise. O equipamento com os grãos foi colocado em copo de Becker de 2000mL, contendo 400mL de água destilada, fervendo em chapa elétrica. O tempo de cocção das amostras passou a ser cronometrado após a água atingir a temperatura de 90°C e finalizado pela queda da 13ª vareta, perfurando, deste modo, mais de 50% dos grãos. O tempo de cocção foi expresso em minutos.

#### **4.2.2.5 Perfil textuométrico**

Aproximadamente 10g de grãos inteiros foram submetidos a cocção em 200ml água destilada à temperatura de  $98\pm 1^\circ\text{C}$ , por 17min. O tempo de cocção utilizado em todos os tratamentos foi obtido no início do armazenamento. Ao final de cada cocção toda a água foi removida e o perfil textuométrico determinado em equipamento *Stable Micro Systems Texture Analysers*, modelo *TA.XTplus*, com uma célula de carga de 5Kg. As leituras foram realizadas conforme descrito por Revilla e Vivar-Quintana (2008), no modo retorno ao início, com uma sonda cilíndrica de 35mm (P2), registrando o pico de força máxima. Os grãos inteiros foram axialmente comprimidos a uma taxa de 80% de sua altura original. As curvas força-tempo foram registradas a uma velocidade de  $1\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$  e os resultados corresponderam à média de 30 medições de grãos cozidos individuais expressa em Newtons (N).

#### 4.2.2.6. Análise estatística

As determinações analíticas foram realizadas em triplicata e os desvios padrão foram apresentados. Uma comparação das médias foi determinada com o teste de Tukey a 5% de significância, usando análise da variância (ANOVA).

### 4.3 Resultados e discussão

#### 4.3.1 Cor dos grãos armazenados

O valor  $a^*$  da análise colorimétrica do feijão caupi obtido antes e após 8 meses de armazenamento está apresentado na figura 17. O menor valor  $a^*$  foi observado nos grãos não armazenados. Após o armazenamento, o valor  $a^*$  aumentou para todos os tratamentos, sendo que os menores incrementos foram observados nos grãos armazenados com nitrogênio a 15 e a 20°C. Na prática, os resultados indicam que, quando se utiliza atmosfera com nitrogênio, não há necessidade de gasto energético no ambiente de armazenamento para resfriar a massa de grãos até 15°C.

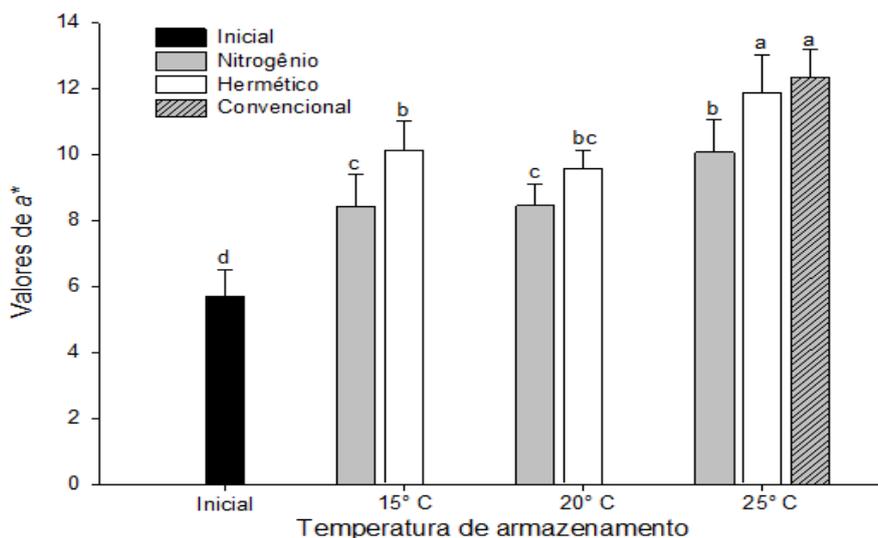


Figura 16. Valor de  $a^*$  do feijão caupi antes e após 8 meses de armazenamento em diferentes condições de atmosfera e temperatura. Letras diferentes apontam valores que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

A preservação da cor do tegumento pelo uso do nitrogênio se dá pela ausência de oxigênio e, conseqüentemente, redução na atividade das enzimas

polifenoloxidase e peroxidases, que causam a oxidação de compostos fenólicos presentes no grão (BRACKMANN et al. 2002). De forma análoga, temperaturas reduzidas, como 15 e 20°C, reduzem a atividade metabólica dos grãos, provavelmente contribuindo para a redução na atividade das enzimas mencionadas anteriormente.

