

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Estudo analítico da presença de Astragalina em cultivares  
de feijão *Phaseolus vulgaris* L.

CRISTIANO ANTONIO DALPIZOLO

PORTO ALEGRE, MAIO DE 2011.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Estudo analítico da presença de Astragalina em cultivares  
de feijão *Phaseolus vulgaris* L.

Dissertação apresentada por **Cristiano  
Antonio Dalpizolo** para obtenção do  
TÍTULO DE MESTRE em Ciências  
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. José Ângelo Silveira Zuanazzi

Porto Alegre, maio de 2011.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, me nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30 de maio de 2011, pela Banca Examinadora constituída por:

Dr. Gilberto Peripoli Bevilacqua  
EMPRAPA Clima Temperado

Prof Dr. Pedro Fröhlich  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Roger Remy Dresch.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

#### CIP - Catalogação na Publicação

Dalpizolo, Cristiano Antonio  
Estudo Analítico da Presença de Astragalina em  
Cultivares de Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) /  
Cristiano Antonio Dalpizolo. -- 2011.  
101 f.

Orientador: Jose Angelo Silveira Zuanazzi.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2011.

1. *Phaseolus vulgaris* L.. 2. Astragalina. 3.  
Flavonóides. 4. Leguminosae. I. Zuanazzi, Jose Angelo  
Silveira, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação do Prof. Dr. José Ângelo Silveira Zuanazzi no laboratório de Farmacognosia e na Central Analítica da Faculdade de Farmácia da UFRGS. A pesquisa foi financiada pelo CNPq e CAPES.



*“Perder tempo em aprender coisas que não interessam, priva-nos de descobrir coisas interessantes”*

**Carlos Drummond de Andrade**





## **AGRADECIMENTOS**

- Em especial ao Prof. Dr. José Ângelo Silveira Zuanazzi, por acreditar em meu trabalho, pela orientação, pelos grandes ensinamentos e companheirismo.
- À Marina Scopel pela paciência e pelos “puxões de orelha” nos momentos difíceis. Obrigado por muitas vezes mostrar o caminho correto e mais fácil nas minhas pesquisas.
- À Ana Lucia Aboy pelo carinho, paciência e pelos seus ensinamentos nas análises cromatográficas.
- À Maribeth pela valiosa colaboração nas análises no massas.
- Ao Douglas Rambo e Leandro Francescato que se tornaram meus irmãos por opção, pelos nossos churrascos, viagens, risadas e inúmeros momentos de alegria que dividimos durante esse tempo. Estarão sempre em meu coração e com certeza não é por aqui que acaba essa nossa parceria.
- Aos demais colegas Eduardo, Roger, Tiago, Júlia, Rafaela, Cláudia, Grazielle, Juliana, Renata, que, não menos importantes que os outros, fizeram desse período um momento inesquecível de minha vida, que com certeza guardarei as melhores lembranças de cada um de vocês.
- À Leticia Pagliosa, pelo carinho, amizade e por ter me incentivado a fazer a seleção do mestrado.

- À Melissa Schwanz, que de forma inesperada apareceu em minha vida, obrigado pelo carinho, paciência, pelo exemplo de força de vontade e pelo grande amor que despertou em mim.
- Aos meus familiares em especial os meus pais Remi e Marlene e a minha segunda mãe, Noeli pelo incentivo, amor e por acreditarem na minha educação.
- À minha querida e estimada vó Esterina (*in memorian*) pelo exemplo de fé e força de vontade de viver. Dedico a ela este trabalho.
- Aos meus afilhados Matheus Zanandréa e Roberta Pierozan por me proporcionarem momentos únicos de alegria.
- Aos grandes e verdadeiros amigos, Fabrício Lucion, Andre Donida, Rodrigo Pavan, Thiago Scandolara, Daniel Picolli, Vanessa Donida, Thiago Michalczuk e Cassio Henke, pelos churrascos, jogos do Grêmio e pelo rock and roll.
- À música e ao cinema, grandes combustíveis do meu dia a dia.
- À Deus por ter me dado forças e sabedoria para realizar esse trabalho.

## RESUMO

As plantas pertencentes à família das leguminosas apresentam um grande interesse econômico, sendo que o Brasil é um país com vasta utilização de plantas desta família. Neste contexto, destaca-se a leguminosa *Phaseolus vulgaris* L. popularmente conhecida como feijão, que contém uma boa fonte de constituintes bioativos. Espécie nativa da América Central e dos Andes peruanos possui grande importância econômica para o Brasil. Em sua composição química podemos encontrar os flavonóides. Inúmeros artigos científicos descrevem as atividades dos flavonóides como antioxidantes, antimutagêncio, anticarcinogênico e na captação de nitrogênio durante o desenvolvimento da planta. Sendo esta leguminosa um dos alimentos mais consumidos no mundo e de larga importância econômica, o presente trabalho visou avaliar o perfil cromatográfico do extrato metanólico de 47 cultivares de feijão através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e também a validação do seu método. O material vegetal, sementes, teve seu teor de umidade estabelecido pelo método gravimétrico. Através do perfil cromatográfico das sementes dos cultivares de feijão, foi possível identificar a presença de flavonóides como a astragalina, um heterosídeo do canferol. O método foi devidamente validado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de acordo com os métodos preconizados na literatura. Os cultivares TB 0224, TB0226, TB 0309, Rosinha Precoce e Amarelo Iolanda, foram os que apresentaram teor maior de astragalina, demonstrando que os feijões de cor possuem maior composição de deste composto.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris* L., Compostos Fenólicos, Flavonóides, Astragalina.



## ABSTRACT

*“Analytical study the precence with astragalin in clutivars of beans (Phaseolus vulgaris L.)”.*

Plants belonging to the legume family have a big economic interest, being Brazil is a country with extensive use of plants in this family. In this context, we highlight the legume *Phaseolus vulgaris* L. popularly known as beans, which are a good source of bioactive compounds. This species is native of southern Brazil and the main food consumed by the population. In its chemical composition can meet the flavonoids. Numerous scientific articles describing the activities of flavonoids as antioxidants, antimutagênic, anticarcinogenic and nitrogen uptake during plant development. Since this is a legume consumed more food in the world and of great economic importance, this study sought to evaluate the chromatographic profile of the methanol extract of 47 cultivars of beans through the technique of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and also the validation of their method. The plant material, seeds, water content was established by gravimetric method. Through the chromatographic profile of the seeds of bean cultivars, it was possible to identify the presence of flavonoids and astragalin, a kaempferol heteroside. The method was validated for High Performance Liquid Chromatography (HPLC) according to the methods suggested in the literature. The cultivars with colored TB 0224, TB0226, TB 0309, Rosinha Precoce and Amarelo Iolanda, were those with a higher content of astragalin, demonstrating that colored beans have a higher composition of astragalin.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris* L. Phenolic Compounds, Flavonoids, Astragalin.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1** - Sementes de diferentes cultivares de *Phaseolus vulagris* L. No canto superior esquerdo o cultivar Guabijú Brilhante, canto superior direito TB 0224, no centro Iraí, canto inferior esquerdo Roxo Redondo e no canto inferior direito o cultivar TB 0310..... 15
- Figura 3.2** - Estruturas dos flavonóides (A) e antocianidinas (B). ..... 16
- Figura 3.3** - Núcleo fundamental dos flavonóides. .... 17
- Figura 3.4** - Ácidos trans-hidroxinâmicos. .... 18
- Figura 4.1** - Cromatograma UPLC-PDA do cultivar amarelo iolanda . No detalhe espectro de ultravioleta (200-400nm) da substância com tempo de retenção 14,24 minutos. Fase móvel: (A) água:ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), (B): acetonitrila: ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), fluxo de 0,2 ml/min, coluna Waters Acquity C<sub>18</sub>, (2,1 x 5,0 mm, 1,7 µm)..... 37
- Figura 4.2** - Cromatograma UPLC-MS do cultivar amarelo iolanda. No detalhe espectro de massas da substância com tempo de retenção 14,24 minutos. Fase móvel: (A) água:ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), (B): acetonitrila: ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), fluxo de 0,2 ml/min, coluna Waters Acquity C<sub>18</sub>, (2,1 x 5,0 mm, 1,7 µm)..... 38
- Figura 4.3** - Espectro de massas da Astragalina com tempo de retenção 14,24 minutos, obtido por sistema de espectrometria de massas – ionização por spray de elétrons e principais fragmentações. .... 39
- Figura 4.4** - Perfil cromatográfico da astragalina observado em 350 nm e espectro de ultravioleta acumulado de 210 a 400 nm. Fase móvel: (A) água:ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), (B): acetonitrila: ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), fluxo de 0,8 ml/min, coluna Phenomenex Synergi Fusion C<sub>18</sub>, (150 x 4,6 mm, 4µm). ..... 40
- Figura 4.5** - Cromatogramas da solução metanólica do cultivar TB0224 obtido por CLAE, observado em 262 nm e 350nm. . Fase móvel: (A) água:ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), (B): acetonitrila: ácido

- fórmico (99,9:0,1%, v/v), fluxo de 0,8 ml/min, coluna Phenomenex Synergi Fusion C18, (150 x 4,6 mm, 4 $\mu$ m). ..... 41
- Figura 4.6** - Cromatograma da solução metanólica do cultivar TB 0224 obtido por CLAE. No detalhe os espectros de ultravioleta acumulado de 210 a 400 nm. Fase móvel: (A) água:ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), (B): acetonitrila: ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), fluxo de 0,8 ml/min, coluna Phenomenex Synergi Fusion C<sub>18</sub>, (150 x 4,6 mm, 4 $\mu$ m). ..... 42
- Figura 4.7** - Sobreposição dos cromatogramas da solução metanólica do cultivar TB 0224 obtido por CLAE e solução metanólica de astragalina. . Fase móvel: (A) água:ácido fórmico (100:0,1%, v/v), (B): acetonitrila: ácido fórmico (100:0,1%, v/v), fluxo de 0,8 ml/min, coluna Phenomenex Synergi Fusion C<sub>18</sub>, (150 x 4,6 mm, 4 $\mu$ m). ..... 42
- Figura 4.8** - Co-injeção da substância de referência astragalina com a solução metanólica do cultivar TB 0224. Fase móvel: (A) água:ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), (B): acetonitrila: ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), fluxo de 0,8 ml/min, coluna Phenomenex Synergi Fusion C<sub>18</sub>, (150 x 4,6 mm, 4 $\mu$ m). ..... 43
- Figura 4.9** - Parâmetro especificidade referente à substância astragalina presente na solução metanólica do cultivar TB 0224, obtido por varredura de 210 a 400 nm, em detector de arranjo de fotodiodos. Ampliação da região do pico. . Fase móvel: (A) água:ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), (B): acetonitrila: ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), fluxo de 0,8 ml/min, coluna Phenomenex Synergi Fusion C<sub>18</sub>, (150 x 4,6 mm, 4 $\mu$ m). ..... 44
- Figura 5.1** - Curva analítica da astragalina obtida para a verificação da linearidade do método de CLAE. .... 46
- Figura 5.2** - Curva da amostra obtida para a verificação da linearidade da astragalina na amostra obtida por CLAE. .... 47
- Figura 5.3** - Cromatogramas do ensaio de robustez. Parâmetro troca de fluxo. ... 54
- Figura 5.4** - Cromatogramas da solução metanólica do cultivar TB 0224 no ensaio robustez com colunas de lotes diferentes. Lote 1: coluna de trabalho, Lote 2: coluna utilizada de rotina no laboratório. .... 55
- Figura 5.5** - Cromatograma da solução metanólica do cultivar TB 0224 no ensaio robustez com troca de fase móvel. .... 56



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Consumo domiciliar per capita de feijão no Brasil .....	4
<b>Tabela 2</b> - Consumo domiciliar per capita de feijão por tipo no Brasil .....	5
<b>Tabela 3</b> - Nome e cor dos cultivares de feijão .....	27
<b>Tabela 4</b> - Sistema em gradiente linear utilizado na quantificação de astragalina da matéria-prima feijão por CLUE .....	30
<b>Tabela 5</b> - Sistema em gradiente linear utilizado na quantificação de astragalina na matéria-prima feijão por CLAE. ....	31
<b>Tabela 6</b> - Parâmetros analíticos modificados para a realização do teste de robustez. ....	33
<b>Tabela 7</b> - Áreas absolutas para a curva analítica da astragalina obtidas por CLAE. ....	45
<b>Tabela 8</b> - Análise de variância (ANOVA) fator único para a curva analítica da astragalina. ....	46
<b>Tabela 9</b> - Áreas absolutas da astragalina para a curva da amostra de feijão, obtidas por CLAE.....	47
<b>Tabela 10</b> - Análise de variância (ANOVA) fator único para a curva da amostra de feijão. ....	48
<b>Tabela 11</b> - Resultados da análise de regressão da curva analítica da astragalina. ....	48
<b>Tabela 12</b> - Resultados do ensaio de precisão intermediária para o método de quantificação do teor de astragalina em amostra de feijão por CLAE. ....	50
<b>Tabela 13</b> - Resultados do ensaio de exatidão para a substância astragalina em amostra de feijão obtido por CLAE. ....	52

<b>Tabela 14</b> - Robustez: parâmetro variação de fluxo para o método de avaliação da resolução.....	53
<b>Tabela 15</b> - Robustez: troca de lote de coluna.....	55
<b>Tabela 16</b> - Teor de astragalina nos cultivares de feijão analisados.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACN: acetonitrila
- CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência
- CLUE: Cromatografia líquida de ultra eficiência
- CLAE/DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
- DP: desvio padrão
- DPR: desvio padrão relativo
- FDA: Administração de Fármacos e Alimentos, Estados Unidos
- k: constante de velocidade de reação
- PVDF: membrana filtrante em fluoreto de polivilideno
- T<sub>90%</sub>: valor em que a concentração da substância avaliada é 90% da concentração inicial
- T<sub>1/2</sub>: valor em que a concentração da substância avaliada é 50% da concentração inicial
- TFA: ácido trifluoroacético
- UV ultravioleta



## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	7
2.1 Objetivo geral.....	9
2.2 Objetivos específicos.....	9
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1 Família Leguminosae (Fabaceae).....	13
3.2 Gênero <i>Phaseolus</i> .....	14
3.2.1 Atividades biológicas atribuídas ao gênero <i>Phaseolus</i> .....	15
3.3 Flavonóides.....	17
3.3.1 Isoflavonóides.....	19
3.3.2 Astragalina.....	20
3.4 Validação de Métodos Analíticos.....	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 Material vegetal.....	27
4.2 Solventes e Reagentes.....	28
4.3 Processamento das amostras.....	28
4.4 Determinação da perda por dessecação.....	28
4.5 Validação do método analítico.....	29
4.5.1 Preparação da amostra.....	29
4.5.2 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência.....	29
4.5.3 Condições cromatográficas da CLAE.....	30
4.6 Seleção dos comprimentos de onda.....	31

4.7 Parâmetros analíticos .....	31
4.7.1 Especificidade .....	31
4.7.2 Linearidade.....	31
4.7.2.1 Curva analítica da astragalina.....	31
4.7.2.2 Curva da linearidade da amostra .....	32
4.7.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	32
4.7.4 Precisão .....	32
4.7.4.1 Repetibilidade .....	32
4.7.4.2 Precisão intermediária .....	33
4.7.5 Exatidão (Recuperação).....	33
4.7.6 Robustez .....	33
4.8 Quantificação dos cultivares de feijão por CLAE.....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
5.1 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada ao detector de massas .....	37
5.2 Desenvolvimento e validação do método por CLAE.....	39
5.2.1 Especificidade .....	43
5.2.2 Linearidade.....	45
5.2.2.1 Linearidade da astragalina.....	45
5.2.2.2 Linearidade da amostra de feijão .....	46
5.3 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	48
5.4 Precisão 49	
5.4.1 Precisão intermediária .....	49
5.5 Repetibilidade .....	50
5.6 Exatidão 51	
5.7 Robustez.....	52
5.8 Teor de astragalina nos cultivares de feijão .....	56
6 DISCUSSÃO GERAL.....	61
7 CONCLUSÃO .....	67
REFERÊNCIAS .....	71
ANEXOS.....	79

## **1 INTRODUÇÃO**





Atualmente, diversos estudos sugerem que os compostos fenólicos presentes nos vegetais exercem atividades de proteção contra doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, assim como contra o câncer e diabetes devido à capacidade de vincular-se diretamente às proteínas (ou peptídeos). O mecanismo de ação se baseia na capacidade de induzir a inibição de enzimas-chave a modulação de receptores celulares e regular funções celulares relacionadas à inflamação, apoptose, angiogênese, metástases e à resposta imune (YANG, *et al.*, 2009; SANG, *et al.*, 2005; SPENCER, 2009).

Neste contexto destacam-se as leguminosas (Fabaceae), que são amplamente consumidas no mundo, devido ao valor biológico de suas proteínas, a quantidade de lipídeos, sua vasta quantidade de vitaminas e compostos fenólicos. Os estudos em leguminosas têm focado principalmente aspectos relacionados aos hábitos alimentares (DURANTI, 2006).

A família Leguminosae ou Fabaceae se destaca pela grande importância/representatividade que possui na composição de matas nativas, apresentando cerca de 730 gêneros e compreendendo, aproximadamente, 19.400 espécies. No Brasil, por possuir uma rica diversidade de biomas e ampla extensão territorial, sua importância não poderia ser diferente, chegando a apresentar cerca de 188 gêneros e 2.100 espécies nativas (DUTRA *et al.*, 2008; ESTRELLA *et al.*, 2010).

A família Leguminosae divide-se em 3 subfamílias: *Caesalpinieae*, *Mimoseae* e *Papilionaceae* onde as primeiras são encontradas em regiões tropicais, enquanto que a última, conhecida também como *Faboideae*, encontra-se com frequência em regiões temperadas (BAROSSO *et al.*, 1991).

Entre as leguminosas mais consumidas no mundo, destaca-se o feijão (*Phaseolus vulgaris* L., subfamília *Papilionaceae*), que a exemplo de outras importantes leguminosas, teve origem no Novo Mundo e foi levado ao Velho Mundo como planta ornamental após o descobrimento da América (DUARTE *et al.*, 1994). A domesticação do feijão ocorreu na América do Sul ou Central ou em ambas entre 10.000 e 7.000 a.C., produzindo hábitos de crescimento mais compactos, eretos, com gigantismo das partes vegetativas, aumento de tamanho de vagens e

sementes, perda da sensibilidade ao fotoperíodo e dormência na semente, além da redução na deiscência de vagens. Através do método fitogeográfico desenvolvido por VAVILOV (1949/50), foi demonstrado que o centro de diversidade de *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. lunatus* e *P. acutifolius* localizava-se no México e América Central, face à grande diversidade de formas das espécies naquelas regiões (DUARTE *et al.*, 1994).

O feijão comum apresenta ampla variabilidade nas cores de grãos, razão pela qual é enfatizada a comercialização de grupos específicos, segundo as preferências regionais. De acordo com dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), no Brasil, consome-se em média, 13 kg de feijão por habitante (**Tabela 1**) o Rio Grande do Sul, (**Tabela 2**) o de cor preta é o mais procurado, seguido da cor rajado, e em menor escala os cultivares roxo e jalo.

**Tabela 1** - Consumo domiciliar per capita de feijão no Brasil kg/hab/ano.

Região	Total	Urbana	Rural
Brasil	12, 880	10, 880	23, 480
Norte	10, 234	9, 489	12, 363
Nordeste	17, 493	14, 467	26, 198
Centro Oeste	10, 294	9, 569	15, 583
Sudeste	11, 471	9, 820	15, 583
Sul	9, 836	8, 003	18, 692
Paraná	9, 306	-	-
Santa Catarina	8, 882	-	-
Rio Grande do Sul	10, 876	-	-

Fonte: Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003, IBGE.

**Tabela 2** - Consumo domiciliar per capita de feijão por tipo no Brasil – kg/hab/ano.

<b>Tipo de Feijão</b>	<b>Brasil</b>	<b>Norte</b>	<b>Nordeste</b>	<b>Sudeste</b>	<b>Sul</b>	<b>Centro Oeste</b>
Total	12, 880	10, 234	17, 943	11, 471	9, 836	10, 297
Fradinho	1, 557	0, 776	5, 343	0, 037	0, 031	0, 056
Jalo	0, 041	0, 812	0, 362	0, 667	0, 062	0, 056
Manteiga	0, 325	0, 251	0, 824	0, 062	0, 291	0, 067
Mulatinho	0, 709	0, 128	2, 355	0, 088	0, 036	0, 055
Preto	2, 891	1, 023	1, 977	2, 582	6, 766	21, 340
Carioca	5, 077	5, 280	5, 297	6, 071	1, 247	5, 939

Fonte: Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003, IBGE.

Na alimentação dos brasileiros, o feijão é a principal fonte de proteína, seguido em importância pela carne bovina e pelo arroz. Apenas esses três alimentos básicos contribuem com 70% da ingestão protéica, além de ser uma cultura de grande expressão sócio-econômica no Brasil (LAJOLO *et al.*, 1996).

Cor e tamanho são duas características importantes para determinar a qualidade das sementes de feijão. Tamanho e peso da semente dependem das variações genéticas e condições ambientais (GONZÁLEZ de MEJÍA *et al.*, 2005). A cor da semente é geneticamente determinada pela concentração de flavonóides glicosilados, isoflavonóides, antocianos e taninos condensados (BENINGER e HOSFIELD, 2003; APARÍCIO-FERNÁNDEZ, *et al.*, 2005).

Sendo o feijão um dos principais alimentos consumidos em todo o mundo devido ao alto valor biológico de suas proteínas, vasta gama de vitaminas e apresentando em sua composição química compostos fenólicos, além de grande importância econômica não só para o Brasil, mas também para o estado do Rio Grande do Sul, torna-se relevante o estudo de seu conteúdo químico.



**2 OBJETIVOS**



## **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver e validar um método analítico para quantificação de astragalina em 47 diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).

## **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a presença de astragalina em sementes de 47 cultivares de *Phaseolus vulgaris* L;
- Desenvolver e validar um método analítico adequado por CLAE para análise de astragalina nos diferentes cultivares de feijão;
- Determinar o teor de astragalina nos diferentes cultivares de feijão.





### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



Os vegetais, em sua grande maioria, apresentam em sua composição química polifenóis, aos quais são atribuídos importantes papéis funcionais, como resistência das plantas a patógenos e insetos (ação antibiótica e inibição alimentar), contra a radiação solar, bem como na reprodução, nutrição e crescimento quando se trata de interação com outros organismos presentes no solo ou abaixo dele, como fungos e bactérias. Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram sistemas químicos, como a produção de metabólitos secundários, para lidar com diversos fatores ambientais. Os metabólitos secundários demonstram seu valor durante o desenvolvimento da planta, auxiliando na manutenção do equilíbrio ecológico entre a planta e outros organismos vivos, influenciando em seu metabolismo, inclusive a do ser humano. Sem dúvida, os compostos fenólicos merecem atenção especial quando são considerados os amplos benefícios que oferecem não só às plantas, mas ao seres humanos (LATANZZIO *et al.*, 2008).

### **3.1 Família Leguminoseae (Fabaceae)**

A família Leguminoseae é distribuída em três subfamílias: *Papilionaceae*, *Mimoseae* e *Caesalpinieae*. Sua distribuição geográfica é ampla e em sua composição apresenta grande diversidade de constituintes químicos (DUTRA *et al.*; 2008; De OLIVEIRA, 2009; ESTRELLA *et al.*, 2010).

A subfamília *Papilionaceae* é a mais abundante, possuindo o maior número de tribos e, conseqüentemente o maior número de espécies. Considerada o grupo mais evoluído da família Leguminoseae, é representada por ervas, subarbustos, arbustos, árvores, trepadeiras e lianas. Suas folhas são pinadas, uni, tri ou plurifoliadas com inflorescências racemosas ou paniculadas. Suas flores apresentam corola papilionácea, simetria zigomorfa e prefloração imbricada vexilar, androceu com no máximo 10 estames e gineceu uni ou pluricarpelar (RODRIGUES e GARCIA, 2007).

A família Leguminoseae está distribuída geograficamente em diversos pontos do planeta abrangendo regiões de clima frio, temperado e tropical. Além da importância econômica para diversos países do mundo, inclusive o Brasil, são amplamente conhecidas pelas suas características de interesse na saúde humana, como por exemplo, propriedades antioxidantes (De OLIVEIRA, 2009). Seus frutos e

sementes são muito utilizados como alimentos e, a madeira por ela produzida, está entre as mais valiosas do mundo (REIS e MARTINS da SILVA, 2008).

Do ponto de vista da agricultura um aspecto importante é a capacidade de associar-se a bactérias fixadoras de nitrogênio em suas raízes, como *Rhizobium* e ao *Bradyrhizobium*, formando um sistema de defesa contra fungos e bactérias, diminuindo os custos de produção, evitando o uso excessivo de agrotóxicos e não agredindo o meio ambiente (DUTRA *et al.*, 2008; REIS e MARTINS da SILVA, 2008).

