

Evolução dos fenólicos totais e taninos condensados (Proantocianidinas) durante o desenvolvimento das sementes do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)

José Virgilio Coelho¹ e Franco Maria Lajolo²

RESUMO. Acompanhou-se a evolução totais e dos taninos condensados (proantocianidinas) do feijão aroana 80 (*Phaseolus vulgaris* L.), durante seu desenvolvimento (10 a 45 dias após a antese). Nesta fase os teores de fenólicos totais e de taninos condensados aumentaram por unidade de sementes, até o 31º e 21º dias após a antese, respectivamente seguindo-se uma diminuição até a colheita (45 dias após a antese). Foram constatadas evidências de que ocorre polimerização durante o desenvolvimento da semente do feijão, devido à diminuição gradativa do teor de catequina e aumento de seus polímeros (compostos intermediários), além do aumento gradativo da capacidade de inibição de α -amilase.

SUMMARY. Evolution of phenolic compounds and tannins in beans during seed development. The evolution of phenolic compounds and tannins (proanthocyanidins) of bean seeds, *Phaseolus vulgaris* L., (cultivar aroana 80), from anthesis to maturity (10 to 45 days after anthesis), was investigated. During seed development, phenolic compounds and tannins contents increased by seed unit, until the 31st and 21st day after anthesis respectively, decreasing afterwards. The gradual decrease in catechin and the increase of its polymers (intermediate compounds), as well as the gradual increase in α -amylase inhibition capacity were indications that tannins polymerize during seed development.

INTRODUÇÃO

Os polifenólicos formam um grupo heterogêneo de compostos, considerados metabólitos secundários das plantas, estando largamente distribuídos nos vegetais. Dentre eles estão os taninos que são divididos em dois grandes grupos: os hidrolizáveis e os não hidrolizáveis ou condensados, para os quais tem sido adotado o termo proantocianidinas (1).

Os taninos apresentam a capacidade de interação com proteínas através de ligações de hidrogênio (2,3,4), ligações hidrofóbicas (3,4), ligações iônicas e ligações covalentes (5). A intensidade dessas ligações depende de vários fatores como o tamanho, a conformação e carga da proteína, o pH do meio (6) e do grau de polimerização dos taninos (7,8). Esta interação poderá ocorrer tanto com as proteínas dos alimentos, como com as enzimas do trato gastrointestinal.

O feijão, *Phaseolus vulgaris* é uma leguminosa muito consumida em diversas regiões do mundo, principalmente no Brasil, onde constitui-se numa importante fonte de proteínas

e outros nutrientes. Entretanto, apresenta em muitas variedades principalmente as de coloração marrom, vermelho e preto um teor mais alto de taninos (9,10,11) o que poderia comprometer o melhor aproveitamento de suas proteínas.

Apesar da importância que os taninos podem desempenhar na nutrição, não foram ainda totalmente esclarecidos aspectos da sua estrutura, síntese e polimerização, no feijão. O objetivo deste trabalho foi o de acompanhar a evolução dos fenólicos totais e dos taninos condensados (proantocianidinas) durante o desenvolvimento das sementes do feijão.

MATERIAS E METODOS

Materiais- O feijão utilizado foi a cultivar Aroana 80, uma cultivar precoce que apresenta maior uniformidade de desenvolvimento, obtido do Instituto Agronômico de Campinas. (+) catequina, (-) epicatequina, Sephadex LH-20 e α -amilase pancreática (A-4268) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. Todos os demais reagentes foram os da melhor qualidade disponível. Para a cromatografia, foi utilizado papel Whatman Nº 1.

Métodos - Desenvolvimento do feijão- As amostras de feijão foram plantadas em vasos, no viveiro do Instituto Agronômico de Campinas e as vagens colhidas aos 10, 15, 24, 28, 31, 42 e

1. Professor Adjunto-Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia-UFMG-Belo Horizonte-MG. Brasil.
2. Professor Titular-Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP-Caixa Postal 30.786, CEP 05508, São Paulo, SP-Brasil.

45 dias após a antese. Após a colheita, as sementes foram contadas, pesas e separadas em diversos lotes para as análises. Exceto para a determinação de umidade, todas as amostras foram congeladas a -20°C até o momento da análise.

Análises químicas- A determinação de umidade foi realizada de acordo com a AOAC (12). O peso médio das sementes do feijão foi calculado dividindo-se o peso pelo número total de sementes. A porcentagem de cascas foi obtida separando-se os cotilédones manualmente e pesando cascas e cotilédones após dessecar a $+40^{\circ}\text{C}$, durante 48 horas.