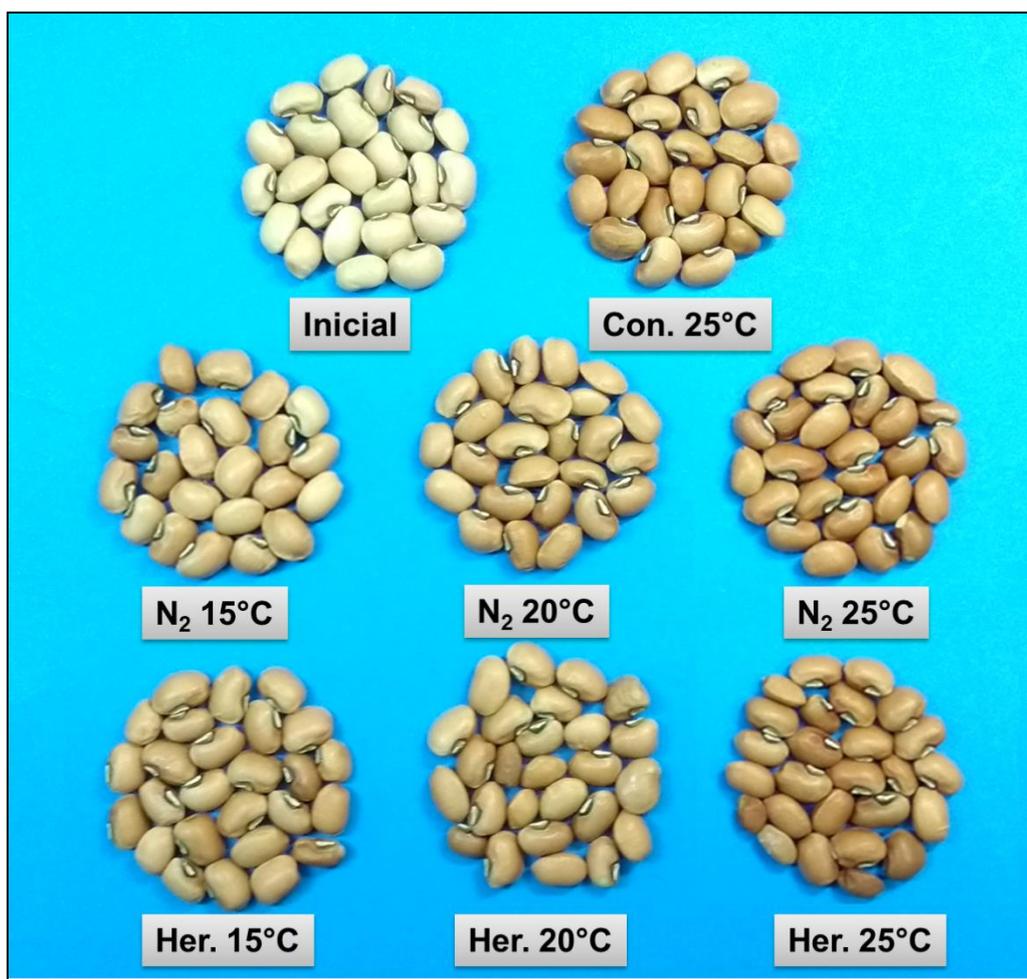


Figura 17. Fotografia dos grãos antes e após 8 meses de armazenamento.

A cor do tegumento dos grãos do feijão (figura 18) é a base primária sobre a qual o produtor e o armazenista fazem a seleção dos grãos e estipulam o valor de mercado. Grãos com coloração clara tendem a valer mais quando comparados com aqueles de coloração mais escura.

### 4.3.2 Compostos fenólicos livres na superfície dos grãos

O teor de compostos fenólicos do grão inteiro, dos diferentes tratamentos, está apresentado na figura 19. Os grãos obtidos antes do armazenamento apresentaram maior teor de compostos fenólicos solúveis em acetona 70% (62,3 mg/100g). As demais condições de armazenamento, a 15, 20 e 25°C, reduziram o teor de compostos fenólicos em 38%, 58% e 66%, respectivamente, quando comparado ao inicial.

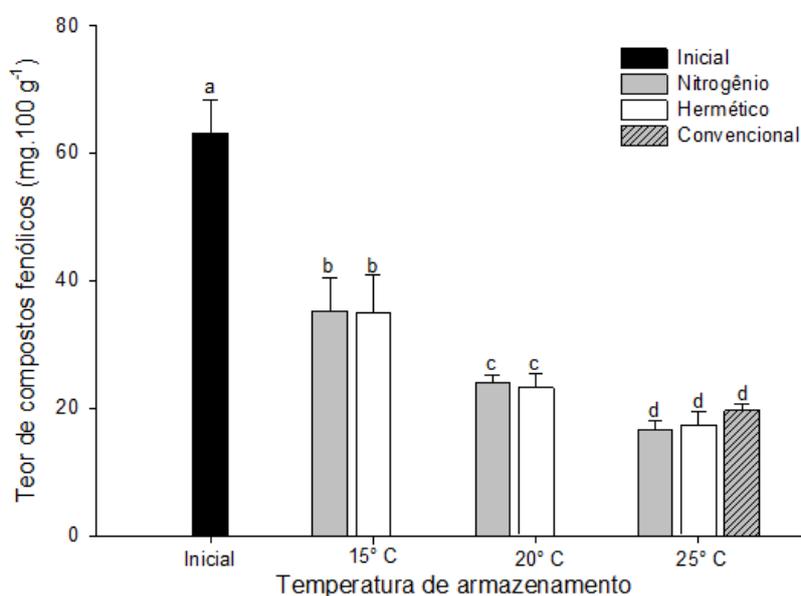


Figura 18. Teor de compostos fenólicos obtidos a partir do grão inteiro antes e após 8 meses de armazenamento em diferentes condições de atmosfera e temperatura. Letras diferentes indicam valores que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

A maior solubilidade dos compostos fenólicos antes do armazenamento se deve, provavelmente, ao curto espaço de tempo transcorrido entre a colheita e o armazenamento. Desta forma, não ocorrem reações de oxidação e complexação destes compostos.

Ao final dos 8 meses de armazenamento, o feijão caupi apresentou reduzida solubilidade de compostos fenólicos em todos os tratamentos. Segundo Nasar-Abbas et al. (2008), a solubilidade dos compostos fenólicos pode reduzir no armazenamento, principalmente em temperaturas elevadas. Isto ocorre porque os compostos fenólicos podem ligar-se a açúcares e proteínas, formando complexos insolúveis.

Apesar da semelhança nos valores de  $a^*$  entre os grãos armazenados a 15 e a 20°C (figura 17), a temperatura exerceu importante efeito na solubilidade dos compostos fenólicos, que respondem pela cor do tegumento (figura 18).

#### **4.3.3 Capacidade de absorção de água, tempo de cocção e dureza dos grãos armazenados**

O comportamento de absorção de água dos grãos obtidos antes e após 8 meses de armazenamento está apresentada na figura 20. O feijão caupi analisado antes do armazenamento obteve maior facilidade para absorver água. Nos primeiros 10min os grãos absorveram aproximadamente 80% do total de sua capacidade, enquanto que no mesmo tempo o feijão caupi armazenado a 15, 20 e 25°C absorveram aproximadamente 75%, 68% e 51%, respectivamente, independentemente da atmosfera de armazenamento. Como observado na solubilidade dos compostos fenólicos do tegumento (figura 18), houve maior efeito da temperatura do que da atmosfera de armazenamento nesta variável.

A lignificação da parede celular reduz a facilidade de absorção de água dos feijões (HINCKS, 1986; SARMENTO et al., 2016), bem como a capacidade de retenção de água. Isto se deve, provavelmente, à redução dos espaços intracelulares.