### 3.2 Gênero *Phaseolus*

O gênero *Phaseolus*, no qual todas as espécies são diplóides, compreendem mais de 100 espécies. Entretanto, somente quatro, *P. vulgaris* L, *P. coccineus* L., *P. acutifolius* Gray var. *latifolius* Freem e *P. lunatus* var. *lunatus* são cultivadas comercialmente (DUARTE *et al.*, 1994).

*Phaseolus vulgaris* é a espécie mais cultivada dentre as quatro pertencentes do gênero *Phaseolus* utilizadas comercialmente. O feijão (**Figura 3.1**) não se adapta aos trópicos úmidos, mas cresce bem em áreas com chuvas regulares, desde os trópicos até as zonas temperadas. É muito sensível tanto às geadas quanto às altas temperaturas. Condições de seca durante as épocas críticas, do florescimento ao enchimento das vagens, são também muito prejudiciais. Da mesma maneira, o excesso de chuvas causa a queda de flores e aumenta a ocorrência de enfermidades na planta (DUARTE *et al.*, 1994).

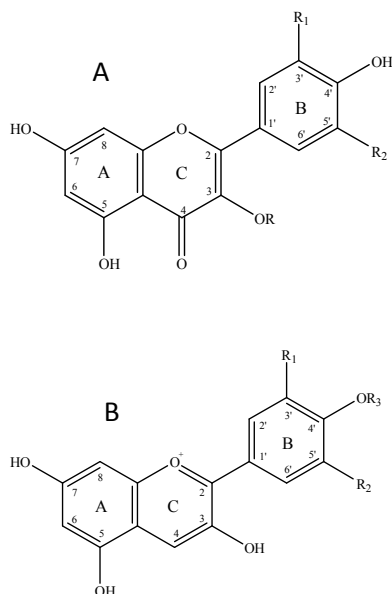
O feijão é um excelente alimento, fornecendo nutrientes essenciais ao ser humano, como proteínas, ferro, cálcio, magnésio, zinco, vitaminas (principalmente do complexo B), carboidratos e fibras. Representa a principal fonte de proteínas das populações de baixa renda e constitui um produto de destacada importância nutricional, econômica e social. Além de ser um dos alimentos mais tradicionais na dieta alimentar do brasileiro. Portanto, a sua contribuição como fonte de proteína e caloria é bastante significativa (SOARES, 1996).



**Figura 3.1** - Sementes de diferentes cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. No canto superior esquerdo o cultivar Guabijú Brilhante, canto superior direito TB 0224, no centro Iraí, canto inferior esquerdo Roxo Redondo e no canto inferior direito o cultivar TB 0310.

### 3.2.1 Atividades biológicas atribuídas ao gênero *Phaseolus*

Além de ser uma fonte de nutrientes essenciais, o feijão possui constituintes químicos que são considerados componentes com ação funcional, e a eles são atribuídos atividades antioxidantes, como os flavonóides (**Figura 3.2**), incluindo flavonóis, glicosilados ou não, antocianidinas, proantocianidinas e isoflavonas, bem como ácidos fenólicos (LIN *et al.*, 2008).



### Flavonóides

Canferol:  $R=R_1=R_2=H$

Quercetina:  $R=R_2=H, R_1=OH$

Miricetina:  $R=H, R_1=R_2=OH$

Quercitrina:  $R=O\text{-ramnosídeo}, R_1=OH, R_2=H$

Astragalina:  $R=O\text{-glucosídeo}, R_1=R_2=H$

### Antocianidinas

Pelargonidina:  $R_1=R_2=R_3=H$

Cianidina:  $R_1=OH, R_2=R_3=H$

Delfinidina:  $R_1=R_2=OH, R_3=H$

Petunidina:  $R_1=OMe, R_2=Me, R_3=H$

**Figura 3.2** - Estruturas dos flavonóides (A) e antocianidinas (B).

Importantes atividades biológicas tem sido atribuídas ao feijão, como antioxidante (CARDADOR-MARTÍNES, *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2004) antimutagênico (CARDADOR-MARTÍNES, 2002; GONZÁLEZ de MEJIA *et al.*, 2005) e anticarcinogênico (HANGER e BENNINGER, 2002), todas elas atribuídas à presença de compostos fenólicos. Os efeitos antioxidantes dos compostos fenólicos levaram a alegações de que o consumo de alimentos e bebidas ricos em polifenóis são benéficos para a saúde humana. Os polifenóis desempenham papel importante como antioxidantes, inibindo a formação de radicais livres (BENNINGER e HOSFIELD, 2003 e NAMIKI, 1990).

A cor da casca determina a presença e a quantidade de flavonóides glicosilados, antocianinas, antocianidinas e proantocianidinas. Genótipos de feijão de cor não preta foram estudados e compostos fenólicos responsáveis pela cor do feijão foram isolados e identificados (BENNINGER e HOSFIELD, 1998 e TAKEOAKA *et al.*, 1997).

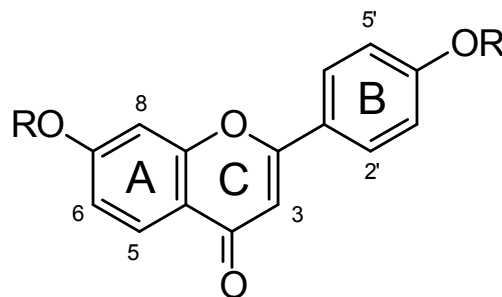
Utilizando a técnica de RMN HR-MAS (High Resolution Magic Spinning) para o estudo do perfil químico de 12 cultivares de feijão, LIÃO e colaboradores (2010) identificaram oligossacarídeos rafinose, verbacose e estaquiose. Além destes oligossacarídeos, outros compostos fenólicos como antocianinas, flavonóides

glicosilados, ácidos cinâmicos esterificados e diácidos tetra-hidroxilados foram relatados.

Em estudo realizado por APARÍCIO-FERNANDEZ e colaboradores (2005) foi possível identificar flavonóides como antocianos, flavonóides monômeros e heterogêneos em extrato metanólico de casca de feijão preto. A técnica utilizada para identificação destes compostos foi a cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a espectrometria de massas (HPLC/MS).

### 3.3 Flavonóides

Flavonóides (**Figura 3.3**) são metabólitos secundários que apresentam quinze átomos de carbono em seu núcleo fundamental, contendo dois anéis aromáticos unidos por três átomos de carbono. Sua estrutura é formada pela ação de dois caminhos biossintéticos diferentes, sendo o caminho do ácido chiquímico, responsável pela sub-unidade fenilpropânica e o caminho do ácido acético responsável pela origem de seis átomos de carbono do anel aromático (ZUANAZZI e MONTANHA, 2007). Os vegetais sintetizam um grande número de compostos fenólicos no curso de seu desenvolvimento e em diferentes órgãos. Provavelmente sintetizados nas organelas citoplasmáticas, os flavonóides se acumulam no vacúolo das plantas.



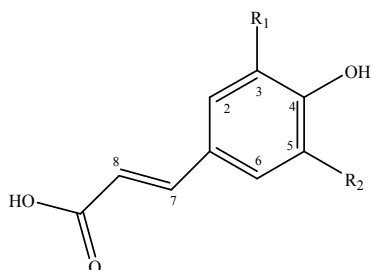
**Figura 3.3** - Núcleo fundamental dos flavonóides.

Algumas das funções específicas dos flavonóides são: (a) proteção contra os raios ultravioletas e visíveis e, também, proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; (b) quimioatraentes de animais para polinização; (c) antioxidantes; (d)

controle da ação de hormônios vegetais; (e) agentes alelopáticos e (f) inibição de enzimas. Mais recentemente, o estudo de flavonóides conheceu um novo interesse: seu papel nos mecanismos de reconhecimento entre os rizóbios e as plantas leguminosas. Além disso, os flavonóides são muito úteis como marcadores taxonômicos em comparação com outros metabólitos, devido a sua grande distribuição, relativa estabilidade química e fácil identificação (MARKHAM, 1989).

Pesquisas com o gênero *Phaseolus* abrangem os mais variados grupos químicos e atividades farmacológicas. Estudo relacionado à atividade química e biológica de extrato aquoso-acetônico (70%) da casca de quatro diferentes cultivares de feijão, apresentou atividade antioxidante e efeito inibitório das COX-1 (IC<sub>50</sub> = 1,2 mg/ml) e COX-2 (IC<sub>50</sub> = 38 mg/mL) (OOMAH *et al.*, 2010).

Entre outros compostos fenólicos presentes em *P. vulgaris*, destacam-se o ácido ferrúlico, ácido *p*-cumárico, ácido sinápico (**Figura 3.4**) e ácido caféico encontrados em 10 classes de 15 variedades de feijão comercial nos Estados Unidos (LUTHRIA e PASTOR-CORRALES, 2006).



#### Ácidos trans-hidroxicinâmicos

Ácido *p*-cumárico: R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H

Ácido ferúlico: R<sub>1</sub>=OMe, R<sub>2</sub>=H

Ácido sinápico: R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OMe

**Figura 3.4** - Ácidos trans-hidroxicinâmicos.

A cor das cascas de sementes de feijão determina a composição dos seus compostos fenólicos, conforme estudo demonstrado por LIN e colaboradores (2008). Estes pesquisadores avaliaram o perfil fenólico de 24 variedades de feijão utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a um detector de



arranjo de diodos e espectrômetro de massas (CLAE-DAD-MS). O estudo concluiu que nas sementes de cor preta os compostos presentes em maior quantidade foram petunidina, delphinidina, malvidina e canferol e nas sementes de cor vermelha e de menor tamanho, canferol 3-O-glicosídeo e pelargonidina 3-O-glicosídeo (LIN *et al.*, 2008).

Os flavonóis quercetina e canferol são os flavonóides mais abundantes nos alimentos, e seu consumo tem sido relacionado à diminuição de doenças cardiovasculares e câncer de pulmão devido a sua capacidade antioxidante. Os possíveis mecanismos envolvidos nessa relação são a modulação de enzimas de desintoxicação e inibição de algumas enzimas relacionadas à proliferação celular (MARCHAND, 2002).

A dosagem de flavonóides é bastante complexa em virtude do comportamento dos heterosídeos, das respectivas agliconas e pela dificuldade de isolamento dessas substâncias e outras classes de fenóis (ZUANAZZI e MONTANHA, 2007).

### **3.3.1 Isoflavonóides**

Os isoflavonóides são flavonóides que se diferenciam dos demais por possuir um anel do tipo difenil-1,2-propano. Ao contrário das outras classes de flavonóides, sua distribuição taxonômica é restrita, quase que exclusiva das leguminosas. Como os flavonóides, os isoflavonóides são classificados pela variação do grau de oxidação do anel heterocíclico, sendo as reações secundárias como hidroxilação, metilação e prenilação as responsáveis pelas variações adicionais dadas aos grupos arílicos (ZUANAZZI e MONTANHA, 2007).

Pesquisadores em todo mundo têm demonstrado grande interesse nos metabólitos secundários e em particular nos potenciais benefícios que uma dieta rica nestes compostos pode conferir no controle de muitas doenças crônicas. O maior interesse dos pesquisadores concentra-se na farmacologia e fisiologia dos isoflavonóides, pois apresentam estrutura não esteroidal, mas comportam-se como estrógenos na maioria dos sistemas biológicos, além de serem mais abundantes entre os fitoestrógenos. Em adição à sua atividade anti-estrogênica, estes

compostos possuem diversas propriedades biológicas, como atividade antioxidante, (inibição da atividade enzimática e outras) que podem influenciar muitos processos bioquímicos e fisiológicos (SETCHELL, 1998).

A evidência de que isoflavonóides protegem contra várias doenças crônicas é baseada em estudos experimentais e epidemiológicos. Em humanos, estudos epidemiológicos mostram claramente uma maior incidência de alguns tipos comuns de câncer (mama, próstata e cólon) e doenças cardiovasculares nas populações ocidentais expostas a limitadas quantidades de isoflavonas de soja (por exemplo: daidzeína e genisteína) na dieta. Evidência adicional para proteção contra o câncer e doenças cardíacas, resultantes da administração de isoflavonas de soja, tem sido verificada em vários modelos experimentais com animais. As isoflavonas podem também prevenir a perda óssea pós-menopausa e a osteoporose (BRANDI, 1997). Efeitos da genisteína na regulação da secreção de insulina também têm sido demonstrados (SORESON *et al.*, 1994).

### **3.3.2 Astragalina**

A astragalina (canferol 3-O- glicosídeo) é um dos principais flavonóides encontrados em plantas e vêm recebendo crescente atenção devido aos benefícios à saúde e atividades biológicas, incluindo efeitos antioxidantes e antiinflamatórios (CORREIA *et al.*, 2006). Além disso, a astragalina é responsável pela cor de diferentes grãos e tem sido apontada como importante suplemento alimentar (BENINGER e HOSFIELD, 2003).

No gênero *Phaeolus*, a astragalina também está associada à biodisponibilidade e absorção de ferro na luz intestinal, estando presente principalmente em feijões de cor. Além disso, a astragalina mostrou-se resistente mesmo após o cozimento dos feijões (LAPARRA *et al.*, 2008).

### **3.4 Validação de Métodos Analíticos**

Ocorreu nos últimos anos, grande avanço nos métodos analíticos no âmbito de isolamento e identificação de compostos químicos de espécies vegetais. Mas,

difícilmente todos os constituintes presentes nos extratos das plantas podem ser identificados.

Fatores externos, incluindo: temperatura, umidade, luminosidade, nutrientes do solo, secagem, entre outros, podem variar consideravelmente o teor de constituintes químicos presentes nas plantas (CALIXTO, 2001a).

Determinar constituintes químicos e o marcador químico são fatores de grande importância para definir os parâmetros necessários para padronizar os métodos na avaliação da qualidade da matéria-prima vegetal. A Resolução n. 14, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA; BRASIL, 2010), afirma que o marcador é o “componente ou classe de compostos químicos (alcalóides, flavonóides, ácidos graxos, etc.) presente na matéria-prima vegetal, idealmente o próprio princípio ativo, e preferencialmente que tenha correlação com o efeito terapêutico”.

A técnica de CLAE apresenta parâmetros passíveis de modificação do operador para aperfeiçoar o método analítico. Entre principais fatores, encontram-se os solventes da fase móvel, o tamanho da coluna, o detector, alta rapidez de análise, repetibilidade e precisão dos resultados, facilidade e manipulação do equipamento e softwares modernos que possibilitam a análise completa dos cromatogramas.

Durante a pesquisa de metabólitos secundários, muitas amostras contêm compostos polares e não voláteis, sendo que a cromatografia líquida combinada com um detector UV-visível, pode ser o sistema escolhido para o isolamento e determinação de metabólitos de interesse. A cromatografia líquida é uma técnica analítica que compreende uma grande variedade de modos de separação, os quais podem ser escolhidos segundo a natureza química dos compostos a serem analisados (ZUANAZZI e MONTANHA, 2007).

Para a validação de métodos analíticos, existem órgãos regulamentadores como o ICH (*International Harmonization Conference*, 2005), Farmacopéia Americana (*United States Pharmacopeia USP*, 2008), e a ANVISA (*Agência Nacional de Vigilância Sanitária*, BRASIL, 2003) que estabelecem normas para a sua realização, garantindo assim confiabilidade nos resultados alcançados.

Os parâmetros para a quantificação conforme o ICH (2005) são: exatidão, precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade), especificidade, limite de quantificação, limite de detecção, linearidade, intervalo de linearidade e robustez.

**Especificidade/Seletividade** – capacidade de avaliar de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir na sua determinação em uma amostra complexa. O método que produz uma resposta a um dado elemento pode ser chamado de específico, e o método que produz resposta para vários constituintes químicos em comuns, é chamado de seletivo. O ICH (2005) e a USP (2008), consideram especificidade como o termo correto. Uma das maneiras de avaliar a especificidade por cromatografia líquida é utilizando detectores de arranjo de fotodiodos, que comparam o espectro de absorção de uma substância referência com o pico obtido na separação da amostra, sendo uma forma de pureza do composto. Se a especificidade não for assegurada, linearidade, exatidão e precisão estão comprometidas.

**Linearidade** - é a habilidade do método analítico em produzir resultados que são diretamente, ou por uma transformação matemática bem definida, proporcionais à concentração do analito dentro de uma dada faixa. Faixa de aplicação do método analítico é validada verificando se o método fornece precisão, exatidão e linearidade aceitáveis quando aplicado a amostras contendo analito nos extremos da faixa e dentro da mesma. O comportamento dos resultados deve ser descrito por uma equação linear e avaliado por métodos estatísticos apropriados como, por exemplo, cálculo de regressão pelos métodos dos mínimos quadrados e análise de variância.

**Exatidão** – pode ser demonstrada pela comparação dos resultados obtidos com material de referência certificado ou com outro método validado cujo erro sistemático é sabidamente não significativo.

Outra forma de investigação consiste em comparar a média dos resultados obtidos com a média obtida do programa interlaboratorial, ou ainda por meio de estudos de recuperação de quantidades conhecidas do analito adicionado na matriz limpa da amostra ou ainda na matriz da amostra.

**Precisão** - Precisão do método analítico é o grau de concordância entre resultados de medidas independentes em torno de um valor central, efetuadas várias vezes em uma amostra homogênea, sob condições pré-estabelecidas. Em seus resultados é avaliado o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV), que corresponde ao desvio padrão relativo (DPR). O ICH (2005) e a Resolução nº 899 (ANVISA; BRASIL, 2003) destacam que a precisão pode ser medida em três níveis:

- **Repetibilidade:** em um curto espaço de tempo são feitas medições sucessivas da mesma amostra, mas em diferentes preparações, como pela avaliação de seis determinações a 100% da concentração teórica da amostra, ou nove determinações em três níveis de concentração.
- **Precisão Intermediária:** Expressa a variabilidade em longo prazo. Indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou combinações destes fatores. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados.
- **Reprodutibilidade:** São estudos entre laboratórios no sentido de reprodução dos resultados da metodologia aplicada.

**Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)** - o LD é a menor concentração do analito em uma amostra, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob determinadas condições experimentais, enquanto que o LQ é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob determinadas condições experimentais.

**Robustez** – É a capacidade do método de resistir a pequenas variações de parâmetros analíticos. Na cromatografia líquida, os parâmetros são variação de pH da fase móvel, variação da composição da fase móvel, diferentes lotes de coluna, temperatura da coluna e fluxo da fase móvel.

A responsabilidade na identificação dos parâmetros a serem investigados, assim como o método e seu respectivo uso, é do analista, para que os resultados gerados pela aplicação do método sejam de total confiabilidade quando o uso for

rotineiro (SWARTZ & KRULL, 1997). Na validação de metodologias analíticas cromatográficas, o ICH (2005) e a Farmacopéia Americana (USP 2008), reconhecem que não existe a necessidade de avaliar todos os parâmetros de desempenho analítico.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**





#### 4.1 Material vegetal

O material, no total de 47 genótipos de (*Phaseolus vulgaris* L.), foi obtido junto ao programa de melhoramento genético da EMBRAPA Clima Temperado -Pelotas-RS (Tabela 3).

**Tabela 3** - Nome e cor dos cultivares de feijão.

<b>Cultivar</b>	<b>Cor</b>
TB 9820	Preto
TB 0201	Preto
TB 0202	Preto
TB 0203	Preto
TB 0204	Preto
TB 0207	Preto
TB 0210	Preto
TB 0211	Preto
TB 0212	Preto
TB 0213	Creme
TB 0219	Preto
TB 0220	Preto
TB 0221	Preto
TB 0222	Preto
TB 0223	Roxo
TB 0224	Amarelo/Creme
TB 0225	Preto
TB 0226	Amarelo/Creme
TB 0301	Preto
TB 0302	Preto
TB 0303	Preto
TB 0304	Bege
TB 0305	Preto
TB 0306	Preto
TB 0307	Vermelho
TB 0308	Preto
TB 0309	Chocolate
TB 0310	Vermelho
Amarelo Iolanda	Amarelo
Mato Grosso	Preto
Preto Ibérico	Preto
Guabiju Brilhante	Preto
Roxo Redondo	Roxo
AM-5	Preto
Biriva- 264	Roxo
Rosinha Precoce	Amarelo Claro
Mouro Tavares 187	Roxo
03 FPJ CF 29-1	Preto
Carioca	Marrom
Guapo Brilhante	Preto

Iraí	Creme
FT Nobre	Preto
BRS Expedito	Preto
BRS Valente	Preto
Macanudo	Preto
Macotaço	Preto
Minuano	Preto

---

## 4.2 Solventes e Reagentes

Utilizou-se para a realização deste trabalho os seguintes solventes: hexano e metanol das marcas Merck® e Nuclear®. Para a análise em CLAE foram utilizados os solventes acetonitrila (J.T Baker-Mallinkrodt Chemicals®) água ultra-pura e ácido fórmico (Tedia®) e padrão de Astragalina, grau de pureza 97% da Sigma- Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

## 4.3 Processamento das amostras

Grãos de feijão foram escolhidos aleatoriamente, moídos com o auxílio do moinho de facas, desengordurados com 10 mL de hexano por maceração estática durante 4 h, e para a retirada do solvente, o material foi deixado na capela para secagem, tamisado (710 µm) e utilizado para o desenvolvimento de metodologia analítica e quantificação. As amostras foram armazenadas em vidros âmbar a temperatura ambiente.

## 4.4 Determinação da perda por dessecação

A técnica utilizada está descrita na Farmacopéia Brasileira 5 ed. (2010) e foi realizada em triplicata sendo os resultados expressos em massa percentual. Um(1) grama de amostra tamisada foi pesada em pesa-filtro, previamente dessecado durante 30 minutos, a 105 °C, e o pesa-filtro brandamente agitado para distribuir a amostra da maneira mais uniforme possível. O pesa-filtro foi levado para estufa, sem a tampa, também deixada na estufa. A amostra foi seca a 105 °C durante 4 h. A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em massa percentual.

## 4.5 Validação do método analítico

Os parâmetros utilizados para a validação do método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram baseados nas seguintes normas: Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2005), USP (2008) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RE n.º 899 (BRASIL, 2003)

### 4.5.1 Preparação da amostra

Para a preparação do extrato, utilizou-se 0,5 g de amostra seca e desengordurada (**item 4.3**) e pesada em frasco de vidro de 20 ml de capacidade, adicionado 5 mL de metanol sendo a mistura agitada com auxílio do agitador magnético durante 10 minutos. O conjunto foi centrifugado 2.500 rpm durante 5 minutos, e o sobrenadante transferido quantitativamente para balão volumétrico de 5 mL com auxílio de pipeta de Pasteur. O volume do balão foi completado com metanol 100%. O conteúdo do balão foi transferido para tubo de centrifuga e centrifugado (2.500 rpm, 5 minutos). O sobrenadante foi filtrado em membrana (PVDF, 0,45 µm) para análise em CLAE.

### 4.5.2 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

As análises do cultivar Amarelo Iolanda foram feitas em Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência- UPLC com detector PDA Waters Acquity (Milford, MA), gerenciado pelo software MassLinx v4.1, com comprimento de onda entre 200 e 400nm. O cromatógrafo foi equipado com coluna C18 Waters Acquity 1,7µm com dimensões 2,1 x 5,0mm. A fase móvel foi constituída de fase(A): 99,9% de água e 0,1% de ácido fórmico e fase (B): 99,9% de acetonitrila e 0,1% ácido fórmico com volume de injeção de 10 µl e fluxo de 0,2 mL/min em modo gradiente linear, demonstrado na **Tabela 4**. Para a verificação do espectro de massas do pico majoritário utilizou-se o extrato do cultivar Amarelo Iolanda, que demonstrou reprodutibilidade nas análises prévias por CLAE.

**Tabela 4** - Sistema em gradiente linear utilizado na quantificação de astragalina da matéria-prima feijão por CLUE

Tempo (min)	Fluxo (ml)	A (%)	B (%)
0	0,2	95	5
20	0,2	75	25
30	0,2	0	100
35	0,2	0	100

**Obs:** O sistema foi mantido em equilíbrio durante 5 minutos nas condições de 95%A e 5%B antes de cada injeção, para retomar as condições iniciais.

Acetonitrila grau analítico (J.T Baker-Mallinkrodt Chemicals®), água ultra pura (Milli-Q®) e o ácido fórmico (Tedia®) foram previamente filtrados através de membrana filtrante (HPLV 047/Millipore) e desaeradas por 10 minutos em banho de ultra som.

#### 4.5.3 Condições cromatográficas da CLAE

As análises por CLAE foram realizadas em cromatógrafo a líquido (Waters 2690) constituído por detector ultravioleta UV/VIS a 350 nm, degaseificador, sistema de injetor automático. Todo o sistema foi controlado pelo programa Empower Pro, que também gerencia o sistema de aquisição e tratamento dos dados. Foi utilizada uma coluna de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno (Phenomenex, Synergi Fusion, C<sub>18</sub>; 4 µm), protegida por pré-coluna empacotada com sílica octadecilsilanizada (C<sub>18</sub>, 5 µm). A análise foi realizada a temperatura ambiente (22°C ± 2°C), controlada por ar condicionado. A fase móvel utilizada é constituída por: Fase (A): 100% de água e 0,1% de ácido fórmico e Fase (B): 100% de acetonitrila e 0,1% ácido fórmico, fluxo de 0,8 ml/min em modo gradiente linear, conforme **Tabela 5**. No final, o sistema foi mantido durante 8 minutos em equilíbrio com 95%(A) e 5%(B), a fim de que as condições cromatográficas iniciais fossem retomadas antes da próxima injeção. O tempo total por corrida cromatográfica foi de 63 minutos incluindo o equilíbrio. Sensibilidade de detecção utilizada foi 0,05 AUFS.