Para a determinação de fenólicos totais foi utilizado a técnica de Swain e Hillis (13) e para os taninos condensados a de Price et al (14). O extrato utilizado nessas análises foi preparado a partir de 4 g das sementes do feijão em 20ml de metanol, que foram colocados em um tubo de centrífuga, o conjunto imerso em banho de gelo e o material triturado em um homogeneizador marca Kinemática GmbH Krieff-Luzern. A pasta foi centrifugada (7000 rpm/15 min), o sobrenadante guardado e o resíduo extraído mais 3 vezes, com ajuda de agitador magnético, durante 20 minutos. Os sobrenadantes foram reunidos e concentrados em evaporador rotatório, a temperatura não superior a 40°C , ao abrigo da luz e o volume acertado para 10 ml com metanol. Foi utilizada a catequina como padrão e os resultados foram expressos em miligramas de fenólicos totais e miligramas de taninos, em equivalentes de catequina, por 10 sementes.

Separação dos fenólicos - Para o fracionamento dos fenólicos, foram utilizados os extratos obtidos acima, contendo 3,5 mg de fenólicos totais (determinados pelo Folin-Denis, segundo Swain e Hillis (13)). A separação foi feita através de uma coluna com Sephadex LH-20(20,5 x 1,4 cm) por eluição com etanol a 95°GL (fluxo 18 ml/hora e fração de 3 ml) até que a absorvância do eluato fosse igual a zero. Em seguida eluiu-se com acetona a 50% em água até que a absorvância a 540nm fosse igual a zero. Os extratos correspondentes aos picos foram reunidos, concentrados e dosados quanto aos teores de fenólicos totais, segundo a técnica de Swain e Hillis(13).

Cromatografia - As frações dos fenólicos obtidos acima foram cromatografadas em papel Whatman N^o1, juntamente com os padrões catequina, epicatequina e proantocianidina isolada do feijão aroana 80, nas concentrações de 1mg/ml. Como fase móvel foi utilizada n-butanol: ácido acético: água (14:1:5). Após a secagem do papel, o cromatograma foi revelado com o reagente de vanilina ácido p-toluenosulfônico, de acordo com Roux e Maihs (15).

Capacidade de inibição enzimática - A atividade da α -amilase pancreática foi determinada de acordo com a técnica de Bernfeld (16), com modificações. O substrato, solução de amido a 1%, foi preparado segundo a técnica de Strumeyer (17). Para a determinação da capacidade de inibição da α -

amilase pelos fenólicos, foram utilizadas as frações correspondentes ao último pico da eluição com etanol (Fig. 3) e a referente a eluição com acetona-água. A concentração de enzima (α -amilase) foi fixada em 1,2 μg de proteína e a de fenólicos, variável. O tempo de pré-incubação dos taninos com a enzima foi de 5 minutos e a reação realizada a 37°C .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenvolvimento do feijão - A Tabela 1 mostra a porcentagem de matéria-seca, o peso médio das sementes e a porcentagem de cascas do feijão aroana 80 durante seu desenvolvimento. A través destes dados observa-se que entre 24 a 31 dias, há um aumento bastante acentuado da matéria seca. Através da Tabela 1, verifica-se também que o peso médio das sementes aumenta progressivamente até o 31^o dia após a antese e a partir deste período ocorre uma queda brusca até a época da colheita (45 dias). Os dados obtidos por Loewenberg (18) são bastante próximos aos deste trabalho, sendo que o pico máximo foi em torno do 35^o após a antese.

TABELA 1
PORCENTAGEM DE MATERIA SECA, PESO MEDIO
DAS SEMENTES E PORCENTAGEM DE CASCAS DO
FEIJÃO AROANA 80 DURANTE SEU
DESENVOLVIMENTO

Dias após a antese	Matéria seca (g/100g)	Peso médio das sementes (g) (base úmida)	Cascas (g/100g)
10	15,2	0,061	55,4
15	18,7	0,123	ND
18	21,1	0,185	22,0
21	24,1	0,247	ND
24	26,5	0,323	ND
31	56,7	0,508	ND
42	79,3	0,303	ND
45	87,1	0,233	10,4