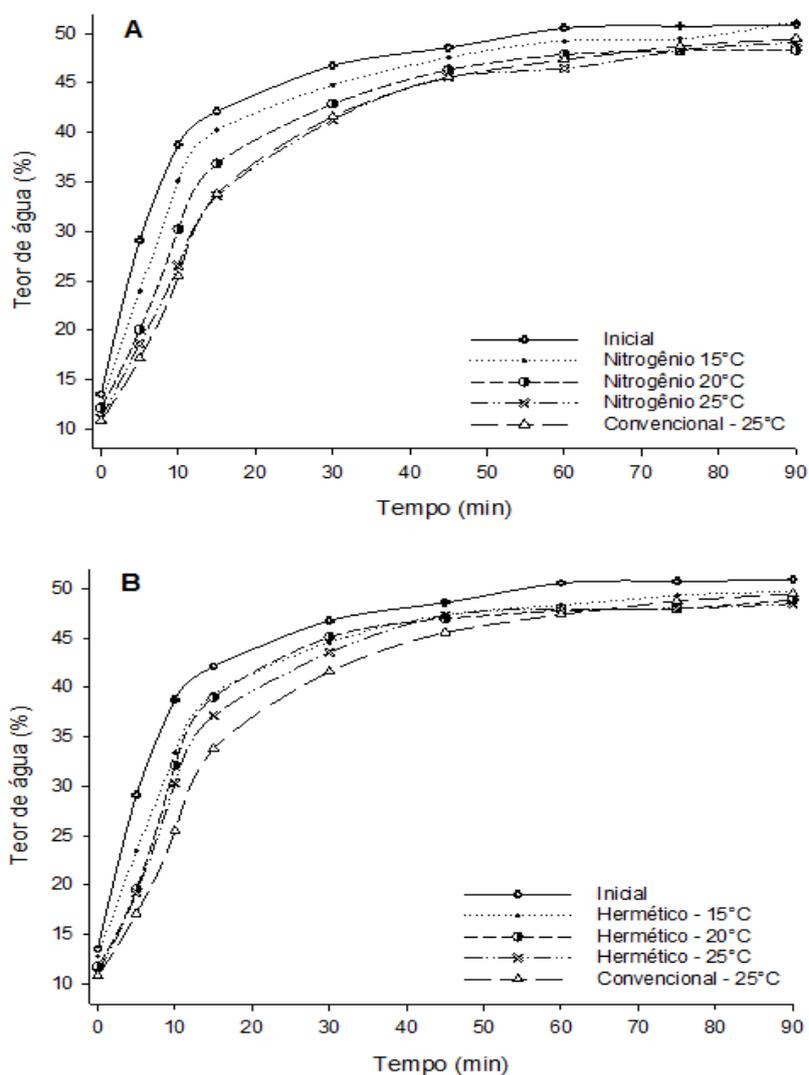


Figura 19. Comportamento de hidratação do feijão caupi obtido antes e após 8 meses de armazenamento em nitrogênio (A) e com restrição de oxigênio (B).

Na figura 21 está apresentado o tempo de cocção dos diferentes tratamentos. No início do armazenamento observa-se menor tempo de cocção (17,3min) e ao final de 8 meses de armazenamento, na temperatura de 25°C, independentemente da atmosfera, são observados os maiores tempos de cocção (aproximadamente 34min).

Os tratamentos mantidos nas temperaturas de 15 e 20°C mantiveram tempo de cocção semelhante (25min). A diferença observada na facilidade e na capacidade de hidratação a 15 e a 20°C (Figura 20), não propiciou diferenças significativas no tempo de cocção.

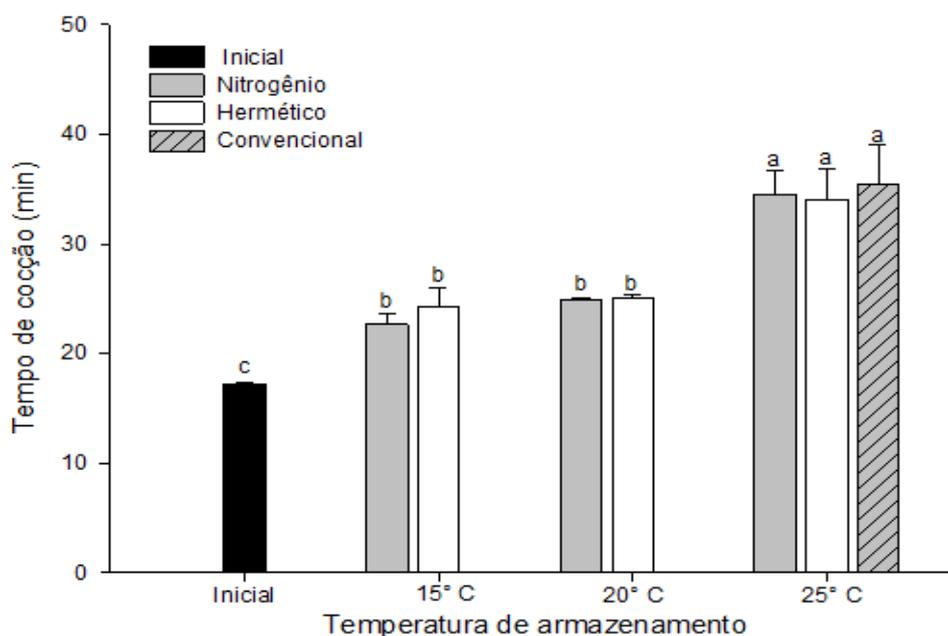


Figura 20. Tempo de cocção dos grãos obtidos antes e após 8 meses de armazenamento em diferentes condições de atmosfera e temperatura. Letras diferentes indicam valores que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Após a cocção, o feijão caupi foi submetido à análise de dureza, conforme pode ser observado na figura 22. Apesar da similaridade no tempo de cocção dos grãos armazenados a 15 e a 20°C, a avaliação texturométrica (figura 22) dos grãos cozidos apresentou diferença significativa na dureza. Isto se deve, provavelmente, ao maior teor de água absorvido e à maior retrogradação de amilose dos grãos armazenados a 20°C.