**Tabela 5** - Sistema em gradiente linear utilizado na quantificação de astragalina na matéria-prima feijão por CLAE.

Tempo (min)	Fluxo (ml)	A (%)	B (%)
0	0,8	95	
35	0,8	75	35
45	0,8	0	100
55	0,8	0	100

**Obs:** O sistema foi mantido em equilíbrio durante 8 minutos nas condições de 95%A e 5%B antes de cada injeção, para retomar as condições iniciais.

#### 4.6 Seleção dos comprimentos de onda

O espectro de varredura na região ultravioleta de 210 a 400 nm da solução extrativa e substância de referência foi traçado para a verificação dos máximos de absorção e seleção do comprimento de onda a ser utilizado na análise por CLAE.

#### 4.7 Parâmetros analíticos

##### 4.7.1 Especificidade

A especificidade foi determinada após a injeção da solução extrativa em cromatógrafo acoplado a detector de arranjo de fotodiodos (PDA 996 Waters), para verificar a pureza do pico de interesse.

##### 4.7.2 Linearidade

A linearidade do método foi verificada de dois modos distintos, por meio da construção de curvas analíticas da substância de referência astragalina e verificação da linearidade da extração da amostra conforme descrito a seguir.

###### 4.7.2.1 Curva analítica da astragalina

Para a preparação da curva de linearidade partiu-se da solução de astragalina com concentração teórica final de 194 µg/ml (considerando a pureza do padrão 97%), sendo construída contemplando 5 níveis de concentração em uma faixa de 80% a 120% (7,76 µg/ml, 8,73 µg/ml, 9,70 µg/ml, 10,67 µg/ml e 11,64 µg/ml). Para cada ponto da curva foram realizadas 3 determinações. Todas as amostras foram

previamente filtradas com membrana (PVDF, 0,45 µm) e 10 µl foram injetadas no cromatógrafo.

#### 4.7.2.2 Curva da linearidade da amostra

Foram construídas curvas contemplando as concentrações de 80% a 120% [(0,40 mg/ml, 0,45 mg/ml, 0,50 mg/ml, 0,55 mg/ml e 0,60 mg/ml)] da concentração de trabalho, para verificar a linearidade da extração da amostra e 10 µl foram injetados no cromatógrafo. As médias das áreas referentes a cada concentração da curva analítica e curva da amostra foram plotadas em gráfico de concentração versus área, calculando-se o coeficiente de regressão linear da curva pelo método dos mínimos quadrados e análise de variância (ANOVA) utilizando o processador de dados Microsoft Excel®. A linearidade foi analisada considerando o coeficiente de regressão linear e os parâmetros da equação linear (interseção e coeficiente angular) da curva média obtida. Os resultados foram expressos pela média das curvas.

#### 4.7.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os parâmetros LD e LQ foram obtidos matematicamente com os dados da curva analítica de astragalina. As equações abaixo foram utilizadas para os cálculos, conforme preconizadas pelo ICH (2005) e ANVISA (2003).

$$LD = 3,3 \cdot \left( \frac{S}{I} \right) \quad LQ = 10 \cdot \left( \frac{S}{I} \right)$$

Onde o  $S$  = desvio padrão do intercepto com o eixo do  $Y$  e  $I$  = inclinação

#### 4.7.4 Precisão

##### 4.7.4.1 Repetibilidade

Seis amostras foram preparadas em um mesmo dia (**item 4.5.1**) e 10 µl das soluções extrativas previamente filtradas foram injetados no cromatógrafo. Os resultados foram expressos em termos absolutos através do desvio padrão relativo (DPR%) das seis determinações.

#### 4.7.4.2 Precisão intermediária

Para a avaliação da precisão intermediária foram considerados como fatores de variação diferentes dias de análises e diferentes extrações da amostra. A amostra foi extraída (**item 4.5.1**) em triplicata (precisão intra-dia), em três dias diferentes (precisão entre - dias). Os resultados foram expressos em termos absolutos através do desvio padrão relativo (DPR%).

#### 4.7.5 Exatidão (Recuperação)

Foram adicionadas quantidades crescentes de astragalina em três níveis de concentração (4 µg/ml, 6 µg/ml e 8 µg/ml) na solução extrativa da amostra, e o cálculo da concentração recuperada foi realizado conforme equação abaixo.

$$R\% = \frac{[(C_F - C_A)]}{C_P} \times 100$$

Onde:

$C_F$ : concentração da substância teste na solução extrativa;

$C_A$ : concentração da substância teste na solução extrativa;

$C_P$ : concentração da substância teste adicionada na solução extrativa.

#### 4.7.6 Robustez

Para testar a robustez do método desenvolvido, condições experimentais foram propositalmente alteradas e a resolução entre os picos da solução amostra foi observada. As variações estão descritas na **Tabela 6**.

**Tabela 6** - Parâmetros analíticos modificados para a realização do teste de robustez.

Parâmetros	Condição de trabalho	Alteração
<b>Coluna Cromatográfica</b>	Phenomenex Synergi Fusion Lote 1 (3,9 x 150 mm, 4µm)	Phenomenex Synergi Fusion Lote 2 (3,9 x 150 mm, 4µm)
<b>Fluxo</b>	0,8 ml / min.	0,7 ml/min e 0,9 ml/min
<b>Fase móvel</b>	(A): água:AF (99,9:0,1%) (B): acetonitrila:AF(99,9:0,1%)	(A): água:TFA (100:0,05,v/v) (B): acetonitrila (100%)

AF: ácido fórmico, TFA: ácido trifluoracético.

#### **4.8 Quantificação dos cultivares de feijão por CLAE**

Os cultivares de feijão foram extraídos de acordo com o item **4.5.1** e 10  $\mu$ l foram injetados no cromatógrafo. Os teores de astragalina foram calculados a partir da curva analítica. Os resultados estão no anexo.



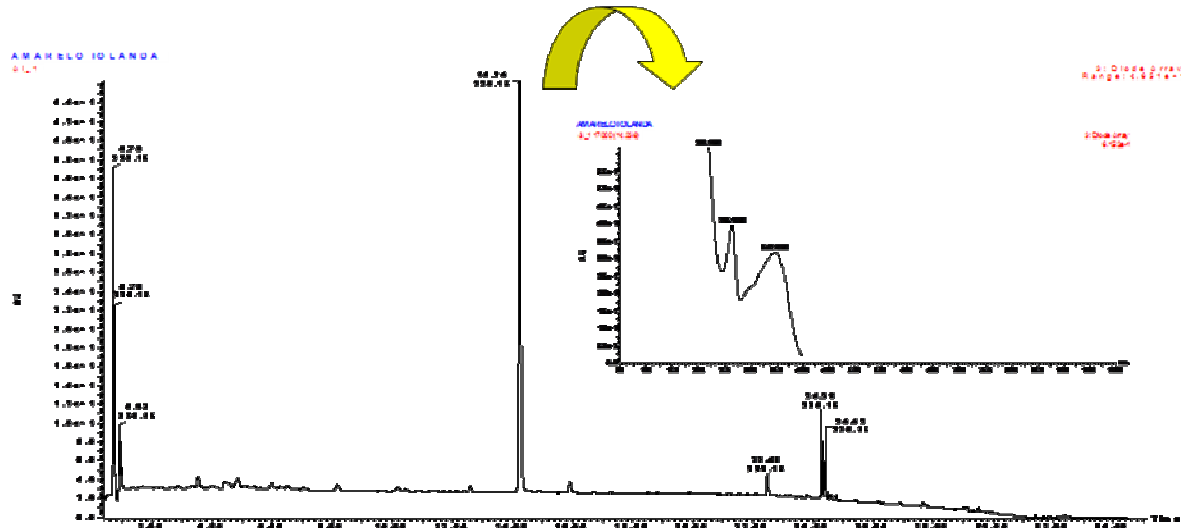
## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**



## 5.1 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada ao detector de massas

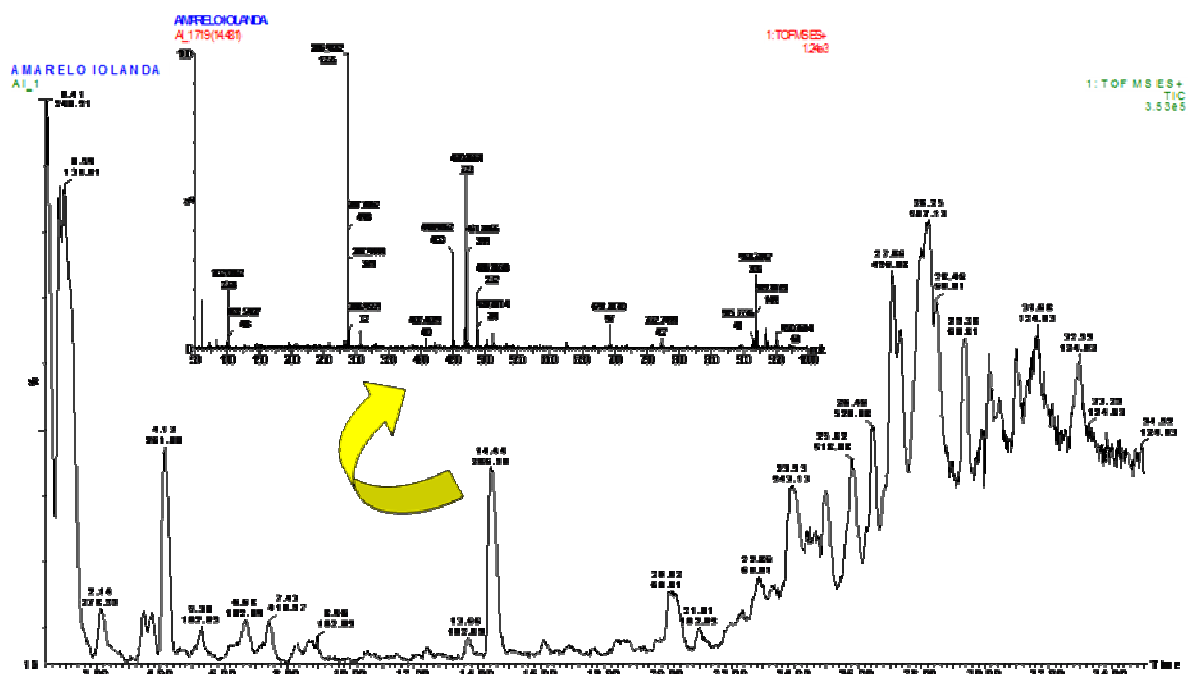
A técnica de análise de compostos naturais por espectrometria de massas tem sido uma ferramenta muito útil no auxílio à identificação dos mesmos, especialmente quando associada à cromatografia líquida de ultra eficiência. Para a análise qualitativa de astragalina tomou-se como referência o cultivar Amarelo Iolanda.

A análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) acoplada a detector de espectrometria de massas da amostra amarelo Iolanda apresentou cromatograma que reproduz as análises realizadas pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (**figura 4.1**). Pode-se observar a presença majoritária de um composto com tempo de retenção de 14,24 minutos. O espectro de absorção na região do ultravioleta, para esta substância, apresentou máximos de absorção de 220,14; 265,14 e 347,14 nm, característico de flavonóis (DINELLI *et al.*, 2006).

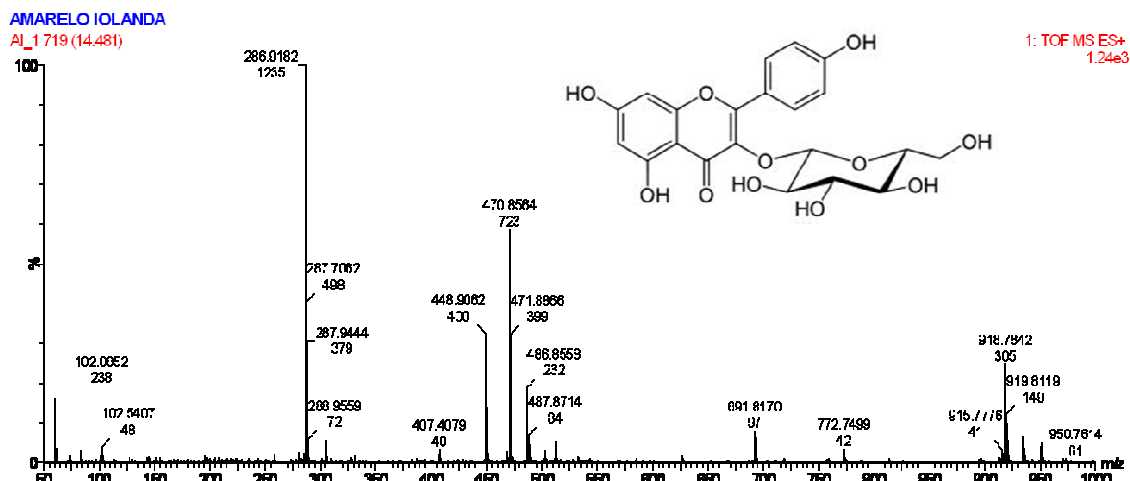


**Figura 4.1** - Cromatograma UPLC-PDA do cultivar amarelo Iolanda . No detalhe espectro de ultravioleta (200-400nm) da substância com tempo de retenção 14,24 minutos. Fase móvel: (A) água:ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), (B): acetonitrila: ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), fluxo de 0,2 ml/min, coluna Waters Acquity C<sub>18</sub>, (2,1 x 5,0 mm, 1,7 µm).

A **Figura 4.2** apresenta o espectro de massas da substância astragalina com tempo de retenção de 14,24 minutos, onde se observa o íon molecular  $m/z$  448,9062  $[M+H]^+$  condizente com sua massa molecular, tendo como pico base o fragmento  $m/z$  286,9182 que representa a perda do glicosídeo  $[M+H -162]$  e quando associado ao íon sódio observa-se o fragmento  $m/z$  470,8879  $[M+Na]$ . Ainda, pode-se destacar como associado a esta molécula, o fragmento  $m/z$  918,7548  $[M + 470]$ . Pela diferença de massa molecular destes fragmentos em relação ao íon molecular foram deduzidas as principais fragmentações.



**Figura 4.2** - Cromatograma UPLC-MS do cultivar amarelo Iolanda. No detalhe espectro de massas da substância com tempo de retenção 14,24 minutos. Fase móvel: (A) água:ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), (B): acetonitrila: ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), fluxo de 0,2 ml/min, coluna Waters Acquity C<sub>18</sub>, (2,1 x 5,0 mm, 1,7 μm).



**Figura 4.3** - Espectro de massas da Astragalina com tempo de retenção 14,24 minutos, obtido por sistema de espectrometria de massas – ionização por spray de elétrons e principais fragmentações.

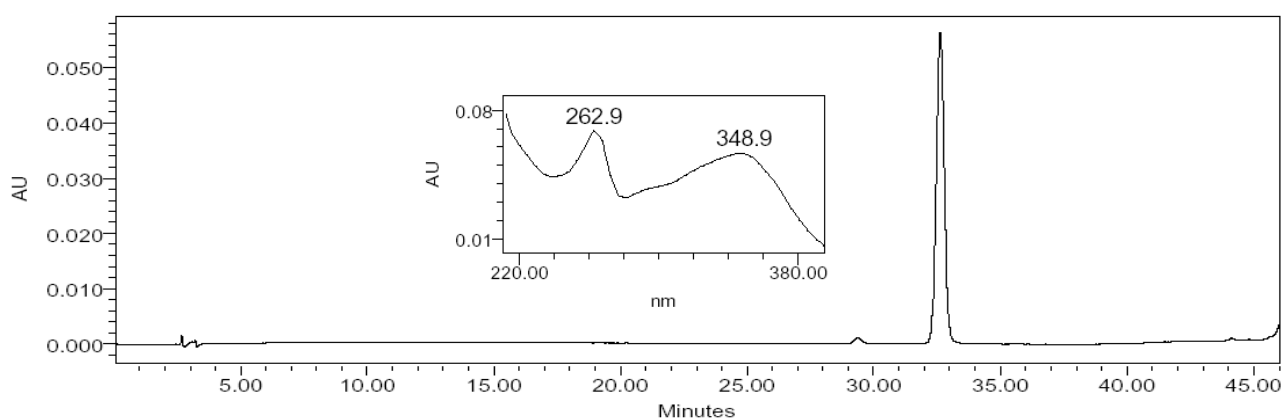
Com base no íon molecular  $m/z$  448,9062  $[M+H]^+$  e fragmentações apresentadas pela substância com tempo de retenção de 14,24 minutos, bem como espectro de ultravioleta com máximos de absorção de 220,14; 265,14 e 347,14 nm, chegou-se a conclusão de que se trata da substância canferol-3-O-glicosídeo, também conhecida como astragalina (**Figura 4.3**). Dados da literatura indicam a presença desta substância no gênero *Phaseolus* (HU *et al.*, 2006). Posteriormente, a identificação foi confirmada por co-eluição com substância referência.

## 5.2 Desenvolvimento e validação do método por CLAE

A validação do método analítico é realizada para garantir que o mesmo gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, e consiste basicamente em definir as condições necessárias e suficientes para a garantia da qualidade dos resultados obtidos durante sua aplicação (LANÇAS, 2004; RIBANI, *et al.*, 2004). Para a validação do método de quantificação de astragalina por CLAE no extrato metanólico de feijão foram utilizados parâmetros preconizados em guias vigentes como a Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2005), Farmacopéia Americana (USP, 2008) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) resolução n° 899 (2003). Conforme a complexidade do método analítico, o analista

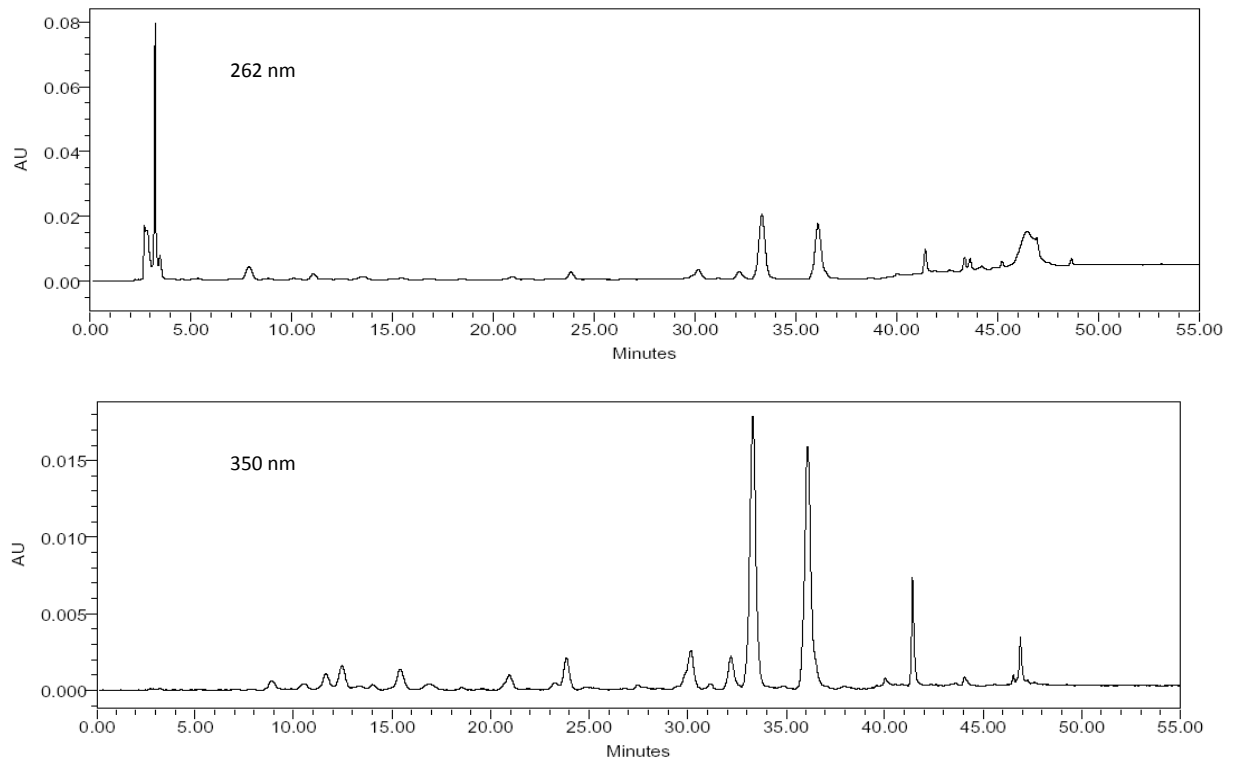
seleciona quais parâmetros específicos devem ser avaliados para assegurar que o mesmo esteja validado.

A astragalina exibiu absorções mínimas e máximas típicas em 262,9 nm e 348,9 nm (HU *et al.*, 2006), e, nas condições experimentais estabelecidas, apresentou tempo de retenção médio de 34 min. A **figura 4.4** apresenta o cromatograma e o espectro de ultravioleta obtido para a substância de referência.



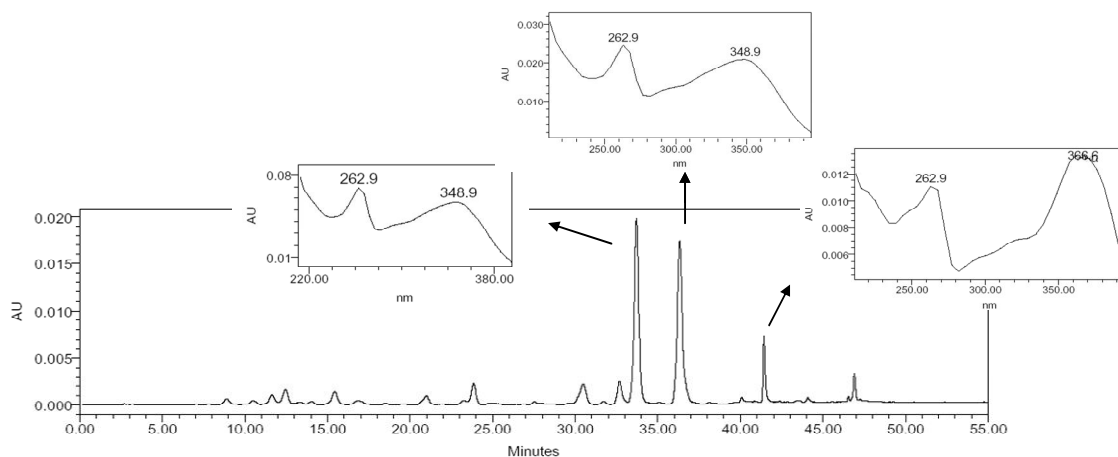
**Figura 4.4** - Perfil cromatográfico da astragalina observado em 350 nm e espectro de ultravioleta acumulado de 210 a 400 nm. Fase móvel: (A) água:ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), (B): acetonitrila: ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), fluxo de 0,8 ml/min, coluna Phenomenex Synergi Fusion C<sub>18</sub>, (150 x 4,6 mm, 4 $\mu$ m).

A **figura 4.5** apresenta o cromatograma obtido para a solução metanólica da amostra no mínimo e máximo de absorção da astragalina (262,9 nm e 348,9 nm). No comprimento de onda máximo de 350 nm observa-se a presença de dois picos majoritários, já em 262 nm é observada a presença dos mesmos picos com intensidade menor, desta forma, para melhor monitoramento da amostra foi selecionado o comprimento de onda de 350 nm para a aquisição dos dados.