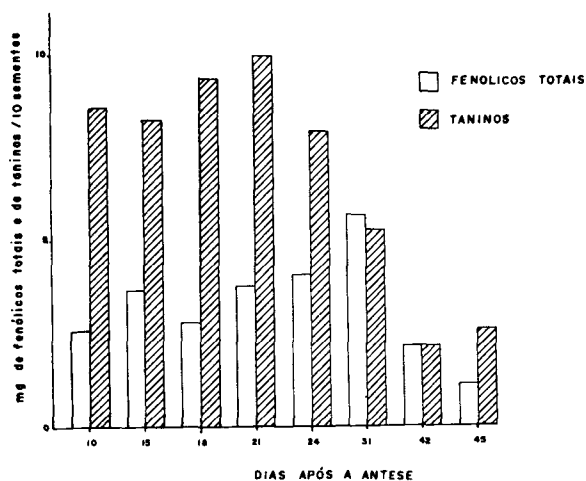
ND = Não determinado

Durante o desenvolvimento do feijão houve uma diminuição progressiva na porcentagem da casca em relação ao peso da semente. Assim, aos 10 dias após a antese, a casca representa cerca de 55% do peso e no final, ou seja, 45 dias após a antese, representava apenas 10%. Esse resultado final e bem próximo ao encontrado por Bressani et al (10) que em cultivares de feijão preto, vermelho e branco encontraram de 6,97 a 9,29% e aos de Deshpande e Cheryan (19), cujos resultados variaram de 8,0 a 8,2% em quatro cultivares diferentes.

Perfil dos fenólicos totais e dos taninos durante o desenvolvimento do feijão - A Figura 1 mostra os teores de fenólicos totais e de taninos, extraídos com metanol absoluto.

Os resultados foram expressos em miligramas de fenólicos totais e miligramas de taninos, ambos em equivalentes de catequina, por 10 sementes. A expressão dos resultados por sementes é devido à grande variação de porcentagem de cascas em relação às sementes (Tabela 1), durante o processo de desenvolvimento e ao fato desses compostos estarem quase que totalmente nas cascas do feijão, conforme observado por vários autores (9,19,20).

FIGURA 1
Teores de fenólicos totais e de taninos do feijão aroana 80 durante o desenvolvimento

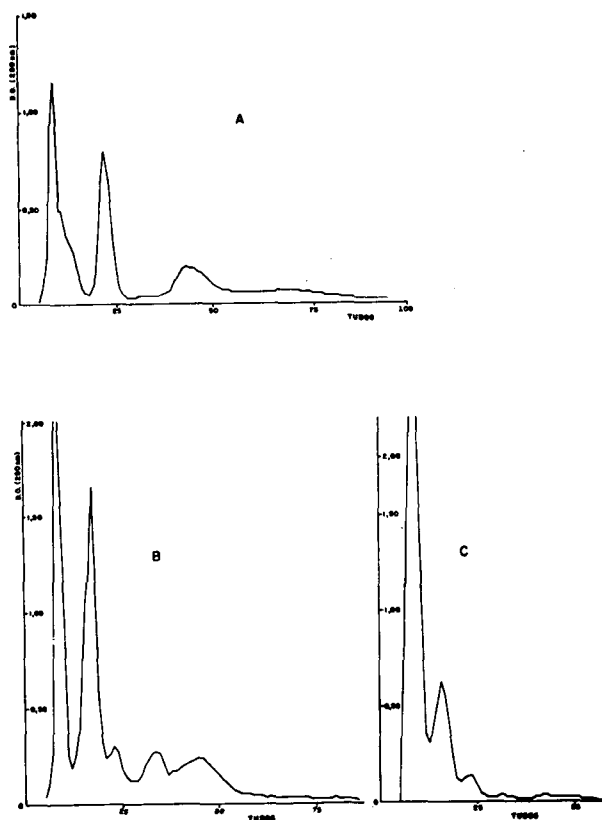


Observa-se que os teores de taninos são superiores aos de fenólicos totais, o que é uma aparente incoerência, pois os taninos constituem apenas uma fração dos fenólicos totais. Entretanto, foi constatado que, utilizando-se a catequina como padrão nesta dosagem, há uma aparente super estimativa do teor de taninos (20). Este fato foi também observado com a tanino condensado isolado do sorgo (14). Por outro lado, como relação aos fenólicos totais verifica-se o inverso, ou seja, a utilização da catequina como padrão subestima o teor de taninos expressos como fenólicos totais (20).

Ainda, através da Figura 1, pode-se observar que tanto os fenólicos totais como os taninos apresentam uma tendência de aumentar o seu teor, chegando ao máximo aos 31 e 21 dias após a antese, respectivamente, quando então diminuem. Esses dados, à primeira vista sugerem que a partir destes dias não haveria mais síntese ou translocação dos mesmos à semente. Possivelmente o que continuaria ocorrendo, seriam mudanças na estrutura desses compostos, como a polimerização. Essa hipótese tornase viável se se observar a Figura 2, onde são apresentados os perfis de eluição dos fenólicos através de uma coluna com Sephadex LH-20, com etanol. Aos 10 dias após a antese, (Fig. 2,A) observa-se um pico inicial que corresponde a substâncias fenólicas mais simples e pigmentos (nessa fase, principalmente a clorofila) seguida de um pico que corresponde à catequina (verificado através de cromatografia em papel) e um outro pico que,