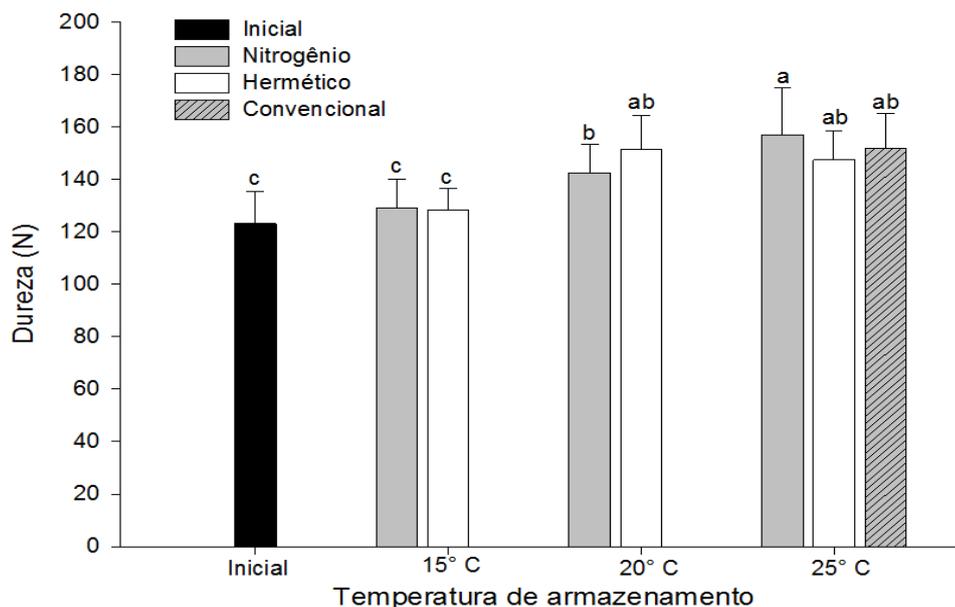


Figura 21. Dureza do feijão caupi submetidos ao processo de cocção, obtidos antes e após 8 meses de armazenamento em diferentes condições de atmosfera e temperatura. Letras diferentes indicam valores que diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

A redução na solubilidade dos compostos fenólicos está associada à lignificação da parede celular, fator responsável por alterações no comportamento de hidratação e de cocção do feijão caupi. Segundo Nasar-abbas et al. (2008), a lignificação da parede celular e a polimerização de constituintes fenólicos, predominantemente a partir do tegumento dos grãos, durante o armazenamento, é o principal responsável por aumentar a dificuldade na absorção de água e o tempo de cocção de fava (*Vicia faba* L.).

#### 4.4 Conclusões

O armazenamento de feijão caupi da variedade Bico de ouro em atmosfera modificada com nitrogênio e em temperaturas de até 20°C propiciou manutenção dos atributos de cor e tempo de cocção. No entanto, nessa mesma atmosfera e temperatura, a solubilidade dos compostos fenólicos e a capacidade de absorção de água dos feijão caupi reduziram e a dureza aumentou.

## 5 Considerações finais

Herbicidas não registrados para dessecação de feijão caupi, mas que são utilizados por alguns produtores no Brasil, foram testados neste trabalho. Os efeitos destes herbicidas sobre a qualidade do feijão caupi foram determinados, no que se refere à qualidade tecnológica dos grãos e à presença de metabólitos especializados.

Foi comprovado que sim, há interferência dos produtos dessecantes na qualidade dos grãos de feijão caupi recém-colhidos e, também, na suscetibilidade dos grãos da variedade Bico de Ouro ao escurecimento do tegumento e ao aparecimento do defeito HTC.

É fundamental que os produtores sigam as recomendações agronômicas para aplicação de agrotóxicos. Na ausência de opções para a cultura do feijão caupi, comprova-se urgência de estudos e de desenvolvimento de protocolos para regulamentar produtos e manejos de aplicação de dessecantes, tendo em vista que o uso de produtos como o glifosato e o paraquate, como feito por alguns produtores, representa riscos à saúde dos consumidores, pelos níveis residuais observados neste trabalho.

Grãos de feijão caupi da variedade Bico de Ouro apresentam comportamento semelhante de alterações na qualidade tecnológica durante o armazenamento em atmosfera modificada por nitrogênio comparados ao feijão carioca (*Phaseolus vulgaris*). O armazenamento com nitrogênio a 20°C apresenta efeito semelhante no controle do escurecimento e na manutenção do tempo de cocção, quando comparado ao armazenamento com nitrogênio a 15°C, cujo gasto energético é maior. No entanto, há diferença na qualidade dos grãos cozidos ao comparar-se ambas as temperaturas, sendo mais vantajoso o armazenamento na menor temperatura.

### Referências bibliográficas

- AACC, 1995. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. **American Association of Cereal Chemists**, Inc, St. Paul, MN, USA.
- ADOM, K. K.; LIU, R. H. Antioxidant activity of grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6182–6187, 2002.
- AGUILERA, J.M.; RIVERA, R.; Hard-to-cook defect in black beans: hardening rates, water imbibition and multiple mechanism hypothesis. **Food Research International**. v. 25, p. 101-108, 1992.
- AKSAKAL, O. Assessment of paraquat genotoxicity on barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings using molecular and biochemical parameters. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 2281–2287, 2003.
- ALVES, G. H.; FERREIRA, C. D.; VIVIAN, P. G.; MONKS, J. L. F.; ELIAS, M. C., VANIER, N. L.; DE OLIVEIRA, M. The revisited levels of free and bound phenolics in rice: Effects of the extraction procedure. **Food Chemistry**, v. 208, p.116–123, 2016.
- ANANIEVA, E.A.; ALEXIEVA, V.S.; POPOVA, L.P. Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, p. 685–693, 2002.
- ANASTASSIADES, M.; KOLBERG, D. I.; MACK, D., SIGALOVA, I.; ROUX, D.; FUGEL, D. Quick method for the analysis of residues of numerous highly polar pesticides in foods of plant origin involving simultaneous extraction with methanol and LC-MS/MS determination. 2013, Version 4.
- ASAE - American Society of Agricultural Engineers. Moisture measurement unground grain and seeds. In: Standards, 2000.St. Joseph: ASAE, p. 563, 2000.
- ÁVILA, M. B.; DE LÚCIO, J. A. G.; MENDOZA, N. V.; GONZÁLEZ, C. V.; ARCINIEGA, M. D. L.; VARGAS, G. A. Geranium Species as Antioxidants. In.: **Oxidative stress and chronic degenerative diseases** - A Role for Antioxidants. (J. A. Morales-González, Ed.). Intech: Rijeka, Croatia. p. 87–112, 2013.