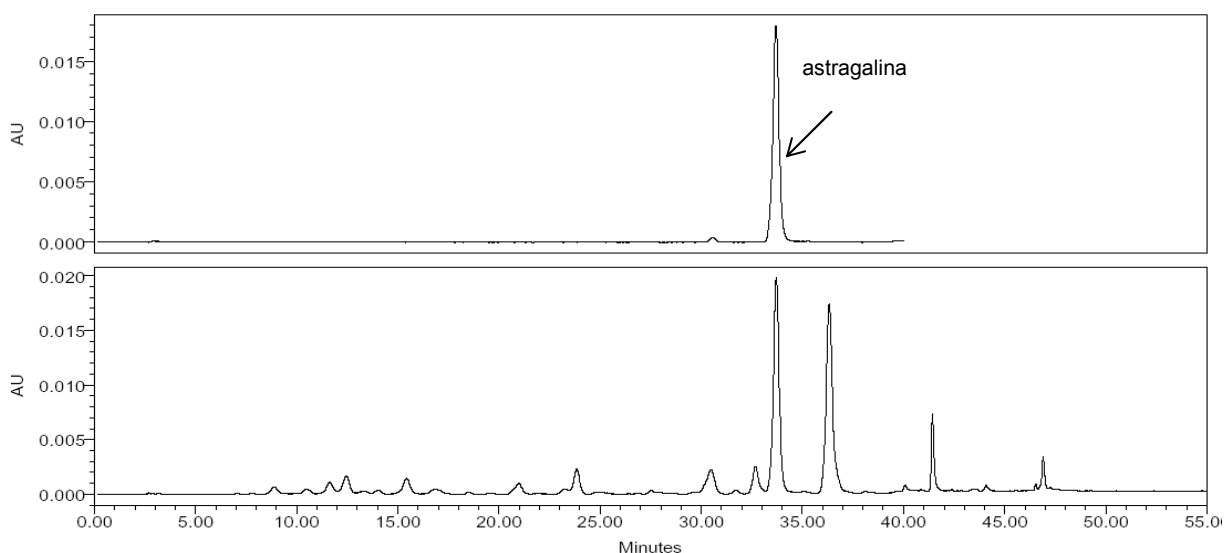
**Figura 4.5** - Cromatogramas da solução metanólica do cultivar TB0224 obtido por CLAE, observado em 262 nm e 350nm. . Fase móvel: (A) água:ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), (B): acetonitrila: ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), fluxo de 0,8 ml/min, coluna Phenomenex Synergi Fusion C18, (150 x 4,6 mm, 4 $\mu$ m).

A **Figura 4.6** mostra o perfil cromatográfico obtido para a solução metanólica da amostra TB 0224, nas condições cromatográficas estabelecidas em 350 nm. Verificou-se a presença de dois picos majoritários, com ultravioletas semelhantes, sendo o pico com tempo de retenção médio de 34,2 minutos correspondente à astragalina.



**Figura 4.6** - Cromatograma da solução metanólica do cultivar TB 0224 obtido por CLAE. No detalhe os espectros de ultravioleta acumulado de 210 a 400 nm. Fase móvel: (A) água:ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), (B): acetonitrila: ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), fluxo de 0,8 ml/min, coluna Phenomenex Synergi Fusion C<sub>18</sub>, (150 x 4,6 mm, 4μm).

A **Figura 4.7** mostra a sobreposição dos cromatogramas da solução metanólica da amostra da solução metanólica da substância de referência astragalina. As substâncias eluem com o mesmo tempo de retenção, confirmando a identidade do pico como visto no espectro de massas (**figura 4.2**).

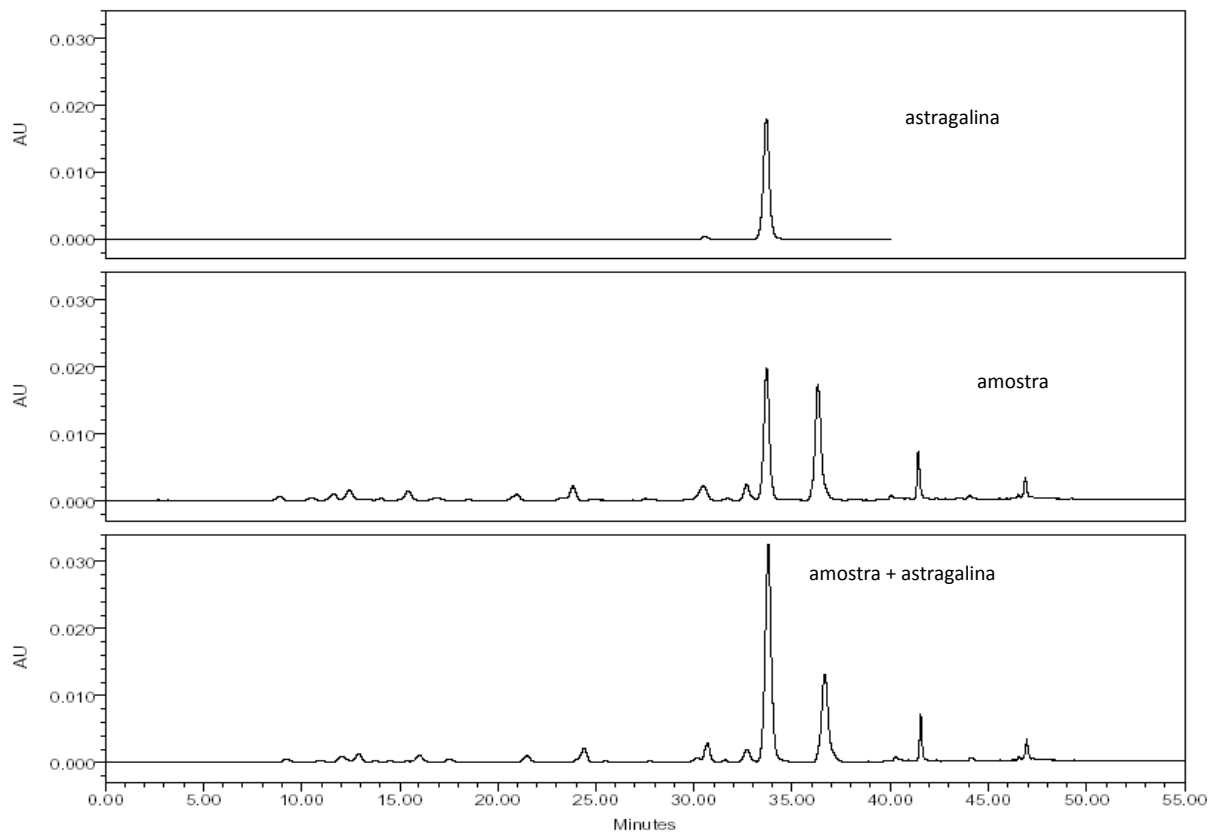


**Figura 4.7** - Sobreposição dos cromatogramas da solução metanólica do cultivar TB 0224 obtido por CLAE e solução metanólica de astragalina. . Fase móvel: (A) água:ácido fórmico (100:0,1%, v/v), (B): acetonitrila: ácido fórmico (100:0,1%, v/v), fluxo de 0,8 ml/min, coluna Phenomenex Synergi Fusion C<sub>18</sub>, (150 x 4,6 mm, 4μm).



### 5.2.1 Especificidade

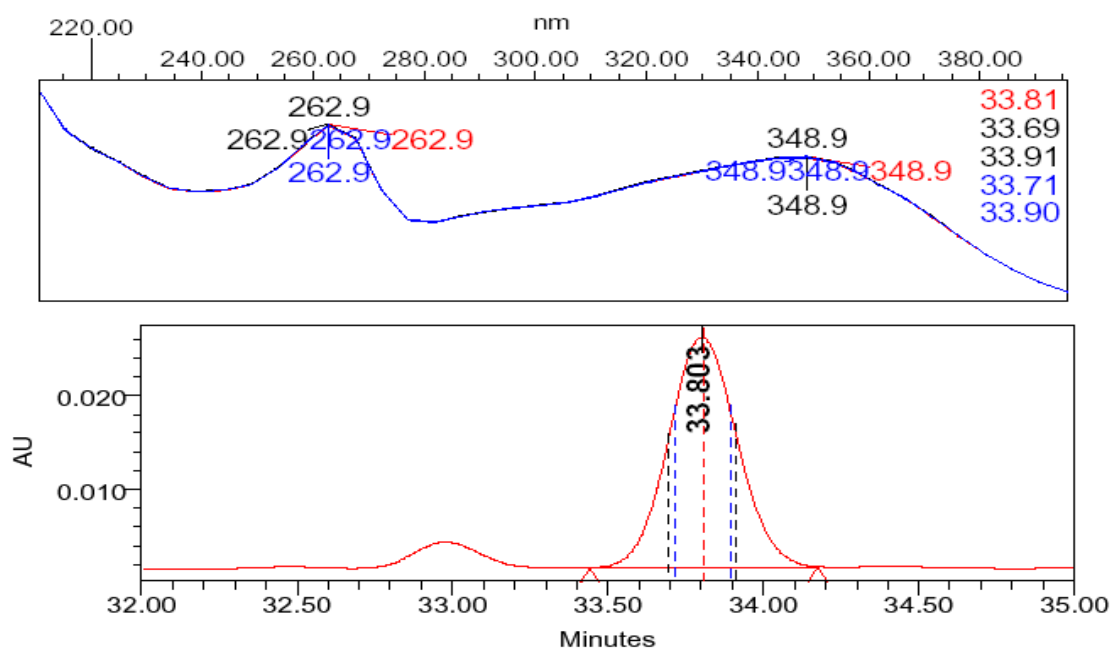
A confirmação da identidade de um composto pode ser avaliada pela co-cromatografia onde se adiciona uma quantidade conhecida da substância de referência na amostra e verifica-se se há aumento do pico de interesse ou se aparece outro pico no cromatograma. No primeiro caso o analista tem uma indicação positiva e a análise merece progredir para uma etapa de confirmação de identidade do pico, no segundo caso se está diante de uma negativa, isto é o composto não é o que se supunha inicialmente (VALENTE, 2001). A **Figura 4.8** mostra a co-injeção da substância de referência astragalina que foi adicionada na solução metanólica da amostra, como pode ser visualizado ocorrem uma perfeita co-eluição da substância de referência adicionada com a substância presente na amostra, não ocorrendo a presença de picos adicionais no cromatograma.



**Figura 4.8** - Co-injeção da substância de referência astragalina com a solução metanólica do cultivar TB 0224. Fase móvel: (A) água:ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), (B): acetonitrila: ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), fluxo de 0,8 ml/min, coluna Phenomenex Synergi Fusion C<sub>18</sub>, (150 x 4,6 mm, 4 $\mu$ m).

O espectro de ultravioleta foi empregado para confirmar a identidade do composto de interesse, porém para que haja confiabilidade é necessário que o comprimento de onda máximo do padrão coincida com o do composto de interesse dentro de 2 nm e que nos demais aspectos do espectro haja coincidência (VALENTE, 2001).

**A Figura 4.9** demonstra a especificidade do método, realizada por fatiamento do pico de interesse na amostra, e comparação dos espectros de ultravioleta. Como pode ser observado, não foi verificada a presença de espectros de ultravioleta diferenciados, confirmando a ausência de substâncias interferentes com cromóforos distintos no pico referente à astragalina. O pico perfeito apresenta pureza 1 ou seja há correlação de 100% nos espectros existentes dentro do pico de interesse (DAVID, 2005). Para o pico da astragalina na solução metanólica de feijão foi obtida uma pureza de 1 (100%).



**Figura 4.9** - Parâmetro especificidade referente à substância astragalina presente na solução metanólica do cultivar TB 0224, obtido por varredura de 210 a 400 nm, em detector de arranjo de fotodiodos. Ampliação da região do pico. . Fase móvel: (A) água:ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), (B): acetonitrila: ácido fórmico (99,9:0,1%, v/v), fluxo de 0,8 ml/min, coluna Phenomenex Synergi Fusion C<sub>18</sub>, (150 x 4,6 mm, 4 $\mu$ m).

## 5.2.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação que deve conter, no mínimo, cinco concentrações no intervalo de 80% a 120%. Sendo necessária a elaboração de um gráfico, elaborou-se então através de métodos estatísticos apropriados a determinação da equação de regressão linear, o coeficiente de correlação e desvio padrão relativo (ICH, 2005; ANVISA, 2003; LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004; USP, 2008).

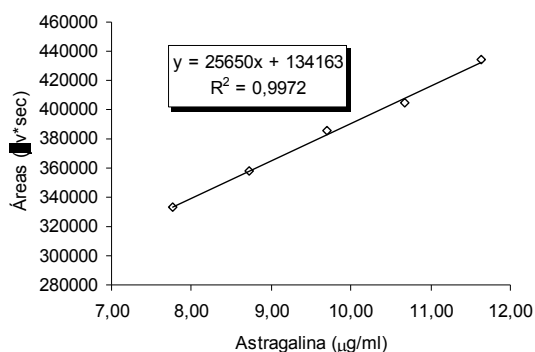
### 5.2.2.1 Linearidade da astragalina

A curva analítica obtida apresentou linearidade no intervalo de concentração de 7,76 a 11,64 µg/ml (**Figura 5.1**). A equação de regressão linear foi  $y = 25650x + x = 134163$  onde corresponde à área da substância de referência e x, a concentração. O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foi 0,9972. Foram realizadas 3 determinações de cada concentração empregada, e determinadas as médias, os desvios padrão e os coeficientes de variação, que foram de 0,13 a 4,31 para as concentrações avaliadas. Na **Tabela 7** estão apresentadas às áreas absolutas dos picos nas concentrações usadas. A avaliação do coeficiente de determinação calculado evidencia um comportamento linear satisfatório na faixa de concentração estabelecida para o trabalho experimental.

**Tabela 7** - Áreas absolutas para a curva analítica da astragalina obtidas por CLAE.

Concentração (µg/ml) <sup>1</sup>	Área (µV*s) (média ± s)	DPR (%)
7,76	332874 ± 14375	4,31
8,73	357875 ± 3769	1,05
9,70	385506 ± 2199	0,57
10,67	403338 ± 540	0,13
11,64	433852 ± 2479	0,57

As áreas representam a média de três determinações.



**Figura 5.1** - Curva analítica da astragalina obtida para a verificação da linearidade do método de CLAE.

A **Tabela 8** apresenta os dados obtidos na aplicação da análise de variância (ANOVA: fator único) com o auxílio do Microsoft Excel<sup>®</sup> (2003) e análise de dados para a curva analítica da substância de referência astragalina.

**Tabela 8** - Análise de variância (ANOVA) fator único para a curva analítica da astragalina.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	$F_{calc}$	$F_{critico}$
Entre grupos	1	3,67E+11	3,67E+11	472,47	5,317
Dentro dos grupos	8	6,21E+09	7,76E+08		
Total	9	3,73E+11			

\* significativo para  $p < 0,05$

A partir dos dados da análise de variância constata-se que a mesma apresenta diferenças significativas entre as concentrações ( $F_{calc}$ : 472,47 e  $F_{crit}$ : 5,317), e desvio da linearidade não significativo ( $r$  múltiplo= 0,9985), ou seja, tem-se 99,85% de correlação entre a concentração e a área obtida.

#### 5.2.2.2 Linearidade da amostra de feijão

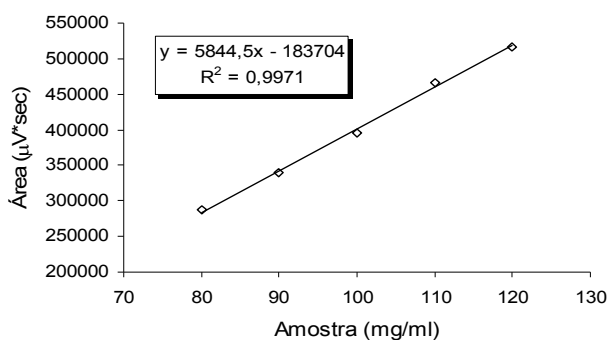
A linearidade de tomada de amostra para o método de CLAE foi verificada por meio da elaboração da curva da amostra de feijão na faixa de concentração de 80 a 120 mg/ml, que corresponde à faixa de 80% a 120% em relação à quantidade de amostra utilizada nos ensaios (100,0 mg/ml). A **Tabela 9** mostra as áreas absolutas obtidas para a curva da amostra de astragalina. A equação da reta obtida por

regressão linear ( $y=5844,5x-183704$ ) e o coeficiente de determinação ( $r^2=0,9971$ ) para a amostra de feijão podem ser visualizados na **Figura 5.2**. A avaliação do coeficiente de determinação calculado com o auxílio do Microsoft Excel® (2003), evidência um comportamento linear satisfatório na faixa de concentração estabelecida para o trabalho experimental. Os resultados obtidos para a curva de linearidade da amostra quando submetidos à análise de regressão linear permite calcular o limite de quantificação da amostra, sendo 10,359  $\mu\text{g/ml}$  a quantidade mínima que se pode utilizar para quantificar a amostra de feijão, empregando-se o método apresentado neste trabalho.

**Tabela 9** - Áreas absolutas da astragalina para a curva da amostra de feijão, obtidas por CLAE.

Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>1</sup>	Área ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ) (média $\pm$ s)	DPR (%)
80	287347 $\pm$ 1026	0,36
90	339186 $\pm$ 6127	1,81
100	395123 $\pm$ 2707	0,69
110	465795 $\pm$ 126	0,03
120	516266 $\pm$ 1628	0,32

<sup>1</sup>As áreas representam à média de três determinações.



**Figura 5.2** - Curva da amostra obtida para a verificação da linearidade da astragalina na amostra obtida por CLAE.

A **Tabela 10** apresenta a análise de variância (ANOVA: fator único) do estudo de linearidade de tomada de amostra feijão. Verificou-se a manutenção da

integridade do pico da astragalina, sendo que os resultados demonstram regressão significativa ( $p < 0,05$ ), ou seja, há diferença entre as concentrações ( $F_{\text{calc}}$ : 93,71 e  $F_{\text{crit}}$ : 5,317) e ausência de desvios de linearidade ( $r$  múltiplo: 0,9985), isto é, tem-se 99,85% de correlação entre a concentração e a área obtida, sendo a extração linear.

**Tabela 10** - Análise de variância (ANOVA) fator único para a curva da amostra de feijão.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	$F_{\text{calc}}$	$F_{\text{crítico}}$
Entre grupos	1	4,012E+13	4,01E+11	93,71	5,317
Dentro dos grupos	8	342E+8	4,28E+09		
Total	9	4,3557E+11			

significativo para  $p < 0,05$

### 5.3 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O LD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada e o LQ representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um procedimento experimental. Podem ser calculados de três maneiras diferentes: método visual (não instrumental), método sinal-ruído e método baseado na curva da substância de referência (ICH, 2005; ANVISA, 2003; LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004; USP, 2008).

A **Tabela 11** mostra os resultados para a análise de regressão da curva analítica de astragalina, obtidos com o auxílio do Microsoft Excel® (2003). Estes dados foram utilizados no cálculo dos limites de quantificação e detecção,

**Tabela 11** - Resultados da análise de regressão da curva analítica da astragalina.

Parâmetros	Coeficiente	Erro padrão	LC inferiores	LC superiores	Valor-P
Inclinação (b)	25649,74	790,37	23134,4	11790959	6,43E-05
Interseção (a)	134163,4	7742,96	109521,82	127935,8	0,00041

Nota: LC = limite de confiança; valor-p = probabilidade

Os resultados dos limites de detecção e quantificação calculados conforme preconizado pelo ICH (2005) e ANVISA (2003) foram LD= 0,9962  $\mu\text{g/ml}$  e LQ= 3,0187  $\mu\text{g/ml}$  indicando que o método analítico para a quantificação de astragalina em solução metanólica de feijão exibe boa sensibilidade.

## 5.4 Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sob condições definidas, e podem ser determinadas em condições de repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Com a finalidade de verificar a precisão do método de doseamento de astragalina por CLAE foram realizados os ensaios de precisão intermediária e repetibilidade (ICH, 2005; ANVISA, 2003; LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004; USP, 2008).

### 5.4.1 Precisão intermediária

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro dos laboratórios devido a eventos como diferentes dias, analistas, equipamentos ou uma combinação destes fatores, a fim de verificar que o mesmo laboratório fornecerá os mesmos resultados (LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004). A **Tabela 12** apresenta os resultados obtidos no ensaio de precisão intermediária para o método de quantificação de astragalina em solução metanólica de feijão.

**Tabela 12** - Resultados do ensaio de precisão intermediária para o método de quantificação do teor de astragalina em amostra de feijão por CLAE.

Parâmetro	n	Área $\pm$ s	astragalina (mg%, m/m)	Média <sub>(intra-dia)</sub> (mg%,m/m) $\pm$ s	DPR % (intra-dia)
Dia 1	1	387140 $\pm$ 913,00	11,069	10,581 $\pm$ 0,484	4,58
	2	365133 $\pm$ 1131,0	10,100		
	3	375866 $\pm$ 4241,0	10,574		
Dia 2	1	367988 $\pm$ 12872	10,217	10,261 $\pm$ 0,226	2,20
	2	374633 $\pm$ 41112	10,505		
	3	364249 $\pm$ 10969	10,060		
Dia 3	1	380990 $\pm$ 811,00	10,796	10,764 $\pm$ 0,089	0,83
	2	381786 $\pm$ 60,000	10,833		
	3	378010 $\pm$ 3952,00	10,663		
		Média <sub>(entre-dias)</sub> (mg%) $\pm$ s: 10,535 $\pm$ 0,254		DPR <sub>(entre-dias)</sub> 2,54	

Cada ponto corresponde a média de três determinações, s: desvio-padrão da amostra, Concentração (%): miligramas de astragalina por 100 g de amostra, DPR: Desvio padrão relativo (%), n: número de réplicas.

Os teores de astragalina obtidos para a amostra de feijão no teste de precisão intermediária foram em média 10,581 mg%, 10,261 mg% e 10,764 mg% nos três dias de análise. Os baixos desvios relativos (DPR%) obtidos demonstram que o método apresenta apropriada precisão, e também mostra uma irrelevante variabilidade dos ensaios em três dias diferentes.

## 5.5 Repetibilidade

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuado sob as mesmas condições de medição, tais como mesmos procedimentos, analistas, instrumentos, local e operador, em um curto intervalo de tempo (ICH, 2005; ANVISA, 2003; LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004; USP, 2008). O termo mais utilizado para descrever a precisão de um conjunto



de repetições de dados é o desvio-padrão relativo (DPR%). Normalmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um DPR de 1 a 2% e em métodos de análise de traços ou impurezas são aceitos DPR de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (LANÇAS, 2004; RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão do método foi verificada por seis determinações da amostra de feijão em um mesmo dia, contemplando o intervalo linear de 100% do método de extração (100 mg/ml). O teor médio de astragalina obtido para o ensaio de repetibilidade foi de  $10,375 \pm 0,294$  mg% e DPR (%) de 2,84, cujo valor encontra-se dentro do limite estabelecido de 5%, demonstrando que o método apresenta adequada precisão.

## 5.6 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como valor verdadeiro. A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, sendo estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços. O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretrizes adotadas e também com as características da pesquisa. A ANVISA (2003) e ICH (2005) estabelecem que no mínimo nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração devem ser obedecidas. Frequentemente é expresso como percentagem de recuperação (%), que é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (LANÇAS, 2004, RIBANI *et al.*, 2004; USP, 2008).

Os resultados obtidos para o parâmetro exatidão referentes à substância astragalina em amostra de feijão estão apresentados na **Tabela 13**.

**Tabela 13** - Resultados do ensaio de exatidão para a substância astragalina em amostra de feijão obtido por CLAE.

	Concentração experimental ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentração teórica determinada ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentração astragalina adicionada ( $\mu\text{g/ml}$ )	Teor recuperado (%)	Teor recuperado Médio (%) $\pm$ s	DPR (%)
SB1	10,079					
S1	14,291	4,211	4,00	102,1	108,04 $\pm$ 5,696	5,27
S2	16,793	6,713	6,00	108,5		
S3	19,439	9,439	8,00	113,48		

SB: solução branco sem adição de astragalina, S1, S2, S3: soluções adicionadas de concentrações crescentes da substância de referência astragalina.

O resultado obtido para o parâmetro exatidão apresentou recuperação média de 108,04%, demonstrando que o método desenvolvido apresenta exatidão satisfatória. Estes valores se encontram dentro dos valores aceitos, os quais devem estar dentro da faixa de 70 a 120% (ANVISA, 2003, RIBANI *et al.*, 2004, LANÇAS, 2004).

## 5.7 Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta em não ser afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros. Em CLAE a robustez pode ser avaliada com a modificação de certos parâmetros tais como pH, fluxo, percentagem da fase orgânica da fase móvel, alteração de temperatura da coluna ou lote (ICH, 2005; ANVISA, 2003; LANÇAS, 2004, RIBANI *et al.*, 2004; USP, 2008).

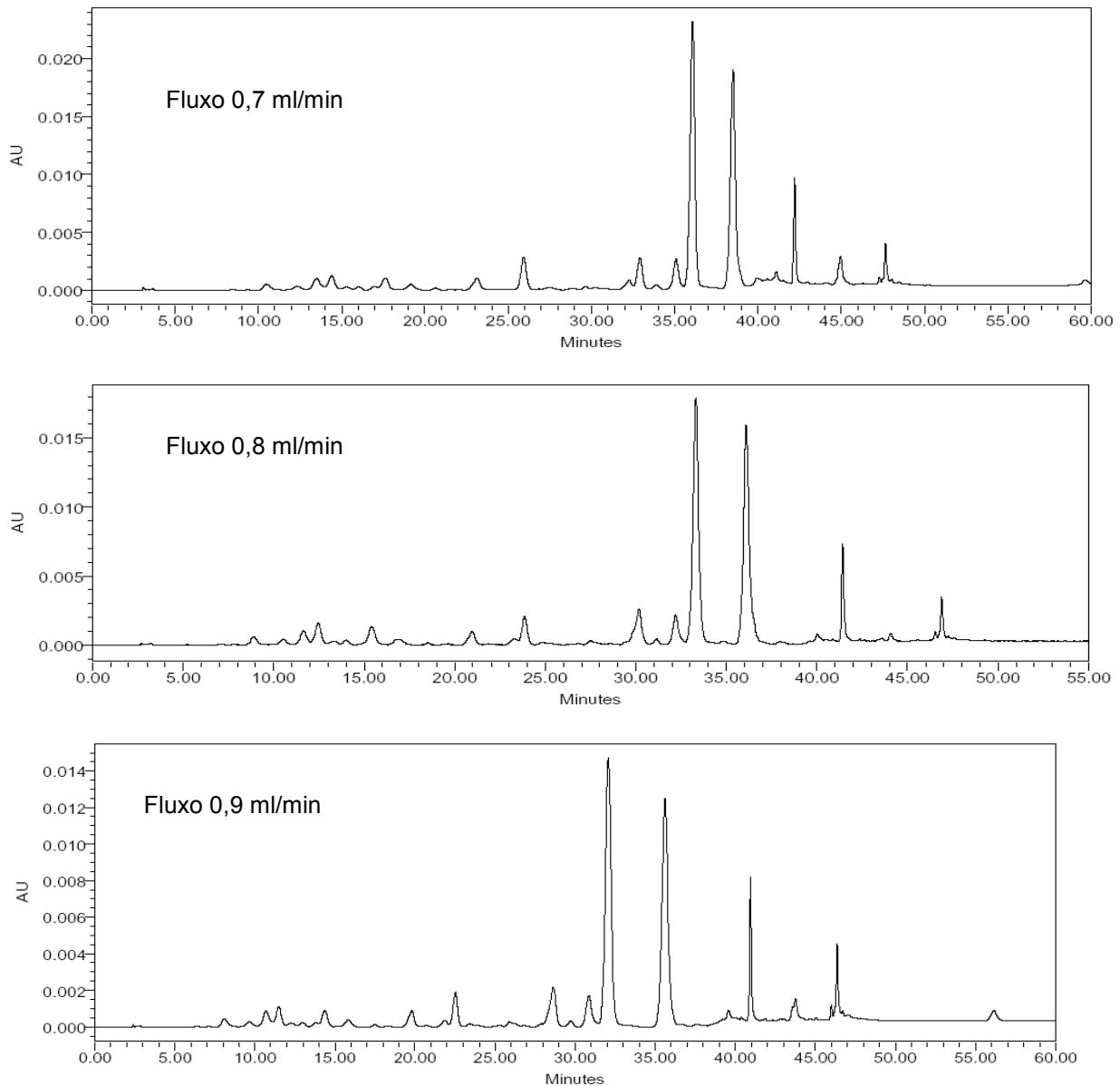
A robustez do método foi avaliada através do parâmetro variação do fluxo da fase móvel (em nível baixo e alto), troca de coluna e fase móvel. Na modificação de cada parâmetro, verificou-se a resolução entre os picos de interesse. O efeito do parâmetro fluxo foi observado sobre a resolução do pico de interesse, os resultados encontrados estão apresentados na **Tabela 14**.

**Tabela 14.** Robustez: parâmetro variação de fluxo para o método de avaliação da resolução

Parâmetro fluxo (ml/min)	Tempo de retenção médio	Área média	resolução
0,7	31,7	350988	0,61
0,8	34,0	376043	1,54
0,9	36,0	443112	0,95

Fluxo de 0,8 ml/min: condição normal de análise; nível baixo: 0,7 ml/min; nível alto: 0,9 ml/min; l.

A **Figura 5.3** mostra os cromatogramas obtidos no ensaio de robustez para o parâmetro variação de fluxo em nível acima e abaixo. Os resultados demonstram que a alteração de fluxo não afeta a resolução do pico de interesse, ocorrendo apenas uma variação no tempo de retenção do pico de interesse.



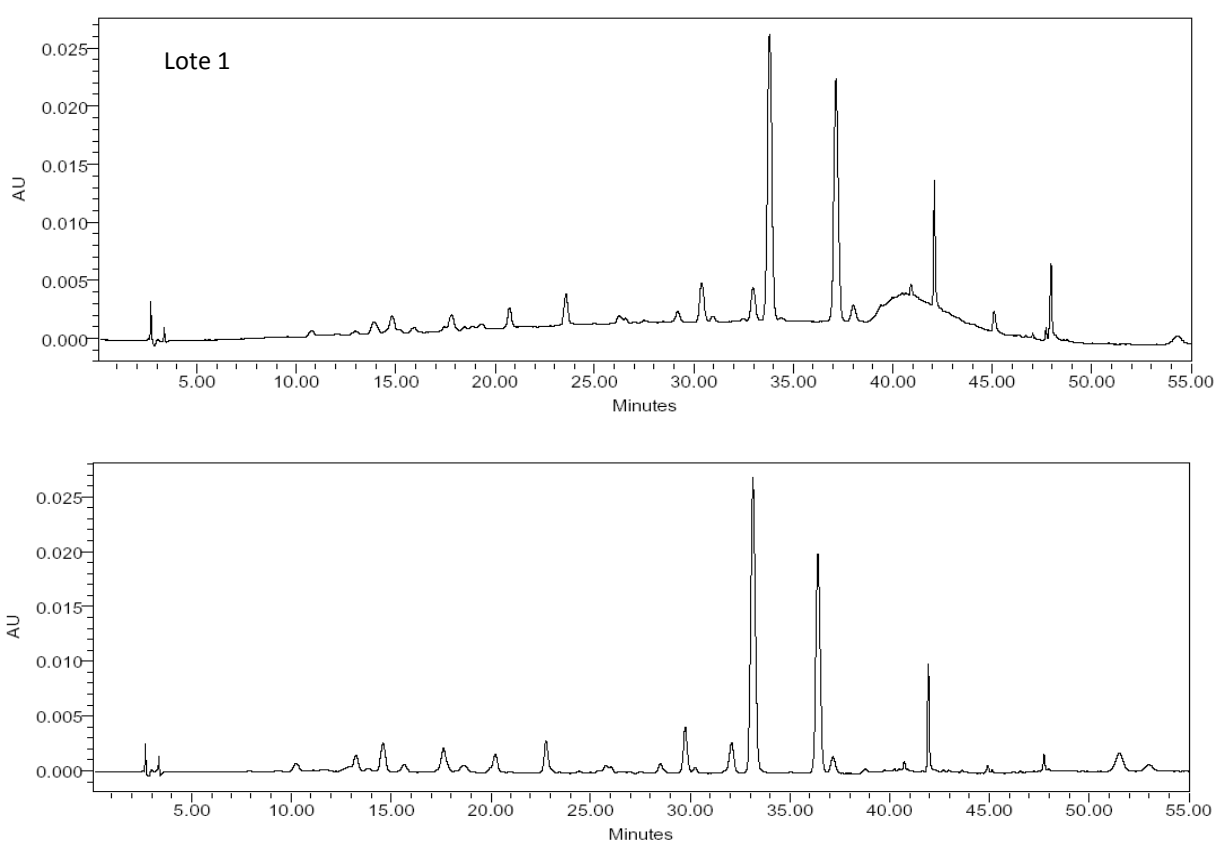
**Figura 5.3** - Cromatogramas do ensaio de robustez. Parâmetro troca de fluxo.

O efeito do parâmetro troca de lote da coluna Phenomenex Synergi Fusion, também foi observado quanto à resolução do pico de interesse. Os resultados demonstram que a alteração de coluna não afeta a resolução do pico de interesse, conforme verificado na **tabela 15** e **figura 5.4**.

**Tabela 15.** Robustez: troca de lote de coluna.

Parâmetro coluna	Tempo de retenção médio	Área média	Resolução
Lote 1	33,08	373037 ± 2996	1,14
Lote 2	33,15	415490 ± 992,0	0,90

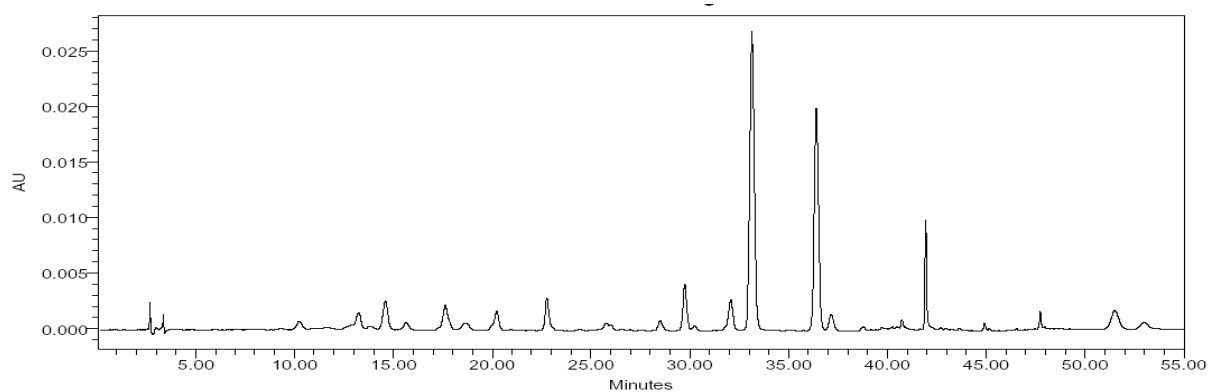
Fluxo de 0,8 ml/min. Coluna Phenomenex Synergi fusion C<sub>18</sub> (150 X 4,6 mm, 4 μm).



**Figura 5.4** - Cromatogramas da solução metanólica do cultivar TB 0224 no ensaio robustez com colunas de lotes diferentes. Lote 1: coluna de trabalho, Lote 2: coluna utilizada de rotina no laboratório.

O último parâmetro testado para a robustez foi a troca da fase móvel (**item 4.6**) por fase A: água: TFA (100%:0,05) e fase B: acetonitrila (100%), utilizando o mesmo gradiente linear e sendo verificado a resolução do pico. A **figura 5.5** apresenta o cromatograma obtido para robustez troca de fase móvel. Como pode

ser observado o cromatograma apresentou o mesmo perfil cromatográfico, o tempo de retenção médio obtido foi 33,15 min, área 415490 e Rs: 0,90.



**Figura 5.5** - Cromatograma da solução metanólica do cultivar TB 0224 no ensaio robustez com troca de fase móvel.

## 5.8 Teor de astragalina nos cultivares de feijão

A **tabela 16** apresenta os teores quantificados de astragalina nos cultivares analisados. Os cromatogramas obtidos para todos os cultivares analisados por CLAE estão apresentados no anexo.

**Tabela 16** - Teor de astragalina nos cultivares de feijão analisados.

<b>Anexo*</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Cor</b>	<b>Astragalina (mg%)</b>
Figura A1	Mouro Tavares 187	Roxo	0,216
Figura A2	Mato Grosso	Preto	0,799
Figura A3	Roxo Redondo	Roxo	0,209
Figura A4	Amarelo Iolanda	Amarelo	3,791
Figura A5	BRS Expedito	Preto	0,142
Figura A6	Am 5	Preto	0,015
Figura A7	Guapo Brilhante	Preto	0,216
Figura A8	Minuano	Preto	0,100
Figura A9	Preto Ibérico	Preto	0,061
Figura A10	Guabiju Brilhante	Preto	0,079
Figura A11	Macanudo	Preto	0,897
Figura A12	Macotaço	Preto	0,076
Figura A13	Rosinha Precoce	Amarelo Claro	2,581
Figura A14	Carioca	Bege	0,058
Figura A15	Biriva 264	Roxo	0,221
Figura A16	TB 0211	Preto	10,632
Figura A17	03 FPJ CF 29-1	Preto	0,134
Figura A18	FT Nobre	Preto	11,550
Figura A19	BRS Valente	Preto	0,094
Figura A20	TB 0202	Preto	0,165
Figura A21	TB 0203	Preto	0,665
Figura A22	TB 0204	Preto	
Figura A23	TB 0207	Preto	0,059
Figura A24	TB 0210	Preto	0,045
Figura A25	TB 0212	Preto	0,294
Figura A26	TB 0213	Bege	2,423
Figura A27	TB 0220	Preto	5,000
Figura A28	TB 0221	Preto	0,032
Figura A29	TB 0222	Preto	3,791
Figura A30	TB 0223	Preto	0,070
Figura A31	TB 0225	Preto	0,015
Figura A32	TB 0226	Amarelo	11,550
Figura A33	TB 0301	Preto	0,015
Figura A34	TB 0302	Preto	0,048

Figura A35	TB 0303	Preto	0,067
Figura A36	TB 0305	Preto	2,581
Figura A37	TB 0306	Preto	0,015
Figura A38	TB 0307	Vermelho	0,043
Figura A39	TB 0309	Chocolate	0,392
Figura A40	TB 0310	Vermelho	0,068
Figura A41	TB 9820	Preto	0,027
Figura A42	TB 0304	Bege	0,015
Figura A43	TB 0201	Preto	0,025
Figura A44	TB 0219	Preto	0,128
Figura A45	TB 0308	Preto	0,058
Figura A46	TB 0224	Vermelho	10,632
Figura A47	Iraí	Creme	0,024

\* o cromatograma está apresentado em anexo.

Presente em grande quantidade de vegetais, os compostos fenólicos são associados como mediadores químicos entre as plantas e microorganismos. Entre estes compostos, os flavonóides são os de maior interesse, pois estão relacionados a diversas funções como proteção, resistência a diversos tipos de estresse, fixação de nitrogênio entre outros (FILHO, 2004).

A cor da casca das sementes de feijão sugere a presença de compostos fenólicos presentes. Estudo com 4 diferentes cores de sementes de feijão, através da técnica de HPLC/MS, demonstrou que o maior teor de astragalina foi observado nas sementes de coloração não preta (HU *et al.*, 2006).

A distribuição de compostos fenólicos foi bastante variável, aonde os cultivares de cor, apresentaram um teor maior em comparação as sementes pretas. Neste estudo os cultivares com cor TB 0224 (10.632 mg/100g), TB0226 (11.550 mg/100g), TB 0309 (5.000 mg/100g), Rosinha Precoce (2.581 mg/100g) e Amarelo lolanda (3,791mg/100g), foram os que mais apresentaram teor de astragalina.

Trabalho realizado por Beninger e Hosfield 1998, demonstrou um alto nível de glicosídeos de canferol (108mg/100g de feijão) de cor amarelo/creme indicando que os flavonóides presentes podem ser os responsáveis por transmitir a cor para as cascas das sementes. Os cultivares que apresentaram maior quantidade de astragalina: Amarelo lolanda, Rosinha Precoce e TB 0226 são de cor amarelo/creme, o que corrobora o que já foi descrito na literatura.



A ocorrência de compostos fenólicos podem ter um efeito sobre a aparência pós-colheita, durante o armazenamento e na conservação do feijão (MARLES *et al.*, 2010). Estudos sobre cultura de feijoeiro demonstraram que cerca de 2% do peso do feijão pode ser atribuído aos flavonóides (LUTHRIA & PASTOR-CORRALES, 2006 ; OOMAH *et al.*, 2010). Estes estudos juntamente com os resultados encontrados nos cultivares TB 0224, TB0226, TB 0309, Rosinha Precoce e Amarelo Iolanda, demonstram que a cor da casca está associada à quantidade de compostos fenólicos, e é de fundamental importância na qualidade das sementes.



## **6 DISCUSSÃO GERAL**



Compostos fenólicos presentes em vegetais tem sido associados a inúmeros benefícios não só para o desenvolvimento da planta, mas também à saúde humana. Dentre estes compostos presentes nas plantas, destacam-se os flavonóides. Isto se deve às atividades atribuídas aos mesmos, como antioxidante e antiinflamatória (OOMAH *et al*, 2010), além de efeitos pró bióticos (MAROTTI *et al*, 2007).

Plantas da família das Leguminosas são de grande interesse para a humanidade destacando-se o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Devido à grande importância econômica e seus benefícios à saúde e além de ser um dos alimentos mais consumidos no mundo, o feijão necessita cada vez mais de estudos e pesquisas que venham contribuir para a garantia da sua qualidade, desde o plantio até o seu consumo.

No Brasil e no estado do Rio Grande do Sul, o feijão constitui um dos principais alimentos presentes na dieta. Considerando os inúmeros benefícios à saúde atribuídos aos compostos fenólicos presentes nos feijões, torna-se cada vez mais imprescindível a pesquisa e o estudo aprofundados sobre o mesmo e a sua composição química.

Em nosso estudo, comparamos o perfil químico de 47 diferentes cultivares de feijão recomendados para plantio, quanto ao teor de astragalina. A substância canferol 3-O-glicosídeo conhecida como astragalina presente no gênero *Phaseolus*, tem sua atividade associada à coloração das sementes (BENINGER e HOSFIELD, 2003) e atividades biológicas, como efeito antioxidante (CORREIA *et al*, 2006).

Estudos científicos envolvendo este composto e seus benefícios atribuídos à planta e à saúde ainda são escassos. Sendo assim, com intuito de obter resultados confiáveis quanto ao teor de astragalina em cultivares de *Phaseolus vulgaris* L., a validação do método analítico por CLAE mostrou-se justificada em seus propósitos.

Assim, esta dissertação objetivou desenvolver um método analítico adequado para determinar a quantidade de astragalina em diferentes cultivares de feijão, muitos deles já utilizados para plantio no Brasil.

Para a quantificação de uma substância, diversas técnicas cromatográficas são utilizadas para auxiliar na identificação. A CLAE, em geral, é o método mais utilizado atualmente, devido à acessibilidade, ao uso que não é limitado pela estabilidade ou volatilidade dos compostos químicos e pela possibilidade de acoplar outros métodos de análise que permitam pronta identificação do constituinte desejado.

Alguns parâmetros podem ser variados visando obter-se bons resultados nas análises cromatográficas, como tipos de colunas, detectores e solventes. Órgãos internacionais como o ICH (2005) e a Farmacopéia Americana (USP 2008) são os responsáveis pela normatização de parâmetros analíticos. No Brasil, a RDC n. 899 (BRASIL, 2003) regulamenta este procedimento. Após a seleção dos parâmetros adequados, o método foi validado conforme os métodos preconizados na literatura e regulamentados pelos órgãos vigentes.

O estudo deste trabalho demonstrou que a diferença na quantidade de astragalina entre as cores das sementes dos cultivares de *Phaseolus vulgaris* L., são muitas e que a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência foi eficaz em demonstrar isso. Comparando o perfil químico quanto ao teor de astragalina, observou-se que a maior quantidade deste composto está presente nos cultivares TB 0224, Amarelo Iolanda, Rosinha Precoce, TB 0226 e TB 0309 sendo que todas as sementes são de cor não preta, respectivamente. Contribuindo para este estudo, encontram-se na literatura os relatos científicos que são fundamentais na identificação da astragalina. Para o gênero *Phaseolus*, Hu e colaboradores (2006) citam o flavonol astragalina como o responsável pela cor nas sementes de feijão.

Os cultivares de cor preta apresentaram uma diferença muito significativa na quantidade de astragalina em relação aos cultivares de cor não preta. Sabe-se que o feijão preto é o mais consumido devido suas características organolépticas. Porém, como demonstrado em nosso estudo, possuem um baixo teor de astragalina.

O consumo de feijões com teores elevados de astragalina poderia auxiliar no controle de doenças. Neste sentido, é cada vez mais importante a busca por resultados confiáveis em estudos visando o perfil químico de feijões. Em nosso estudo, a validação do método analítico seguiu todos os parâmetros preconizados

na literatura, demonstrando ser um método confiável e contribuindo para futuros estudos, tanto no teor de compostos fenólicos quanto no melhoramento genético de sementes.

A quantidade de astragalina encontrada nos cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. está de acordo com estudos encontrados na literatura. Maiores discussões sobre a importância deste metabólito identificado nesta espécie devem aguardar estudos posteriores.

A busca pela qualidade de vida é uma tendência mundial, e por isso a exigência de alimentos de boa qualidade é crescente. O feijão é o alimento mais consumido pela população brasileira, e inúmeros benefícios à saúde são atribuídos a esta leguminosa. Os resultados encontrados e a validação do método desenvolvido neste estudo contribuem para futuros estudos, como o melhoramento genético visando o conhecimento de genes que controlam a formação dos compostos fenólicos em cultivares de *Phaseolus vulgaris* L.





## **7 CONCLUSÃO**



- Utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência, foi validado o método para a análise de astragalina em soluções extrativas de *Phaseolus vulgaris* L. O método demonstrou ser linear, sensível, específico, preciso, exato e robusto.
- A avaliação do teor de astragalina verificada por CLAE nos diferentes cultivares apresentou médias maiores nos cultivares TB 0226, TB 0309, TB 0213, TB 0224, Rosinha Precoce e Amarelo Iolanda.
- As maiores concentrações de astragalina, foram encontradas em sementes de cor não preta, conforme dados já encontrados na literatura.
- O teor de perda por dessecação utilizando o método gravimétrico ficou entre 5,16% e 11,83% entre os diferentes cultivares de feijão.
- Pode-se perceber que as distinções químicas entre os cultivares de feijão são diferentes, sendo que a cor da semente determina a quantidade de compostos fenólicos presentes.



**REFERÊNCIAS**



APARICIO-FERNANDEZ, X.; YOUSEF, G.G.; LOARCA-PINHA, G.; GONZÁLEZ de MEJÍA, E.; LILA, M.A.; Characterization of polyphenolics in the seed coat of Black Jamapa beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *Journal Agric. Food Chem.* v.53, p. 4615-4622, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil.* 02 jun. 2003.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F.; COSTA, C.G.; GUIMARÃES, E.F.; LIMA, H.C. Sistemática de Angiospermas do Brasil, v.2, Impre. Univ. Viçosa, p.15, 1991.

BENINGER, C. W.; HOSFIELD, G. L.; NAIR, M. G. Flavonol glycosides from the seed coat of a new Manteca type dry bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* v. 46, p. 2906-2910, 1998.

BENINGER, C. W.; HOSFIELD, G. L. Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus Vulgaris* L. seed coat color genotypes. *J. Agric. Food Chem.* v. 51, p.7879-7883, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria da Vigilância Sanitária, ANVISA. Resolução n. 48, de 16 de março de 2004. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil.* 18 de março de 2004a.

CALIXTO, J.B. Medicamentos fitoterápicos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. *Plantas Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna.* Chapecó; Agros, 2001a. 500p.

CALIXTO, J.B. Medicamentos fitoterápicos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. *Plantas Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna.* Chapecó; Agros, 2001b. 500p

CARDADOR-MARTÍNEZ, A.; LOARCA-PIÑA, G.; OOMAHN, B.D. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journ. Agric. Food Chem.* v.50, p. 6975-6980, 2002.

CORREA, H.A.; GONZALES-PARAMÁS, M.T.; AMARAL, C.; SANTOS, B.; BATISTA, M.T. Polyphenolic Profile Characterization of *Agrimonia eupatoria* L. by HPLC With Different Detection Devices. *Biomed. Chromato*, v.20, p. 88-94, 2006.

DAVID, G.W. *Pharmaceutical analysis.* A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists, 2ª Ed, 2005, p.267-314.

De OLIVEIRA, M. S. G. Estudo Fitoquímico e Avaliação Antinociceptiva e Anti-inflamatória de *Erythrina mulungu* (Fabaceae). 2009. 168 f. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2009.

DINELLI, G.; BONETTI, A.; MINELLI, M.; MAROTTI, I.; CATIZONE, P.; MAZZANTI, A. Content Flavonols in Italian Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Ecotypes. *Food Chem.*, v.99, p. 105-114, 2006.

- DUARTE, J.B.; ZIMMERMANN, M.J. de O. Adaptabilidade e estabilidade de rendimento de genótipos de feijoeiro comum. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.29, n.1, p. 25-32, jan. 1994.
- DURANTI, M. Grain legume proteins and nutraceutical proprieties. *Fitoterapia*, v. 97, p. 67-82, 2006.
- DUTRA, V. F.; GARCIA, f. C. P.; de LIMA, H. C.; de QUEIROS, L. P. Diversidade florística de Leguminosae Adans. em áreas de campos rupestres. *Megadiversidade*, v. 4, n. 1-2, p. 117-125, 2008.
- ESTRELLA, M.; CABEZAS, F. J.; AEDO, C.; VELAYOS, M. The Papilionoideae (Leguminosae) of Equatorial Guinea (Annobón, Bioko and Río Muni). *Folia Geobotanica*, v. 45, p. 1–57, 2010.
- FARIAS, M.R 2003. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais In: Simões, C.M.O. *et al.*, (Org.) 2003. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. Universidade - UFRGS/ Ed. da UFSC.
- Farmacopéia Brasileira 2010. 5.ed. São Paulo: Atheneu, v.1
- FILHO, P.A.C.S. *Estudo químico e biológico de Lupinus lanatus benthan (Leguminosae - Fabaoideae)*. Porto Alegre: Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ UFRGS, 2004, Dissertação (Mestrado). 75p.
- GONZÁLES de MEJÍA, E.; VALDEZ-VEJA, M.C.; REYNOSO-CAMACHO, R.; LOARCA-PIÑA, G. Tannins, trypsin inhibitors and lectin cytotoxicity in tepary (*Phaseolus acutifolius*) and common (*Phaseolus vulgaris* L.) beans. *Plant Foods Human Nutr.* v.60, p. 137-145, 2005.
- HANGEN, L. and BENNINK, M.R. Consumption of Black Beans and Navy Beans (*Phaseolus vulgaris*) Reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats. *Nutr.Cancer*, v. 44. p.60-65, 2002.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA-IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: janeiro de 2011.
- ICH. International Conference on Harmonization. Validation of analytical procedures: Methodology. Q2B. 1996. 8 p. Disponível na Internet no endereço <http://www.ich.org/>. Acesso em janeiro/2011.
- ISENGARD, H.D.; SCHULTHEIB, D.; RADOVIC, B.; ANKLAM, E. Alternatives to official analytical methods used for the water determination in honey. *Food Control*, v.12, p. 459-466, 2001.
- JOLY, A.B. Botânica – Introdução a Taxonomia Vegetal. 4ª ed, Editora Nacional, São Paulo, p. 371. 1977.



LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I.; MENEZES, E. W.; ARAUJO, R. S.; AGUSTÍNRAVA, C.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. de O. Cultura do feijoeiro comum no Brasil. Piracicaba: *Potafos*. p.71-99, 1996.

LANÇAS, F.M. Validação de métodos cromatográficos de análise. São Carlos: RIMA, 2004.

LAPARRA, J.M.; GLAHN, R.P.; MILLER, D.D. Bioaccessibility of Phenols in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Iron (Fe) availability to Caco-2 Cells. *J. Agric. Food Chem*, v. 56, p.10999–11005, 2008.

LATANZIO, V.; KROON, P.; QUIDEAU, S.; TREUTER, D. Plant Phenolics-Secondary Metabolites With Diverse Functions. *Blackwell Publishing LTD*. v.1, p. 1-35, 2008.

LIÃO, M.L.; CHORZE, R.; CAVALCANTE, A.P.P.; SANTOS, C.S.; FERRI, H.P.; FERREIRA, G.A. Perfil Químico de Cultivares de Feijão (*Phaseolus vulgaris*) Pela Técnica de High Resolution Magic Spinning (HR-MAS). *Quim. Nova*, v. 33, n.3, p.634-638, 2010.

LIN, L.Z., HAMLY, J.M., PASTOR-CORRALES, M.S., LUTHRIA, D.L. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, v.107 (1): p.399-410, 2008.

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

McCLURE, J.W. Physiology and functions of flavonoids. In. HARBONE, J.B.MABRY, T.J.; MABRY, H. *The Flavonoids*. New York: Academic Press, 1975. Part 2. 970-1055.

MARCHAND, L.L. Cancer preventive effects of flavonoids: a review. *Biomed. Pharmacother.*, v. 56, p. 296-301, 2002.

MARKHAM, K.R. Flavones, Flavonols and their Glycosides. In. DEY, P.M.; HARBONE, J.B. *Methods in Plant Biochemistry*. London: Academic Press, 1989. P. 197-236.

MARLES, M.A.; BALASUBRAMANIAN, P.; BETT, K.E. Differential accumulation of polyphenolics in black bean genotypes grown in four environments. *J. Agric Food Chem.*, v.58, p.7001-7006, 2010.

MAROTTI, I.; BONETTI, A.; BIAVATI, B.; CATIZONE, P.; DINELLI, G. Biotransformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flavonoid glycosides by *bifidobacterium* species from human intestinal origin. *J. Agric. Food. Chem*, v.55, p. 3013-3019, 2007.

NAMIKI, M. Antioxidants and antimutagens in food. *Food Sci. Nut.*, v. 29, p. 273-300, 1990.

OOMAH, D.B.; CORBÉ, A.; BALASUBRAMANIAN, P. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Hulls. *J.Agric. Food. Chem.* v.58, p.8225-8230, 2010.

REIS, I. P.; MARTINS da SILVA, R. C. V. Levantamento, no herbário IAN, das Papilionoideae (Leguminosae) ocorrentes no estado do Pará. VI Seminário de Iniciação Científica da UFRA e XII Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA Amazônia Oriental, 2008

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G; COLLINS, C.H.; JARDINS, I.C.S.F; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, *Quim.Nova*, v.27, n.5, p. 771-780, 2004.

SANG, S.; HOU, Z.; LAMBERT, J.D; YANG, G. Redox properties of tea polyphenols and related biological activities. *Redox Signal*, v.7, p.1707-1714, 2005.

SETCHELL, K.D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *American Journal Clinical of Nutrition*, Bethesda, v.134, n.6, p.1333S-1343S, 1998.

SOARES, A. G. Consumo e qualidade nutritiva. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, Goiânia. Anais... Goiânia: UFGO, 1996. v. 2, p. 73-79.

SORENSEN, R.L., BRELJE, T.C., ROTH, C. Effect of tyrosine kinase inhibitors on islet of Langerhans: evidence for tyrosine kinases in the regulation of insulin secretion. *Endocrinology*, Baltimore, v.134, n.4, p.1975-1978, 1994.

SPENCER, J.P.E. The impact of flavonoids on memory: physiological and molecular considerations. *Chem. Soc. Rev*, v.38, p. 1152-1161, 2009.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Method Validation. In: *Analytical Method Development and Validation*. Nova Iorque: Marcel Dekker, 1997.

TAKEOKA, G. R.; DAO, L. T.; FULL, G. H.; WONG, R. Y.; HARDEN, L. E.; EDWARDS, R. H.; BERRIOS, J. J. Characterization of black bean (*Phaseolus Vulgaris*) anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, v.45, p. 3395-3400, 1997.

USP. *The United States Pharmacopeia*. NF25. 31 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2008.

VALENTE, L. M. S. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. *Inst. Adolfo Lutz*, vol. 60, n. 1, p. 79-84, 2001.

WU, X.L.; BEECHER, G.R.; HOLDEN, J.M.; HAYTOWITZ, D.B.; GEBHARDT, S.E.; PRIOR, R.L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J.Agric. Food Chem.* v.52. p. 4026-4037, 2004.

YANG, C.S.; WANG, X.; LU, X.; PICINICH, S.C. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanism and human relevance. *Nat. Rev. Cancer*, v.9, p. 429-439, 2009.

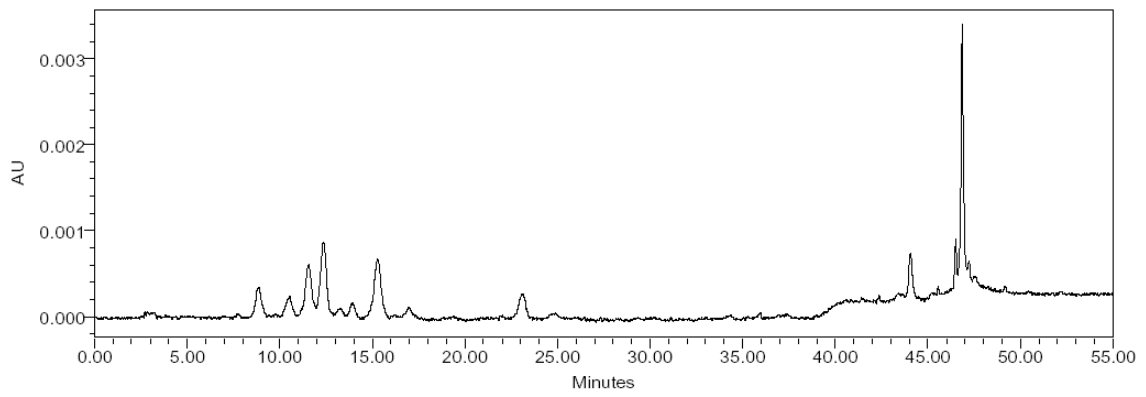
HU, Y.; VHENG, Z.; HELLER, L.; KRASNOF, S.B.; GLAHN, R.; WELCH, R. Kaempferol in Red and Pinto Bean Seed (*Phaseolus vulgaris* L.) coats inhibits Iron Bioavailability Using in Vitro Digestion/Human Caco-2 Cell Model, *J.Agric.Food. Chem.*, v.54, p. 954-961, 2006.

ZUANAZZI, J. A. S; MONTANHA, J. A. O *et al.* *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS Editora/Editora da UFSC, 2007. P. 577-614.

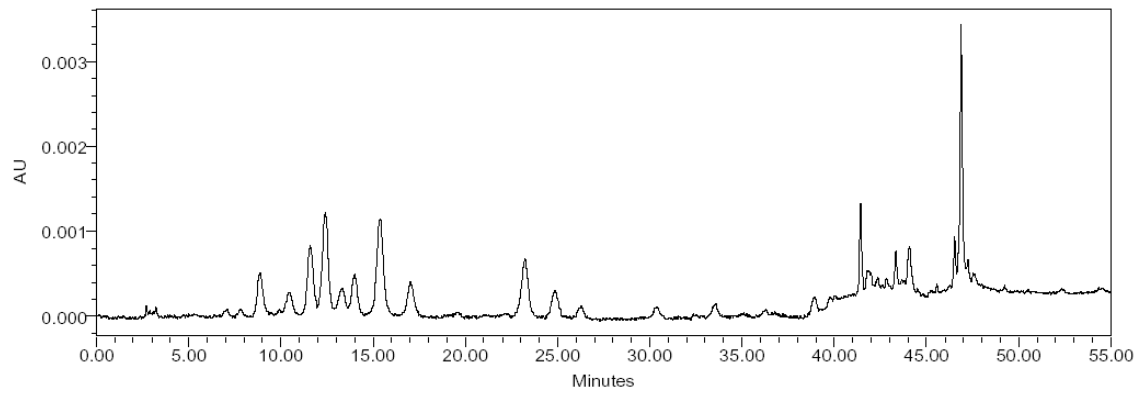


**ANEXOS**

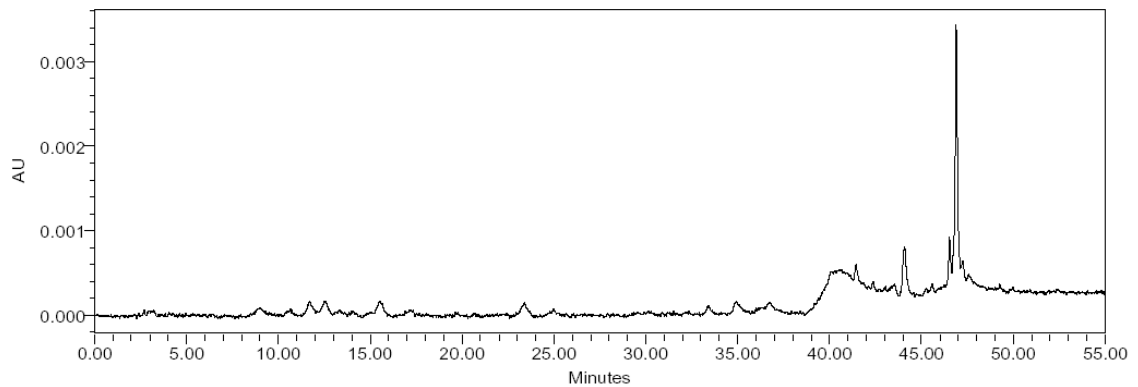




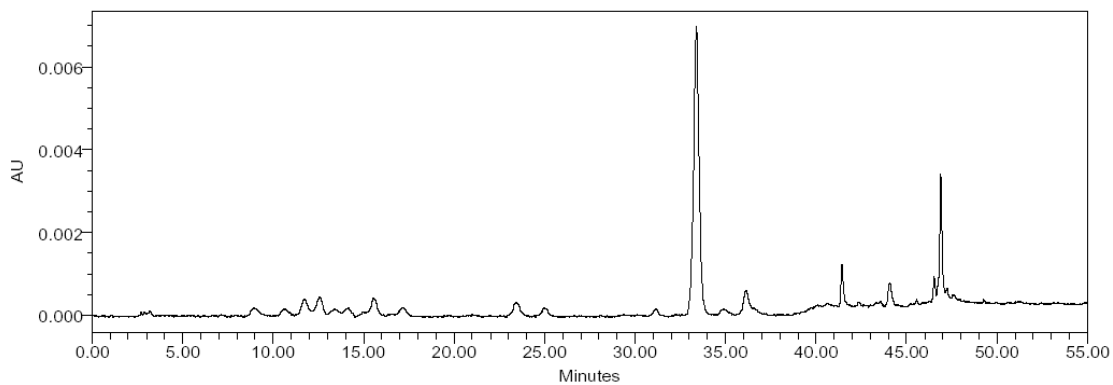
**FIGURA A1** Cromatograma obtido para o cultivar Mouro Tavares 187.



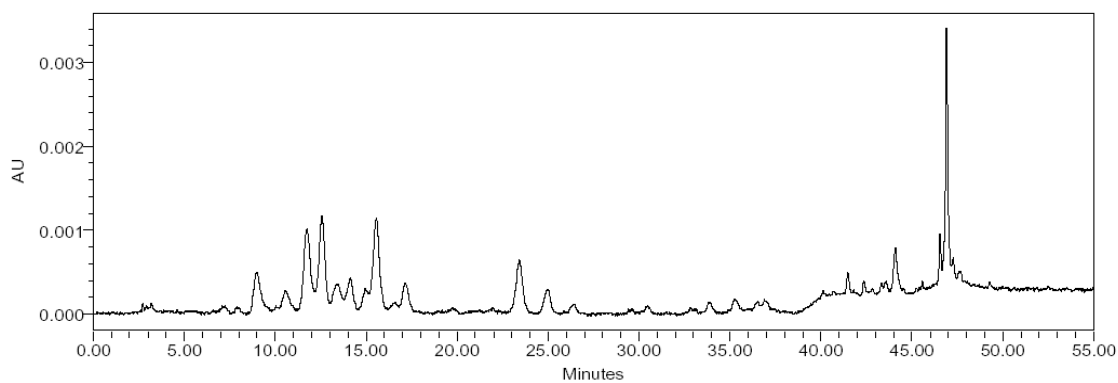
**FIGURA A2** Cromatograma obtido para o cultivar Mato Grosso.



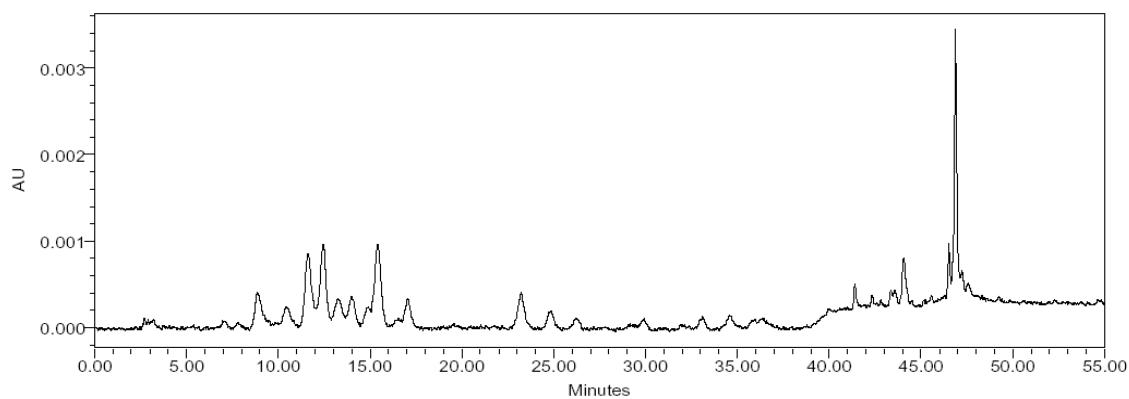
**FIGURA A3** Cromatograma obtido para o cultivar Roxo Redondo.



**FIGURA A 4** Cromatograma obtido para o cultivar Amarelo Iolanda

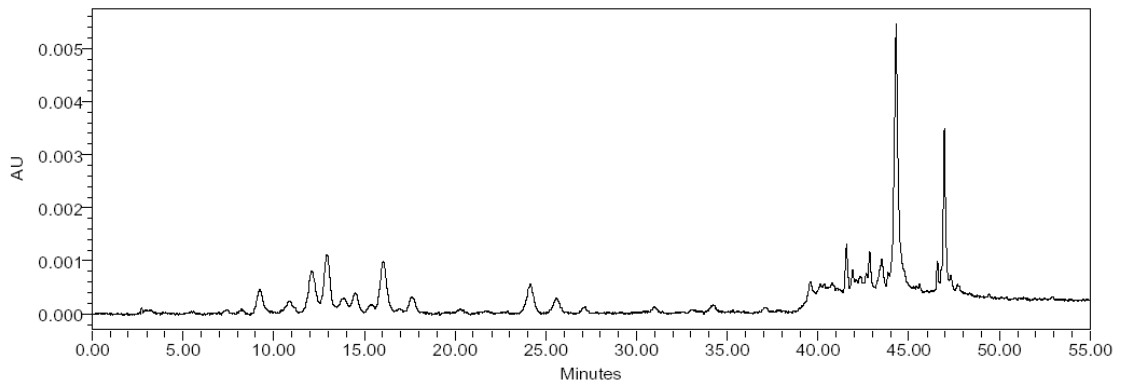


**FIGURA A5** Cromatograma obtido para o cultivar BRS Expedito.

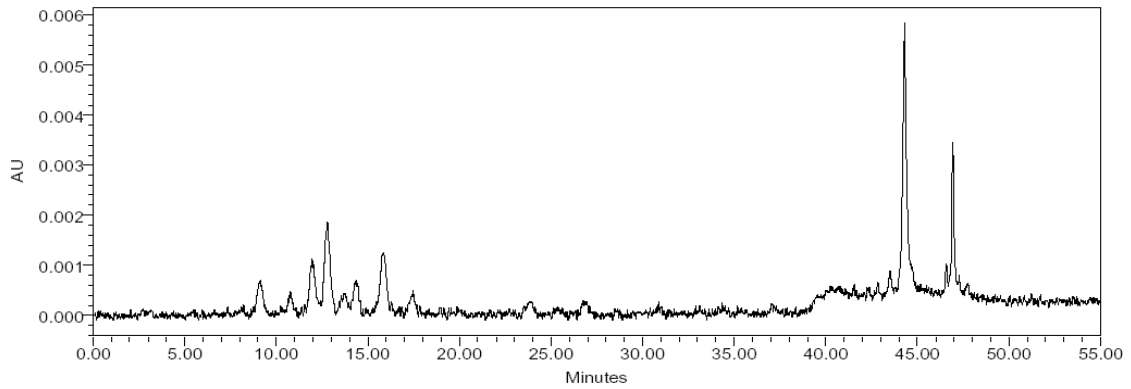


**FIGURA A6** Cromatograma obtido para o cultivar Am 5.

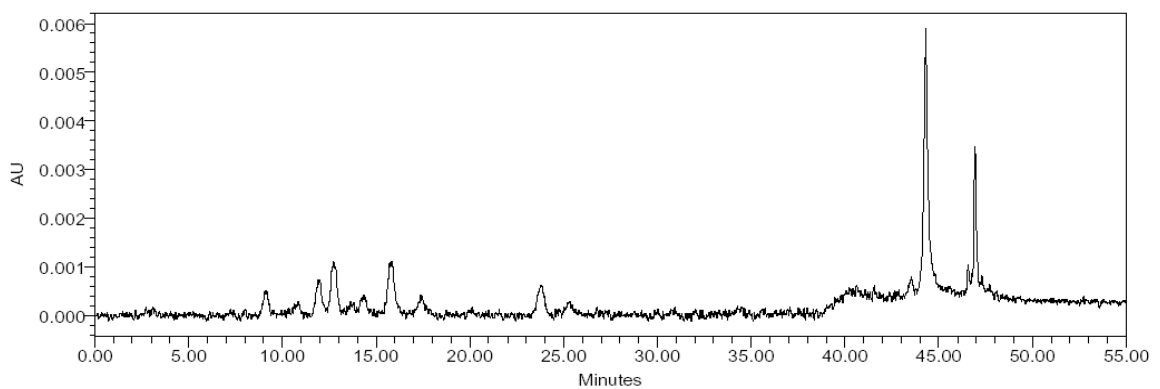




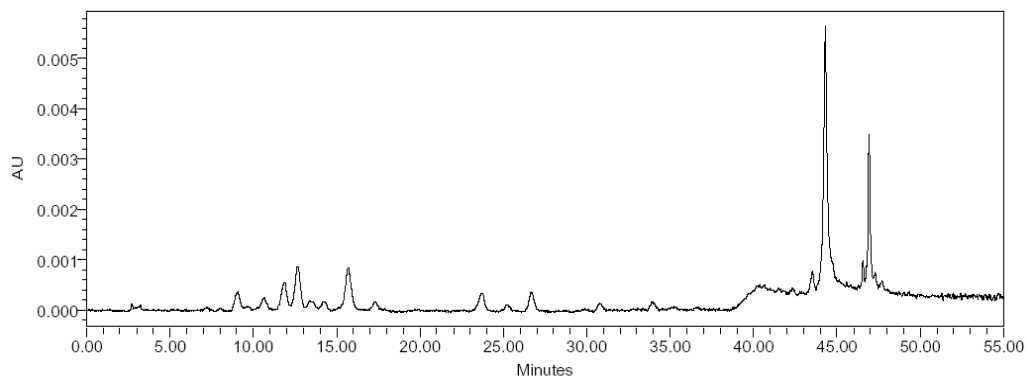
**FIGURA A7** Cromatograma obtido para o cultivar Guapo Brilhante.



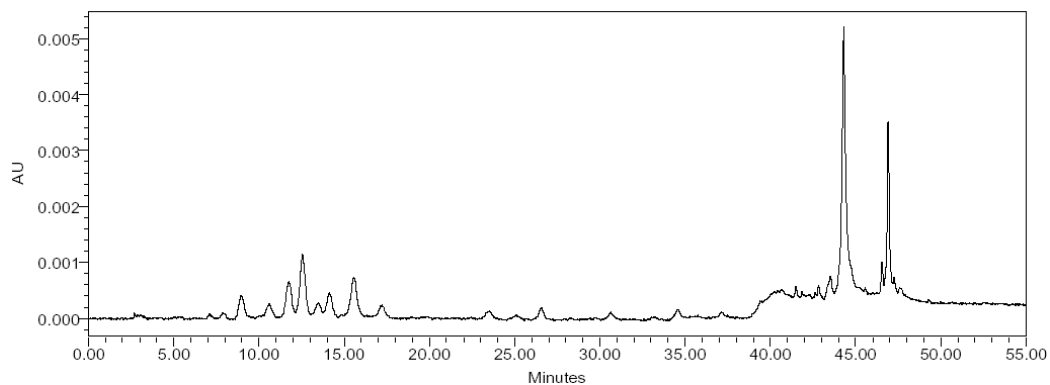
**FIGURA A8** Cromatograma obtido para o cultivar Minuano.



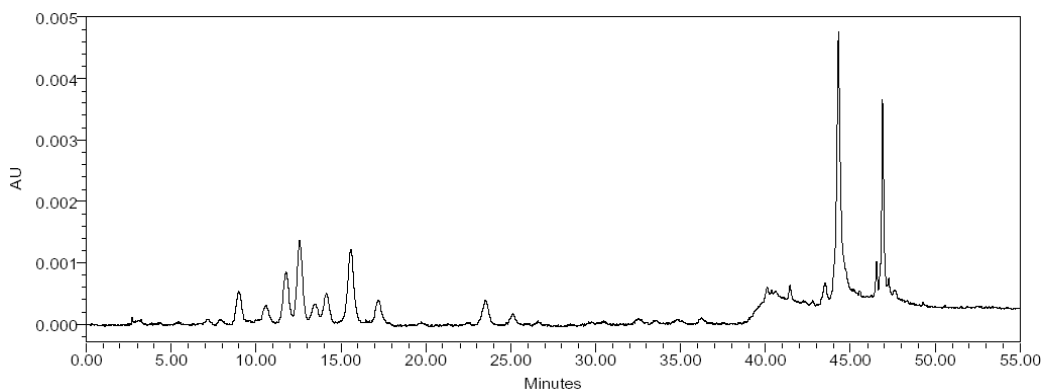
**FIGURA A9** Cromatograma obtido para o cultivar Preto Ibérico.



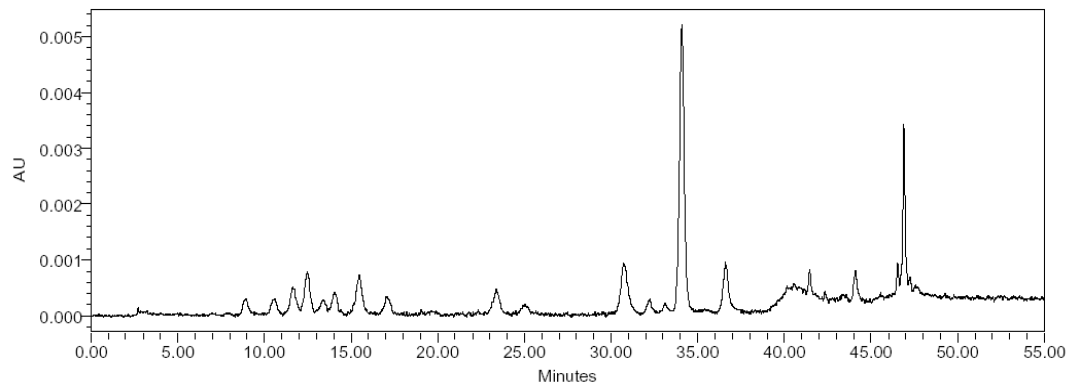
**FIGURA A10** Cromatograma obtido para o cultivar Guabiju Brilhante.