AWADALLA, E. A. Efficacy of vitamin C against liver and kidney damage induced by paraquat toxicity. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, p. 431–434, 2012.

AWIKA, J. M.; DUODU, K. G. Bioactive polyphenols and peptides in cowpea (*Vigna unguiculata*) and their health promoting properties: A review. **Journal of Functional Foods**, 2016.

BAXTER, C. J.; REDESTIG, H.; SCHAUER, N.; REPSILBER, D.; PATIL, K. R.; NIELSEN, J.; SWEETLOVE, L. J. The metabolic response of heterotrophic *Arabidopsis* cells to oxidative stress. **Plant Physiology**, v. 143, p. 312–325, 2007.

BENINGER, C. W.; HOSFIELD, G. L. Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7879–7883, 2003.

BRACKMANN, A.; NEUWALD, D. A.; RIBEIRO, N. D.; MEDEIROS, E. A. Condição de armazenamento de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do grupo carioca FT Bonito. **Revista Brasileira de Armazenamento**. v. 27, p. 16-20, 2002.

BRAGANTINI, C. Alguns aspectos do armazenamento de sementes e grãos de feijão. Documento Técnico. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, v. 28 p. 2005.

CAI, R.; HETTIARACHCHY, N. S.; JALALUDDIN, M. High-Performance Liquid Chromatography determination of phenolic constituents in 17 varieties of cowpeas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** p. 1623–1627, 2003.

Cai, W.; Ji, Y.; Song, X.; Guo, H.; Han, L.; Zhang, F.; Liu, X.; Zhang, H.; Xu, B. Z. M.; Effects of glyphosate exposure on sperm concentration in rodents: a Systematic review and meta-analysis. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 2017.

CARTEA, M. E.; FRANCISCO, M.; SOENGAS, P.; VELASCO, P. Phenolic compounds in *Brassica vegetables*. **Molecules**, v. 16, p. 251–280, 2011.

CHANDRASEKARA, A.; SHAHIDI, F. Bioactivities and antiradical properties of millet grains and hulls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.59, n.17, p.9563–9571, 2011.

CHANG, Q.; WONG, Y. S. Identification of Flavonoids in Hakmeitau Beans (*Vigna sinensis*) by High-Performance Liquid Chromatography – Electropray Mass Spectrometry ( LC-ESI / MS ). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6694–6699, 2004.

CHEN, Y.W.; YANG, Y.T.; HUNG, D.Z.; SU, C.C.; CHEN, K.L. Paraquat induces lung alveolar epithelial cell apoptosis via Nrf-2-regulated mitochondrial dysfunction and ER stress. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 1547–1558, 2012.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2016/17**, v. 4, 2017.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Perspectiva Agropecuária**, Maio, 2015.

DE ABREU, I. N.; MAZZAFERA, P. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 241–248, 2005.

DEMITO, A.; AFONSO, A. D. L. Qualidade das sementes de soja resfriadas artificialmente. **Engenharia na Agricultura**. v.17, p.7-14, 2009.

DÍAZ, A. M.; CALDAS, G. V.; BLAIR, M. W. Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. **Food Research International**, v. 43, p. 595–601, 2010.

DILIS, V.; TRICHOPOULOU, A. Nutritional and health properties of pulses. **Mediterranean journal of nutrition and metabolism**, v. 1, p. 149-157, 2009.

DINIS-OLIVEIRA, R. J.; REMIÃO, F.; CARMO, H., DUARTE, J. A.; NAVARRO, A. S.; BASTOS, M. L.; CARVALHO,. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. **NeuroToxicology**, v. 27, p. 1110–1122, 2006.

DURANTI, M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. **Fitoterapia**, v. 77, p. 67–82, 2006.

EGLEY, H.; PAUL, JR.; DUKE O.; VAUGHN, K. Peroxidase involvement in lignification in water-impermeable seed coats of weedy leguminous and malvaceous species. **Plant, Cell and Environment**, v. 8, p. 253-260, 1985.

European Commission. Commission Regulation, (EU) No. 520/2011, amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for benalaxyl, boscalid, buprofezin, carbofuran, carbosulfan, cypermethrin, fluopicolide, hexythiazox, indoxacarb, metaflumizone, methoxyfenozide, paraquat, prochloraz, spiroadiclofen, prothioconazole and zoxamide in or on certain products, 2011.

FAILLA, M.L.; CHITCHUMRONCHOKCHAI, C. *In vitro* Models as Tools for screening the relative bioavailabilities of provitamin a carotenoids in foods. Washington, DC: **International Food Policy Research Institute**. 2005

FAO. Food; Agriculture Organization of the United Nations. Statistical database. 2017. <http://faostat.fao.org>.

FAO/WHO. Codex Alimentarius Commission: **Procedure Manual**, 39th session. Ed. Rome, Italy. 2016.

FILHO, F. R. F.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. R.; SILVA, K. E.; NOGUEIRA, M. R.; RODRIGUES, E. V. Feijão Caupi no Brasil: Produção, melhoramento genético, avanços e desafios, edição 1. **Publicado: Teresina, Brazil – BR**, 2011; 84 p.

FUERST E.P.; VAUGHN K.C. Mechanisms of paraquat resistance. **Weed Technology**, v. 4, p. 150–156, 1990.

FUJII, T.; YOKOYAMA, E.; INOUE, K.; SAKURAI, H. The sites of electron donation of Photosystem I to methyl viologen. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1015, p. 41–48, 1990.

GIANNINI, F., Fish toxicity of commercial herbicides formulated with glyphosate. **Journal of Environmental; Analytical Toxicology**. 4.

GIL-IZQUIERDO, A.; GIL, M. I.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. *In vitro* availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1035–1041, 2001.