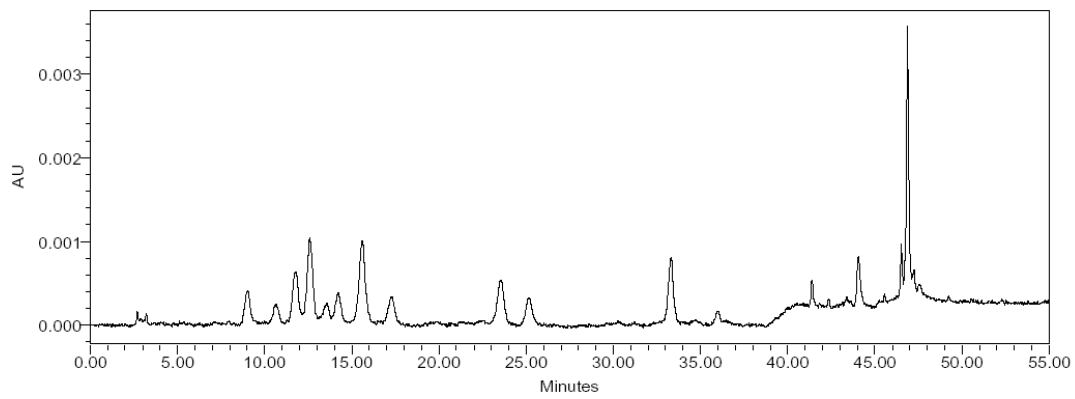
**FIGURA A11** Cromatograma obtido para o cultivar Macanudo.



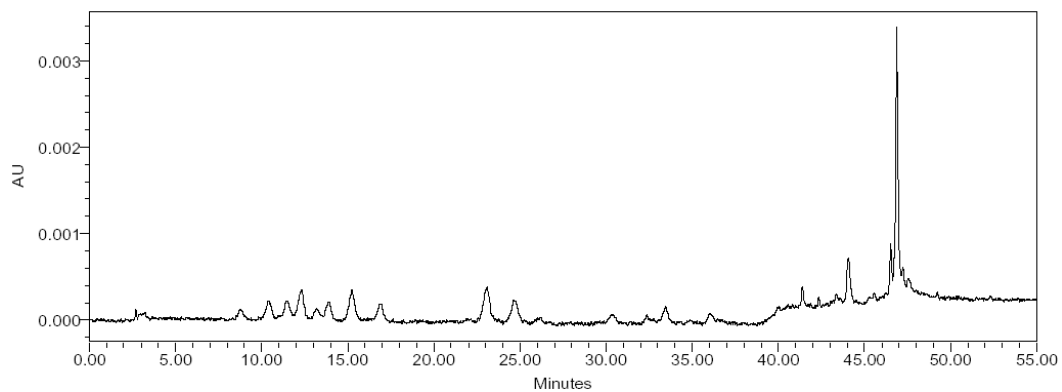
**FIGURA A12** Cromatograma obtido para o cultivar Macotaço.



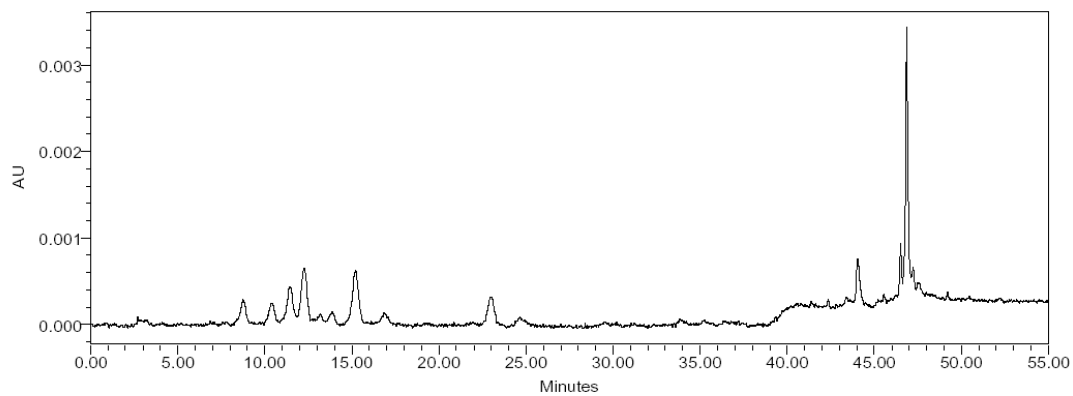
**FIGURA A13** Cromatograma obtido para o cultivar Rosinha Precoce.



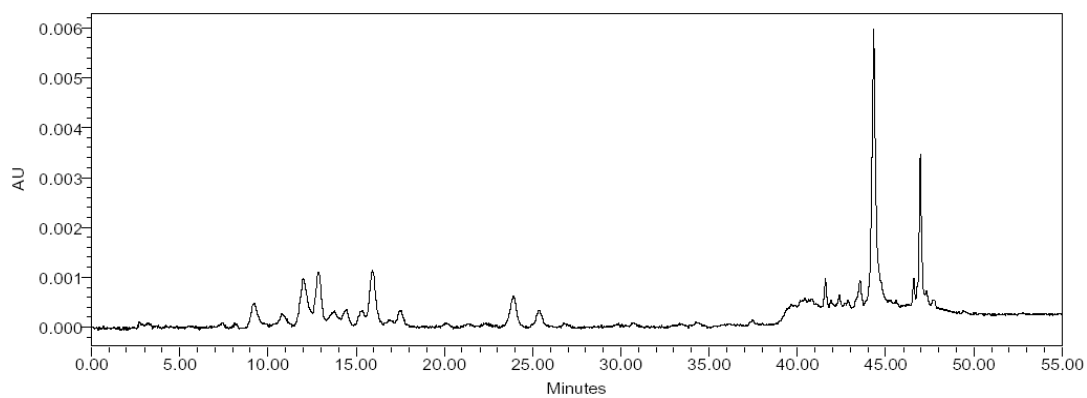
**FIGURA A14** Cromatograma obtido para o cultivar Carioca.



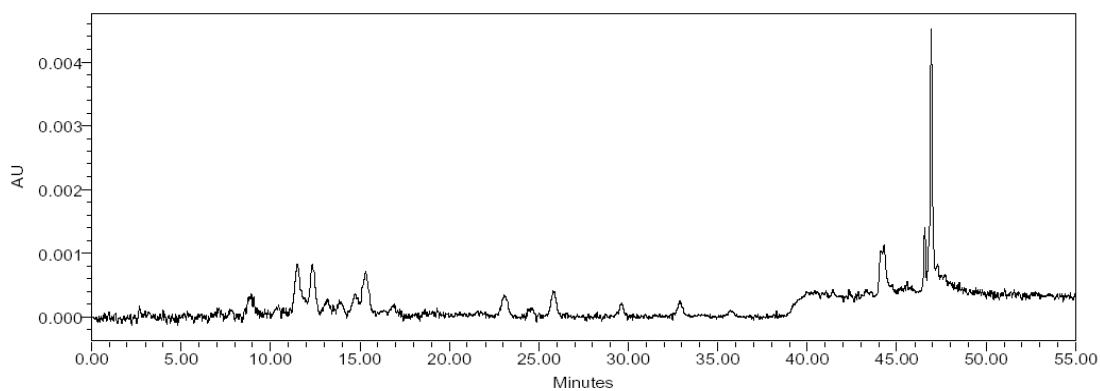
**FIGURA A15** Cromatograma obtido para o cultivar Biriva 264.



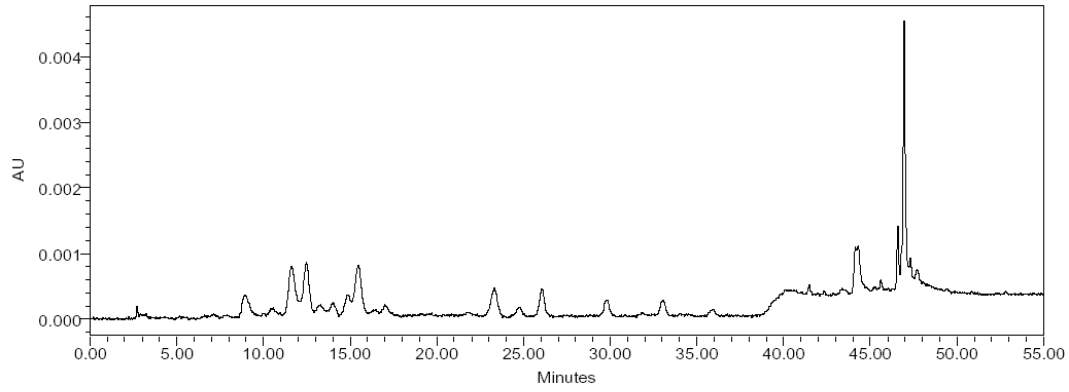
**FIGURA A16** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0211.



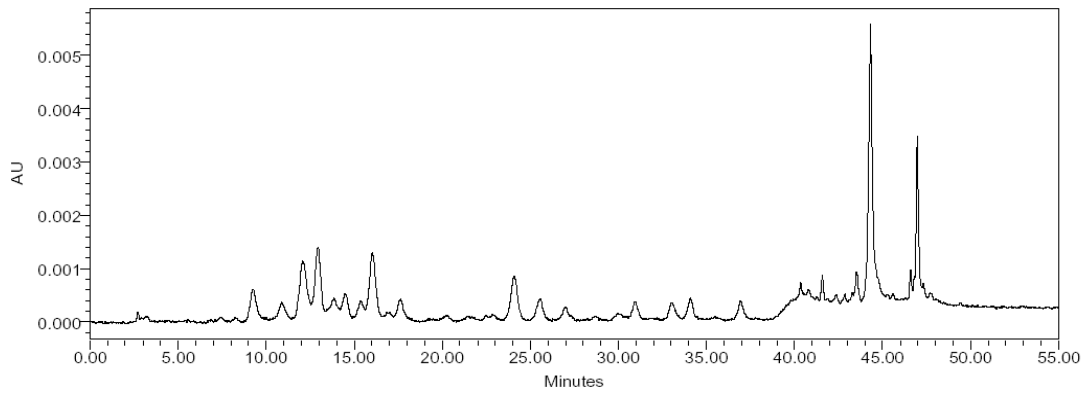
**FIGURA A17** Cromatograma obtido para o cultivar 03 FPJ.



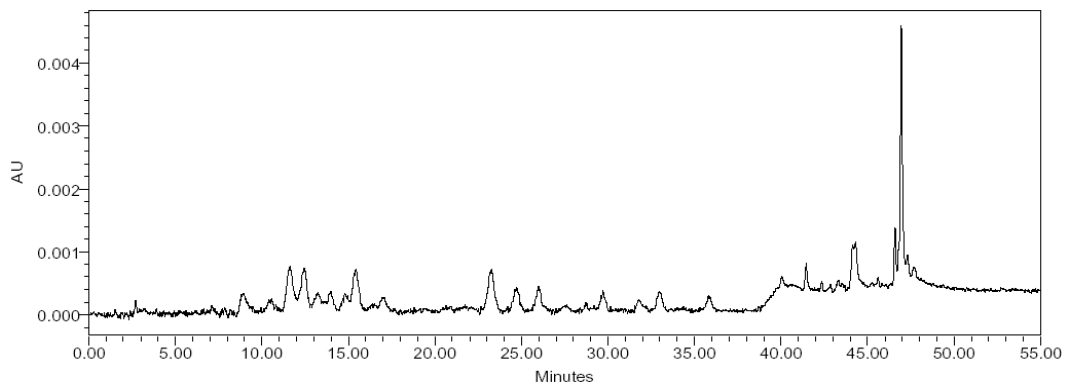
**FIGURA A18** Cromatograma obtido para o cultivar FT Nobre.



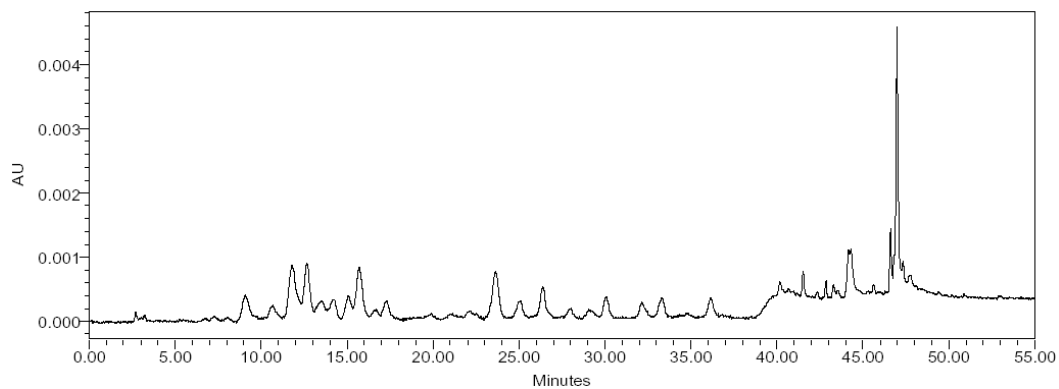
**FIGURA A19** Cromatograma obtido para o cultivar BRS Valente.



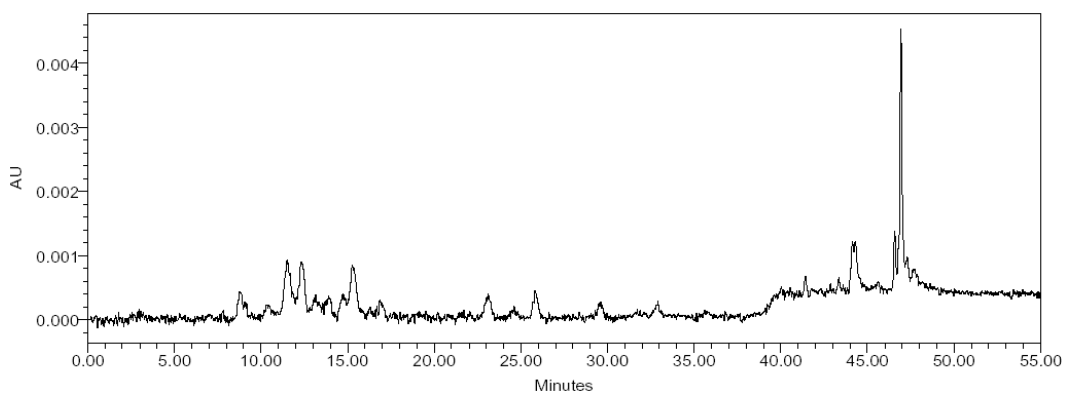
**FIGURA A20** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0202.



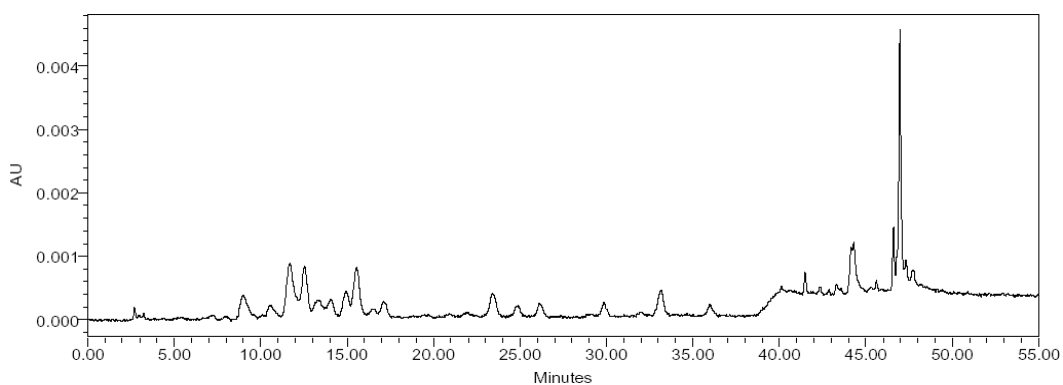
**FIGURA A21** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0203.



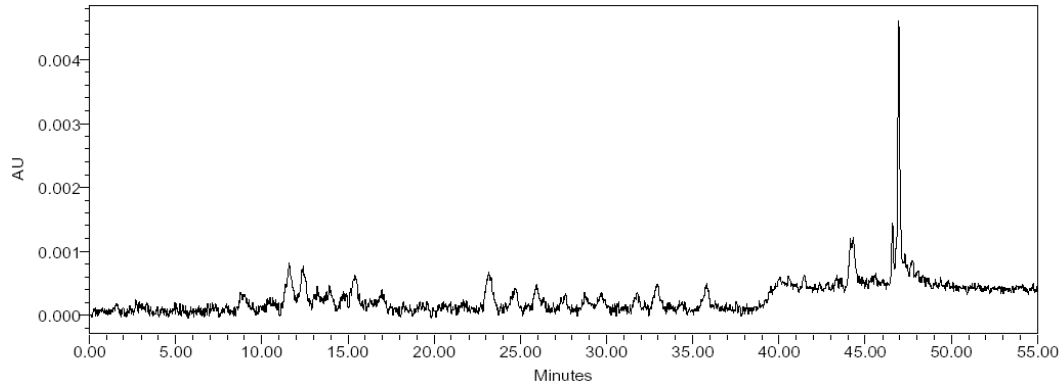
**FIGURA A22** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0204.



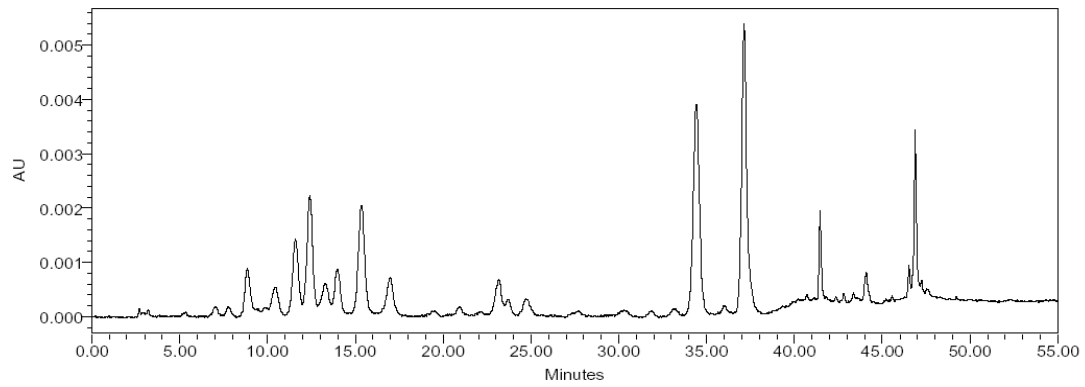
**FIGURA A23** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0207.



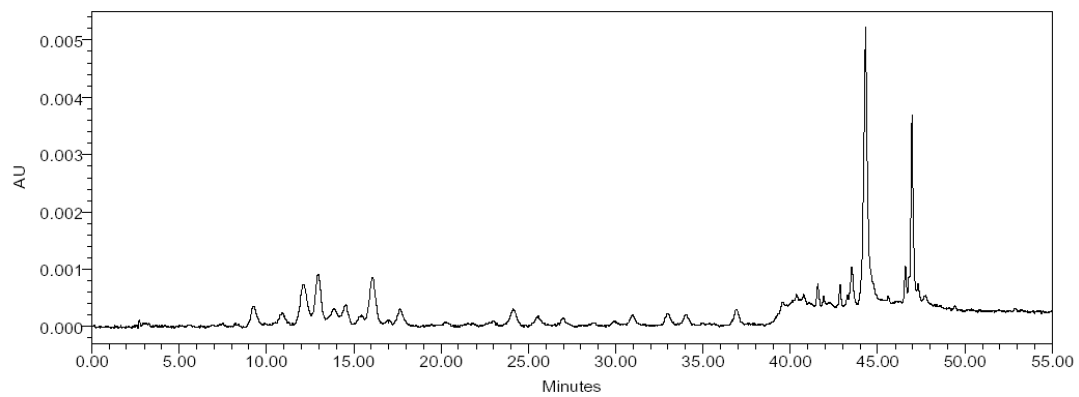
**FIGURA A24** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0210.



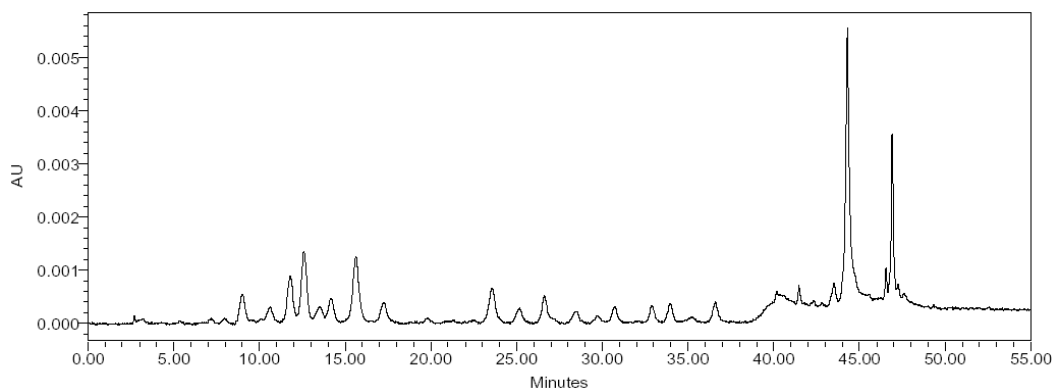
**FIGURA A25** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0212.



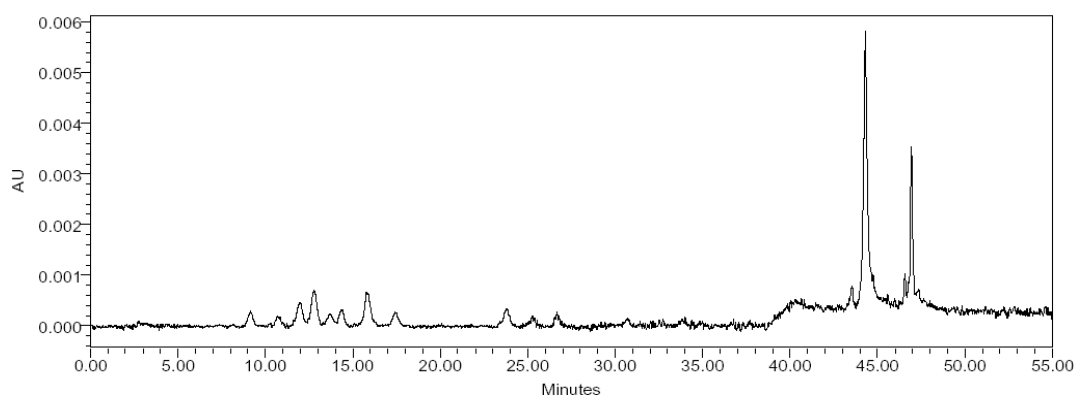
**FIGURA A26** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0213.



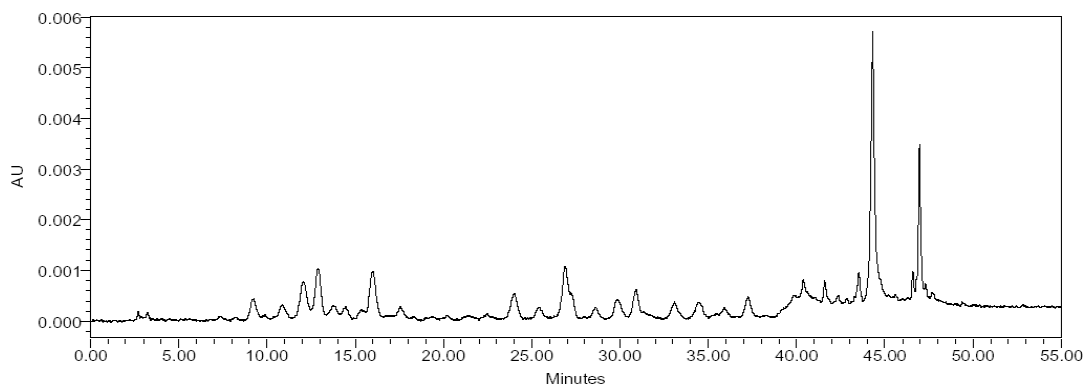
**FIGURA A27** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0220.