GOLDMAN, S. M. Environmental toxins and Parkinson's disease. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 54, p. 141–164, 2014.

GOMES, M. P.; LE MANAC'H, S. G.; MACCARIO, S.; LABRECQUE, M.; LUCOTTE, M.; JUNEAU, P. Differential effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) on photosynthesis and chlorophyll metabolism in willow plants. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 130, p. 65–70, 2016.

GRANITO, M.; PAOLINI, M.; PÉREZ, S. Polyphenols and antioxidant capacity of *Phaseolus vulgaris* stored under extreme conditions and processed. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 994–999, 2008.

GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; ROMO-LOPEZ, I.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Phenolic composition and mammary cancer cell inhibition of extracts of whole cowpeas (*Vigna unguiculata* L.) and its anatomical parts. **Journal of Functional Foods**, v. 3, p. 290–297, 2011.

HA, T. J.; LEE, M. H.; PARK, C. H.; PAE, S. B.; SHIM, K. B.; KO, J. M.; SHIN, S. O.; BAEK, I. Y.; PARK, K. Y. Identification and characterization of anthocyanins in Yard-Long beans (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis* L.) by High-Performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization/mass spectrometry (HPLC-DAD-ESI/MS) analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2571–2576, 2010.

HACHIBAMBA, T.; DYKES, L.; AWIKA, J.; MINNAAR, A.; DUODU, K. G. Effect of simulated gastrointestinal digestion on phenolic composition and antioxidant capacity of cooked cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 638–649, 2013.

HAYAT, I.; AHMAD, A.; MASUD, T.; AHMED, A.; BASHIR, S. Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): an overview. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, v. 54, p. 580–592, 2014.

HINCKS, M. J.; STANLEY, D. W. Lignification: evidence for a role in hard-to-cook beans, **Food Biochemistry**, p. 41–58, 1986.

HINCKS, M.J.; SANLEY, D.W.; Lignification: Evidence for a role in hard to cook beans. **Journal Food Biochemistry**. v. 11, 1986.

HOHLBERG, A.I.; STANLEY, D.W. Hard-to-cook defect in black beans. protein and starch considerations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 35, p. 571-576, 1987.

HOU, L.; ZHANG, C.; WANG, K.; LIU, X.; WANG, H.; CHE, Y.; SUN, F.; ZHOU, X.; ZHAO, X.; WANG, Q. Paraquat and maneb co-exposure induces noradrenergic locus coeruleus neurodegeneration through NADPH oxidase-mediated microglial activation. **Toxicological**, v. 380, p. 1–10, 2017.

HUGHES, T.; HOOVER, R.; LIU, Q.; DONNER, E.; CHIBBAR, R.; JAISWAL, S. Composition, morphology, molecular structure, and physicochemical properties of starches from newly released chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars grown in Canada. **Food Research International**, v. 42, n. 5-6, p. 627–635, 2009

IQBAL, J.; AHSAN, M.; SALEEM, M.; ALI, A. Appraisal of gene action for indeterminate growth in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). **International Journal of Plant Sciences** , v. 6, p. 1-8, 2015.

KIELAK, E.; SEMPRUCH, C.; MIODUSZEWSKA, H.; KLOCEK, J.; LESZCZYŃSKI, B. Phytotoxicity of Roundup Ultra 360 SL in aquatic ecosystems: Biochemical evaluation with duckweed (*Lemna minor* L.) as a model plant. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, p. 237–243, 2011.

KOMIVES, T.; SCHRÖDER, P. On glyphosate. **European Journal of Sport Science**. V. 2, p. 1–8, 2016.

KREMER, R.J.; MEANS, N.E., Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms. **European Journal of Agronomy**. v. 31, p. 153–161, 2009.

KRUGER, J.; MINNIS-NDIMBA, R.; MTSHALI, C.; MINNAAR, A. Novel *in situ* evaluation of the role minerals play in the development of the hard-to-cook (HTC) defect of cowpeas and its effect on the *in vitro* mineral bioaccessibility. **Food Chemistry**, 2014.

LIU, K.; MCWATTERS, K.H.; PHILLIPS, R.D. Protein insolubilization and thermal destabilization during storage as related to hard-to-cook defect in cowpeas. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 40, p. 2483-2487, 1992.

LUTHRIA, D. L.; PASTOR-CORRALES, M. A. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties, v. 19, p. 205–211, 2006.

MANDALARI, G.; TOMAINO, A.; RICH, G. T.; CURTO, R.; ARCORACI, T.; MARTORANA, M.; WICKHAM, M. S. J. Polyphenol and nutrient release from skin of almonds during simulated human digestion. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1083–1088, 2010.

MARIA, C.; COELHO, M.; BELLATO, M.; CESAR, J.; SANTOS, P.; MOISES, E.; ORTEGA, M.; TSAI, S. M. Effect of phytate and storage conditions on the development of the “*hard-to-cook*”. **Journal of science of food and agriculture**, v. 1243, p. 1237–1243, 2007.

MARLES, M. A. S.; VANDENBERG, A.; BETT, K. E. Polyphenol oxidase activity and differential accumulation of polyphenolics in seed coats of pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.) characterize postharvest color changes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7049–7056, 2008.

MAROLI, A.; NANDULA, V.; DUKE, S.; THARAYIL, N. Stable isotope resolved metabolomics reveals the role of anabolic and catabolic processes in glyphosate-induced amino acid accumulation in *Amaranthus palmeri* Biotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 7040–7048, 2016.

MARZABADI, R.; JOSE, L.; GRAYS, J.; PANSEGRAU, P. D.; SIKORSKI, J. A. **Biaorganic; Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 1435–1440, 1992.

MAURER, G.A.; OZEN, B.F.; MAURER, L.J.; NIELSEN, S.S.; Analysis of hard-to-cook red and black common beans using fourier transform infrared spectroscopy. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 52, p. 1470-1477, 2004.

MEDOUA, G.N.; MBOFUNG, C.M.F. Hard-to-cook defect in trifoliolate yam *Dioscorea dumetorum* tubers after harvest. **Food Research International**, v. 39, p. 513–518, 2006.