**FIGURA A28** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0221.

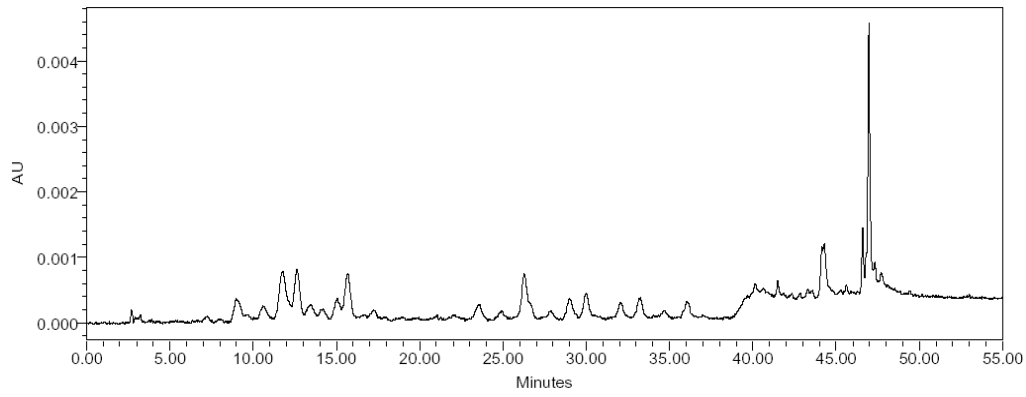


**FIGURA A29** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0222.

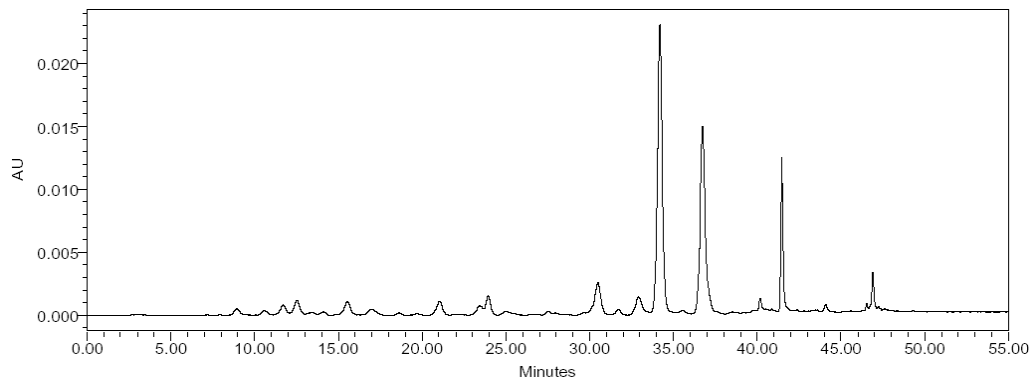


**FIGURA A30** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0223.

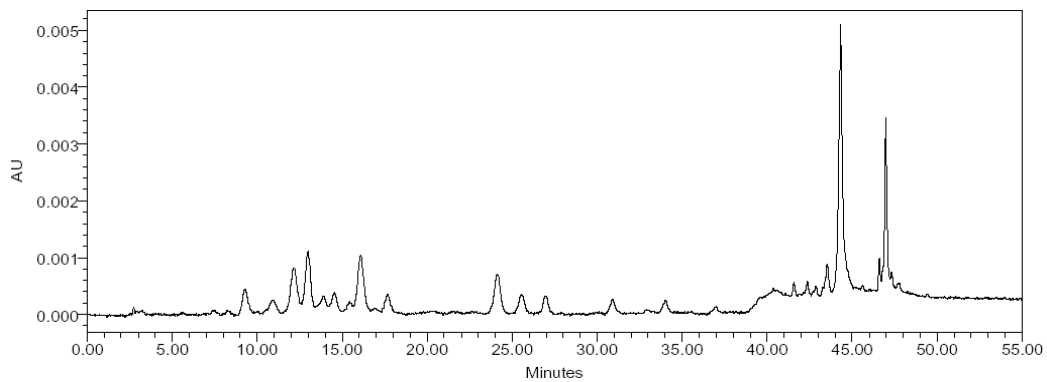




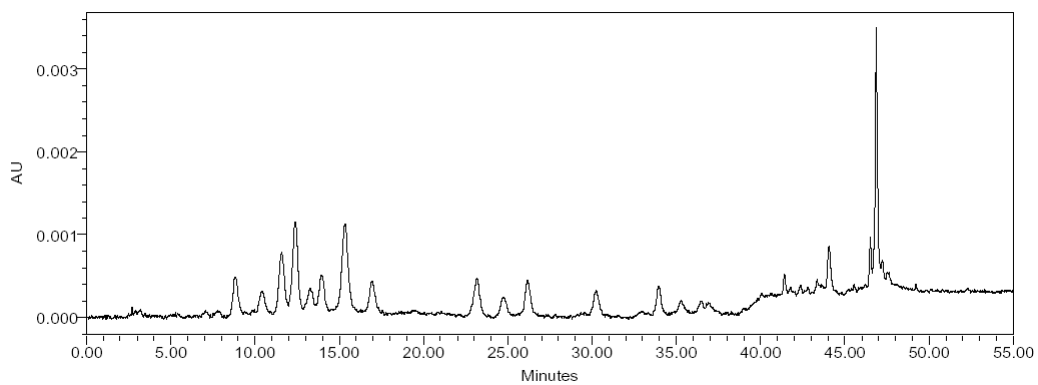
**FIGURA A31** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0225.



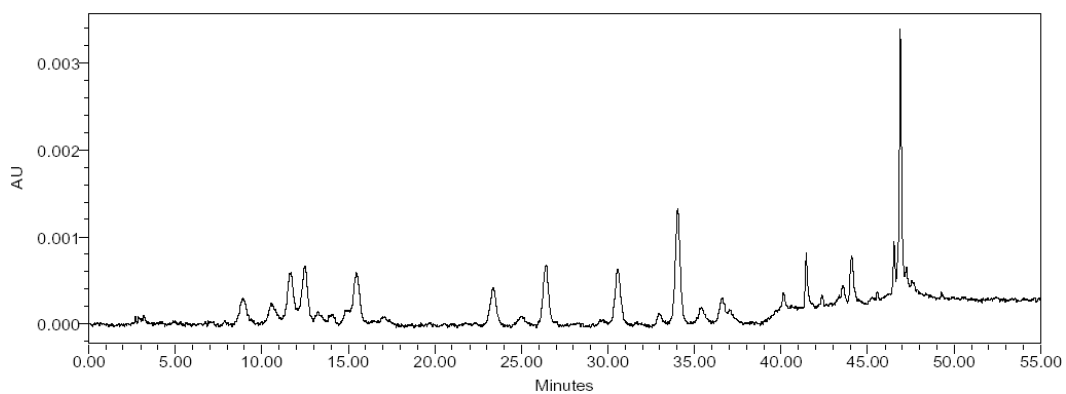
**FIGURA A32** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0226.



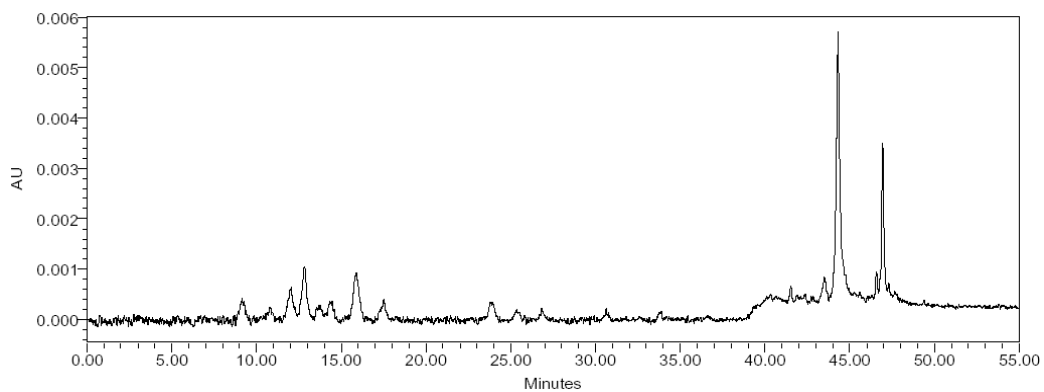
**FIGURA A33** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0301.



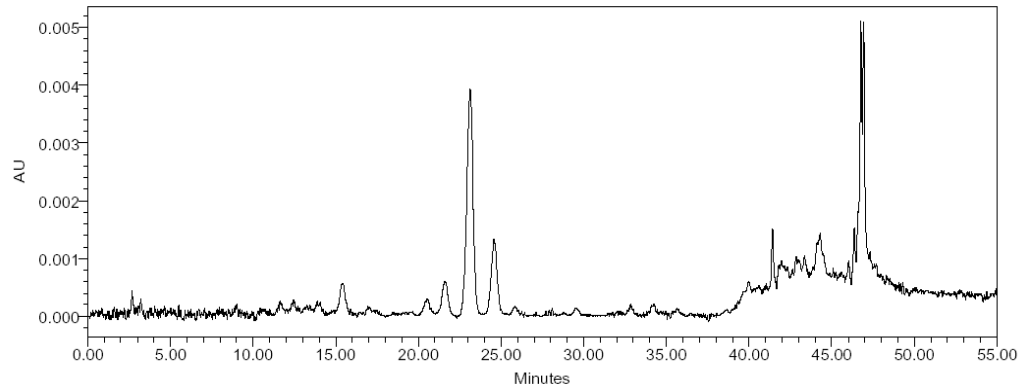
**FIGURA A34** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0302.



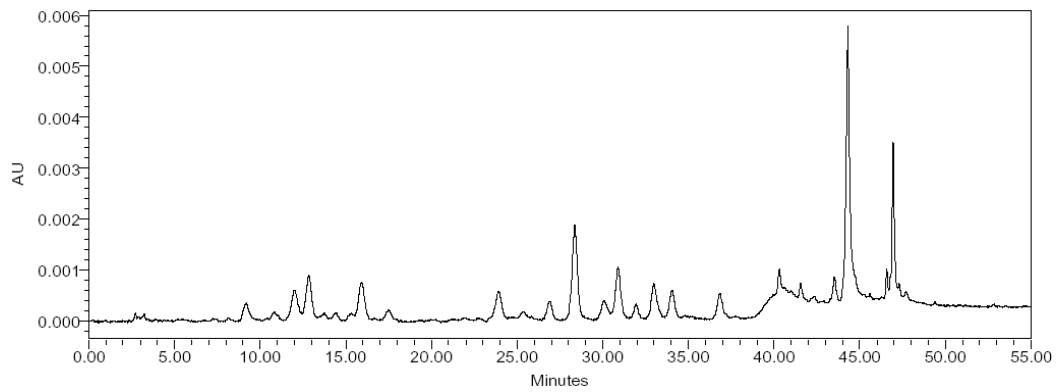
**FIGURA A35** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0303.



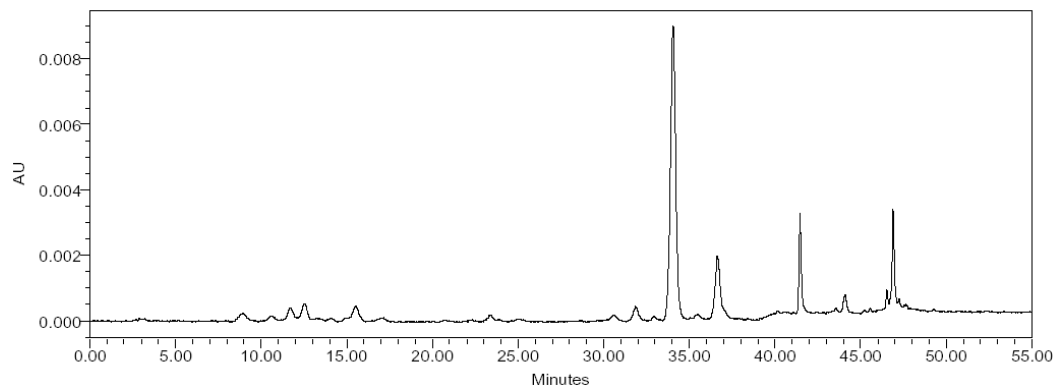
**FIGURA A36** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0305.



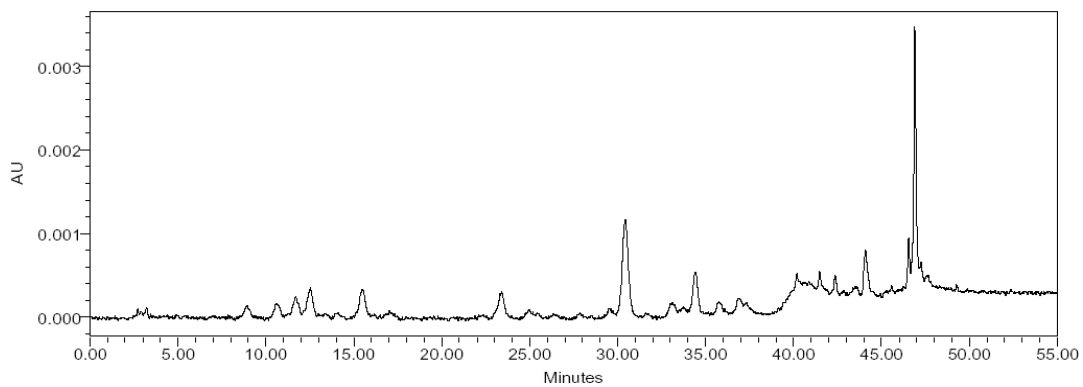
**FIGURA A37** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0306.



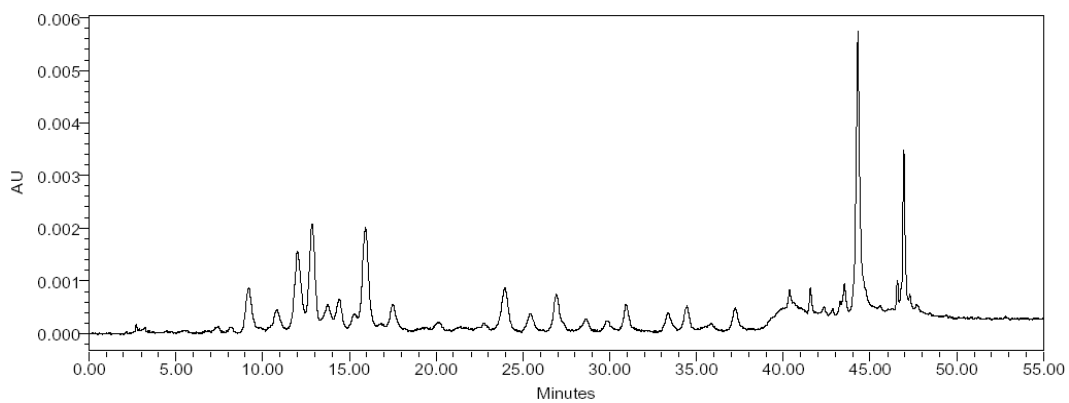
**FIGURA A38** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0307.



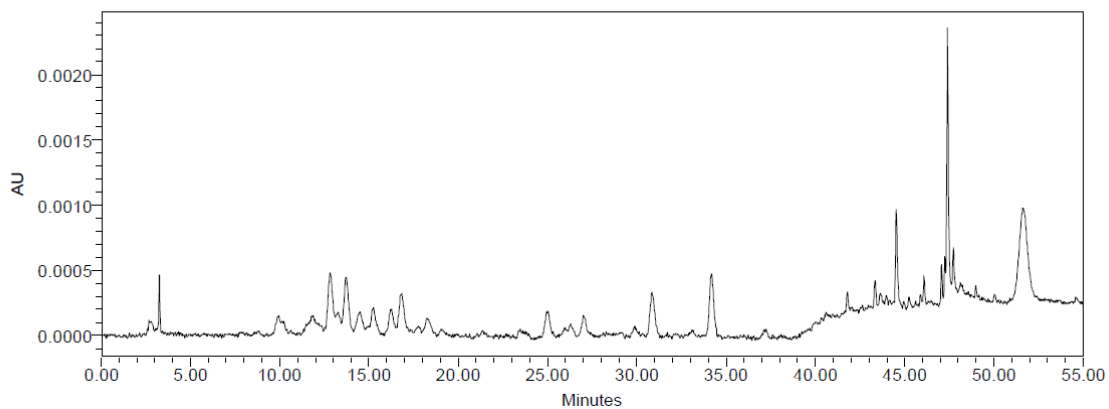
**FIGURA A39** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0309.



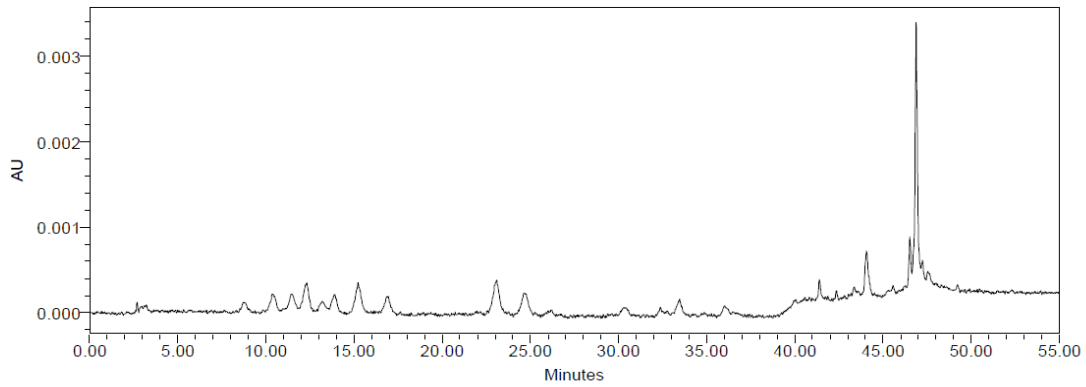
**FIGURA A40** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0310.



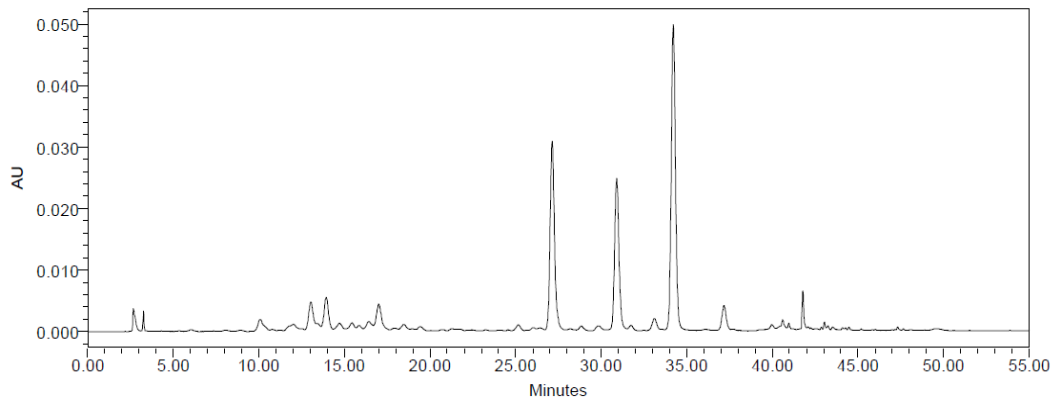
**FIGURA A41** Cromatograma obtido para o cultivar TB 9820.



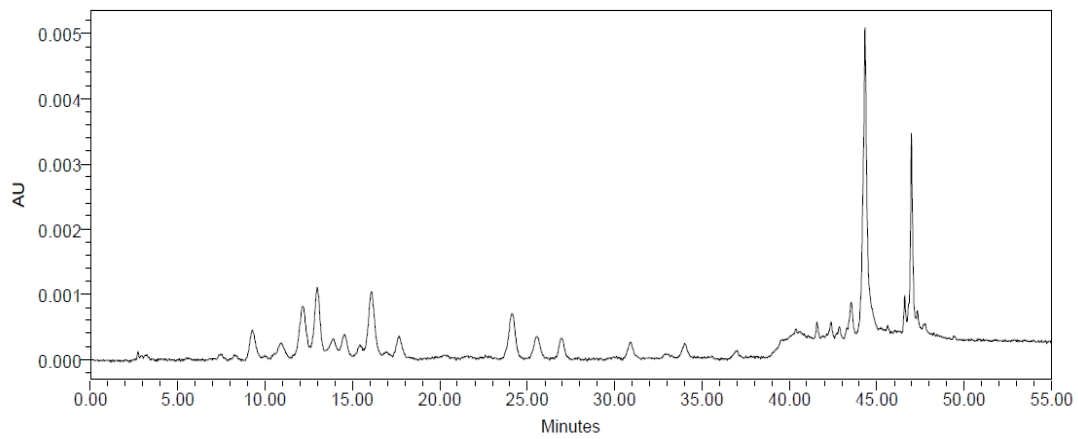
**FIGURA A42** Cromatograma obtido para o cultivar TB0304



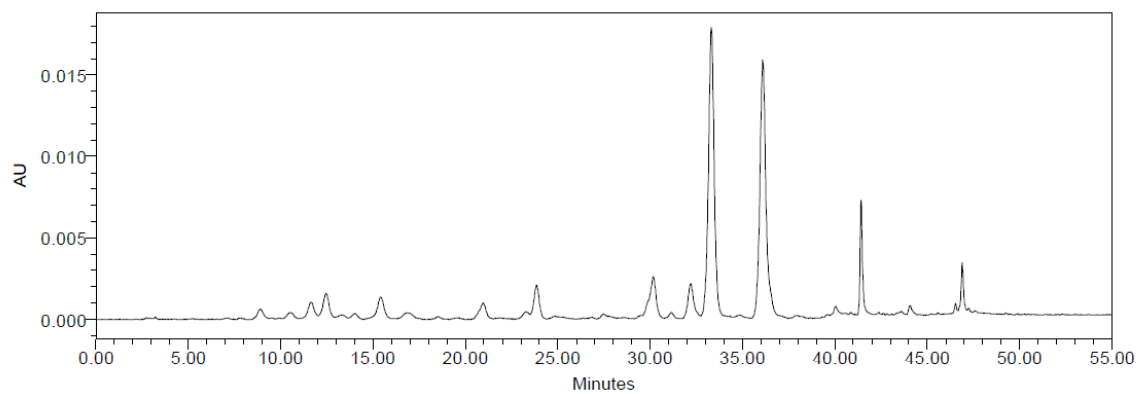
**Figura A43** Cromatograma obtido para o cultivar TB0201



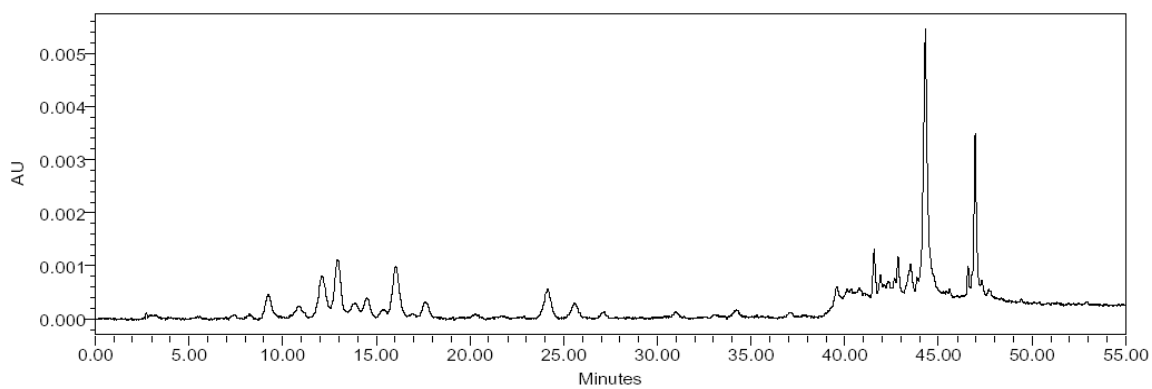
**Figura A44** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0219



**Figura A45** Cromatograma obtido para o cultivar TB0308



**Figura A46** Cromatograma obtido para o cultivar TB 0224



**Figura A47** Cromatograma obtido para o cultivar Iraí

**Tabela A1.** Avaliação do teor de umidade dos cultivares de *P. vulgaris*.

<b>Amostra</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Umidade (%)</b>
TB 9820	11,19	TB 0309	9,46
TB 0201	8,75	TB 0310	10,27
TB 0202	9,31	Amarelo Iolanda	9,44
TB 0203	9,71	Mato Grosso	10,40
TB 0204	8,08	Preto Ibérico	9,59
TB 0207	10,19	Guabiju Brilhante	7,75
TB 0210	11,23	Roxo Redondo	8,69
TB 0211	11,83	AM-5	10,94
TB 0212	9,63	Biriva 264	10,99
TB 0213	8,08	Rosinha Precoce	9,55
TB 0219	9,63	Mouro Tavares 187	10,94
TB 0220	5,16	03 FPJ CF 29.1	8,78
TB 0221	10,39	Carioca	8,43
TB 0222	9,73	Guapo Brilhante	9,66
TB 0223	11,39	Irai	11,19
TB 0224	10,90	FT Nobre	9,45
TB 0225	9,51	BRS Exedito	9,89
TB 0226	7,92	BRS Valente	7,45
TB 0301	10,72	Macanudo	8,45
TB 0302	10,34	Macotaço	5,96
TB 0303	9,46	Minuano	10,34
TB 0304	9,89		
TB 0305	9,09		
TB 0306	10,14		
TB 0307	9,65		
TB 0308	9,69		