Métodos de Análise Oficiais, AOAC Método oficial 2007.01. Resíduos de pesticidas em alimentos por extração de acetonitrila e partição com sulfato de magnésio, AOAC International, 2007.

MICHAEL, J.; MILLER, S.; AUDERSON, S.; BRACCOLIJO, G.; CKARY, J.; GRUYS, Y.; HAN, L.; PAUL D.; PANSEGRAU, E.; REAM, R.; DOUGLAS S.; JAMES A. The importance of the 3-phosphate group for ligand binding at the shikimate phosphate site; the identification of 3-malonate ethers as novel 3-phosphate mimics. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**. v. 7, p. 1435–1440, 1993.

MOLINA, M.R.; EATEN, M.A.; GOMEZ-BRENES, R.A.; KING, K.W.; BRESSANI, R.; Heat treatment: A process to control the development of the hard to cook phenomena in black beans (*Phaseolus vulgaris*). **Journal Food Science**. v. 41, 1983.

NANDULA, V.K., Glyphosate Resistance in Crops and Weeds, Wiley. ed. 2010.

NASAR-ABBAS, S. M.; PLUMMER, J. A.; SIDDIQUE, K. H. M.; WHITE, P.; HARRIS, D.; DODS, K. Cooking quality of faba bean after storage at high temperature and the role of lignins and other phenolics in bean hardening. **LWT- Food Science and Technology**, v. 41, p. 1260–1267, 2008.

NASAR-ABBAS, S.M.; PLUMMER, J.A.; SIDDIQUE, K.H.M.; WHITE, P.F.; HARRIS, D.; DODS, K. Nitrogen retards and oxygen accelerates colour darkening in faba bean (*Vicia faba* L.) during storage. **Postharvt Biology and Technology**, v. 47, p. 113–118, 2008a.

NASAR-ABBAS, S.M.; SIDDIQUE, K.H.M.; PLUMMER, J.A.; WHITE, P.F.; DODS, K.; D'ANTUONO, M. Faba bean (*Vicia faba* L.) seeds darken rapidly and phenolic

content falls when stored at higher temperature, moisture and light intensity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, p. 1703-1711, 2009.

NDERITU, A. M.; DYKES, L.; AWIKA, J. M.; MINNAAR, A.; DUODU, K. G. Phenolic composition and inhibitory effect against oxidative DNA damage of cooked cowpeas as affected by simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1763–1771, 2013.

NEDUMARAN, S.; ABINAYA, P.; SHRAAVYA, B.; RAO, P. P.; BANTILAN, S. Grain legumes production, consumption and trade trends in developing countries- an assessment and synthesis. Socioeconomics Discussion Paper Series nr 3, **International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT)**, 2013.

NGALAMU, T.; CITY, J.; RESOURCES, N.; STUDIES, E. Cowpea production handbook. **Cowpea production handbook**, v. 1, p. 45, 2014.

NJOROGE, D. M.; KINYANJUI, P. K.; CHIGWEDERE, C. M.; CHRISTIAENS, S.; MAKOKHA, A. O.; SILA, D. N.; HENDRICKX, M. E. Mechanistic insight into common bean pectic polysaccharide changes during storage, soaking and thermal treatment in relation to the hard-to-cook defect. **Food Research International**, v. 81, p. 39–49, 2016.

NJOROGE, D. M.; KINYANJUI, P. K.; CHRISTIAENS, S.; SHPIGELMAN, A.; MAKOKHA, A. O.; SILA, D. N.; HENDRICKX, M. E. Effect of storage conditions on pectic polysaccharides in common beans (*Phaseolus vulgaris*) in relation to the hard-to-cook defect. **Food Research International - Article in Press**, 2014.

OJWANG, L. O.; DYKES, L.; AWIKA, J. M. Ultra-performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry profiling of anthocyanins and flavonols in cowpea (*Vigna unguiculata*) of varying genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 3735–3744, 2012.

OJWANG, L. O.; YANG, L.; DYKES, L.; AWIKA, J. Proanthocyanidin profile of cowpea (*Vigna unguiculata*) reveals catechin-O-glucoside as the dominant compound. **Food Chemistry**, v. 139, p. 35–43, 2013.

PAIVA, F. F.; VANIER, N. L.; BERRIOS, J. D. J.; PAN, J.; VILLANOVA, F. A.; TAKEOKA, G.; ELIAS, M. C.; VANIER, N. L. Physicochemical and nutritional properties of pigmented rice subjected to different degrees of milling. **Journal of Food Composition**, v. 35, p. 10–17, 2014.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, p. 270–278, 2009.

PHILLIPS, R. D.; MCWATTERS, K. H.; CHINNAN, M. S.; HUNG, Y. C.; BEUCHAT, L. R.; SEFA-DEDEH, S. Utilization of cowpeas for human food. **Field Crops Research**, v. 82, p. 193–213, 2003.

PINTO, M. S. T.; SIQUEIRA, F. P.; OLIVEIRA, A. E. A.; FERNANDES, K. V. S. A wounding-induced PPO from cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2297–2302, 2008.

PIRHAYATI, M.; SOLTANIZADEH, N.; KADIVAR, M. Chemical and microstructural evaluation of 'hard-to-cook' in legumes (pinto bean and small-type lentil). **International Journal Food Science Technoligical**, v. 46, p. 1884–1890, 2011.

QIU, Y.; LIU, Q.; BETA, T. Antioxidant properties of commercial wild rice and analysis of soluble and insoluble phenolic acids. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 140–147, 2010.

READE, J. P. H.; COBB, A. H. Herbicides Modes of Action and Metabolism. In **Weed Management Handbook**, edition 9. Publisher: Cornwall, Great Britain – GBR, p. 134-170, 2002.

REDDY, K. N.; DUKE, S. O. Soybean Mineral Composition and Glyphosate Use. In *Processing and Impact on Active Components in Food*, 1st ed.; **Preedy**, V., Ed.; Elsevier: San Diego, CA, p 369– 376, 2014.

REED, C.; DOYUNGAN, S.; IOERGER, B.; GETCHELL, A. Response of storage molds to different initial moisture contents of maize (corn) stored at 25°C, and effect on respiration rate and nutrient composition. **Journal of Stored Products Research**. v. 43, p. 443-458, 2007.

REVILLA, I.; VIVAR-QUINTANA, A. M. Effect of canning process on texture of Faba beans (*Vicia faba*). **Food Chemistry**, v. 106, n. 1, p. 310–314, 2008.

REYES-MORENO, C.; OKAMURA-ESPARZA, J.; ARMIENTA-RODELO, E.; GÓMEZ-GARZA, R.M.; MILÁN-CARRILLO, J. Hard-to-cook phenomenon in chickpeas (*Cicer arietinum* L): Effect of accelerated storage on quality. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 55, p. 229–241, 2000.

RIGUEIRA, R. J. A.; LACERDA FILHO, A. F.; VOLK, M. B. S.; Avaliação da qualidade do feijão armazenado em ambiente refrigerado; **Alimentos e Nutrição**. v. 20, n. 4, p. 649-655, 2009.

SARMENTO, T.; AGUILERA, Y.; BENITEZ, V.; Impact of cooking and germination on phenolic composition and dietary fibre fractions in dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and lentils (*Lens culinaris* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 72–78, 2016.

SASKA, P.; SKUHROVEC, J.; LUKÁŠ, J.; CHI, H.; TUAN, S.J.; HONĚK, A. Treatment by glyphosate-based herbicide alters life history parameters of the rosegrain aphid *Metopolophium dirhodum*. **Science Report**, v. 6, 2016.

SHIGA, T. Changes in the cell wall polysaccharides during storage and hardening of beans. **Food Chemistry**, v. 84, n. 1, p. 53–64, 2004.

SHIGA, T.M.; CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. The effect of storage on the solubilization pattern of bean hull non-starch polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, 83, 362–367, 2011.

SHIGA, T.M.; LAJOLO, F.M.; Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) composition and structure. **Carbohydrates Polymeres**, v. 63, p. 1-12, 2006.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Jr., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

SIQUEIRA, B. S.; BASSINELLO, P. Z.; MALGARESI, G.; PEREIRA, W. J. Analyses of technological and biochemical parameters related to the HTC phenomenon in carioca bean genotypes by the use of PCA. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 939–945, 2016.

SOLTANI, N.; BLACKSHAW, R. E.; GULDEN, R. H.; GILLARD, C. L.; SHROPSHIRE, C.; SIKKEMA, P. H. Desiccation in dry edible beans with various herbicides. **Canadian Journal Plant Science**, v. 93, p. 871–877, 2013.

SRISUMA, N.; HAMMERSCHMDT, R.; UEBERSAX, M.A.; RUENGSAKULRACH, S.; BENNINK, M.R.; HOSFIELD, G.L.; Storage induced changes of phenolic acids and the development of hard-to-cook in dry beans (*Phaseolus vulgaris*, var. Seafarer). **Journal Food Science**, v. 54, 1989.

STANLEY, D.W.; AGUILERA, J.M.; A review of textural defects in cooked reconstituted legumes: the influence of structure and composition. **Journal Food Biochemistry**. v. 9, p. 277-323, 1985.

STEINRÜCKEN, H. C.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 94, n. 4, p. 1207–1212, 1980.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p

THARANATHAN, R. N.; MAHADEVAMMA, S. Grain legumes - A boon to human nutrition. **Trends in Food Science and Technology**, v. 14, n. 12, p. 507–518, 2003.

UNVER, T.; BAKAR, M.; SHEARMAN, R. C.; BUDAK, H. Genome-wide profiling and analysis of *Festuca arundinacea* miRNAs and transcriptomes in response to foliar glyphosate application. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 283, p. 397–413, 2010.

VAINIO, A.; NIVA, M.; JALLINOJA, P.; LATVALA, T. From beef to beans: Eating motives and the replacement of animal proteins with plant proteins among Finnish consumers. **Appetite**, 2015.

VANIER, N. L.; RUPOLLO, G.; PARAGINSKI, R. T.; OLIVEIRA, M.; ELIAS, M. C. Effects of nitrogen-modified atmosphere storage on physical , chemical and technological properties of Carioca bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Current Agricultural Science and Technology**, v. 20, p. 10–20, 2014.

WANG, N.; DAUN, J. K. Determination of cooking times of pulses using an automated Mattson cooker apparatus. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 85, 1631-1635, 2005.

WELLS, B.H.; A.P. APPLEBY. Lactofen Increases Glyphosate-Stimulated Shikimate Production in Little Mallow (*Malva parviflora*). **Weed Science**, v. 40, p. 171–173, 1992.

WILLIAMS, G.M.; BERRY, C.; BURNS, M.; DE CAMARGO, J.L.; GREIM, H.; Glyphosate rodent carcinogenicity bioassay expert panel review. **Critical reviews in toxicology**, v. 46, p. 44-55, 2016.

WONG, D. W. S. Feruloyl esterase: A key enzyme in biomass degradation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 133, p. 87–112, 2006.

XU, B.; CHANG, S. K. C. Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4754-4764, 2009.

YAMADA, T. Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas, n. 19, p. 1–32, 2007.

ZABALZA, A.; ORCARAY, L.; FERNÁNDEZ-ESCALADA, M.; ZULET-GONZÁLEZ, A.; ROYUELA, M. The pattern of shikimate pathway and phenylpropanoids after inhibition by glyphosate or quinate feeding in pea roots. **Pesticide Biochemistry Physiology**. 2016, *In Press*.

ZHANG, L.; WAN, J.; YANG, G. A DFT-based QSARs study of protoporphyrinogen oxidase inhibitors: Phenyl triazolinones. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 6183–6191, 2004.

ZHANG, M. W.; ZHANG, R. F.; ZHANG, F. X.; LIU, R. H. Phenolic profiles and antioxidant activity of black rice bran of different commercially available varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 7580–7587, 2010.

ZHU, J.; PATZOLDT, W.; SHEALY, R.; VODKIN, L.; CLOUGH, S.; TRANEL, P. Transcriptome response to glyphosate in sensitive and resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 6355–6363, 2008.

ZUITER, A. S. Proanthocyanidin: Chemistry and biology: from phenolic compounds to proanthocyanidins. In **Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**,; Reedijk, J., Eds.; Publisher: Waltham, United States – USA, p. 1-29, 2014.