provavelmente, é um derivado da catequina, talvez seu dímero, pois apresenta um Rf um pouco menor e dá reação positiva com a vanilina. Aos 31 dias após a antese (Fig.2,B) continua sendo eluído em primeiro lugar a fração correspondente aos fenólicos mais simples e pigmentos, seguida da fração catequina. Logo após, aparecem mais três picos e não apenas um, como aos 10 dias. Esses fenólicos apresentam Rf (s) decrescentes em relação à ordem de eluição e dão reação positiva com a vanilina. Possivelmente são derivados da catequina com níveis diferentes de polimerização. Aos 45 dias após a antese (Fig.2,C) continua aparecendo em primeiro lugar, a fração correspondente aos fenólicos mais simples e pigmentos (agora com predominância quase total de um pigmento vermelho) e, em segundo lugar o pico da catequina, porém com uma área bem menor. Após esse pico, tem-se um alisamento que provavelmente corresponderá aos fenólicos polimerizados e que só serão eluídos com acetona-água. Quanto à eluição das formas mais polimerizadas, com acetona-água, independente do estágio de maturação, ou do solvente empregado, foi obtido somente um pico, observado através da medida da absorbância a 540 nm.

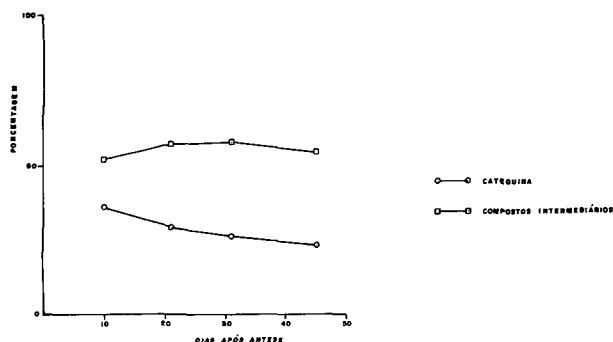
FIGURA 2
Perfis dos fenólicos eluídos da coluna de Sephadex LH-20 com etanol contidos nos extratos do feijão Aroana colhidos: 10 dias após a antese (A), 31 dias após a antese (B) e 45 dias após a antese (C)



Considerando - se a porcentagem da catequina (caracterizada a través da cromatografia de papel) e de seus derivados, compostos intermediários, que são eluídos com etanol, dos extratos obtidos durante o desenvolvimento do feijão (Fig. 3), pode-se observar que o teor de catequina diminuiu gradualmente e os compostos intermediários tendem a aumentar até o 31° dias, diminuindo discretamente nos 45 dias após a antese. Como a catequina está diminuindo e os intermediários estão aumentando, parece provável que a catequina não esteja sendo mais sintetizada ou o seja numa velocidade menor e aquela já existente estaria se polimerizando, ou seja, tornando-se um intermediário. Ou, ainda, sua síntese ou translocação à semente seria menor que sua utilização. Quando os intermediários diminuem aos 45 dias, mesmo que seja uma diminuição pequena, supõe-se que estejam polimerizando e, nesse caso, passam a ser eluídos somente com acetona-água.

FIGURA 3

Porcentagem de catequina (monômeros) e de compostos intermediários durante o desenvolvimento do feijão Aroana 80, após a eluição de seus extratos da coluna de Sephadex LH-20 com etanol



Inibição da α -amilase pancreática - O teor de fenólicos (fração etanol, último pico e fração acetona) necessários para inibir 40% da atividade enzimática da α -amilase diminuem à medida que a semente desenvolve, como pode ser visto através da Tabela 2. Observa-se que os taninos condensados apresentam maior capacidade de inibição da atividade enzimática do que os fenólicos eluídos no último pico da fração etanol. Os fenólicos utilizados, cujos resultados estão contidos na Tabela 2, (fração etanol) devem, teoricamente apresentar um peso molecular semelhante, independente do estágio de desenvolvimento da semente. Com a polimerização, aqueles que atingem um grau mais elevado, não são mais eluídos com etanol, mas com acetona-água. No último pico estarão aqueles que já não são mais monômeros, nem talvez dímeros, mas que provavelmente tenham 3 ou 4 unidades. Logo é de se esperar que eles apresentem um comportamento muito parecido quanto à capacidade de interação com as proteínas. Dos taninos (fração acetona) deve-se esperar um comportamento diferente, ou seja, com o avanço do

desenvolvimento, que eles se polimerizem mais e apresentem maior capacidade de inibição da atividade da α -amilase. Aliás, foi o que realmente ocorreu, com exceção do 31° dia após a antese, quando apresentou a menor capacidade de inibição.

TABELA 2
TEORES DE FENOLICOS NECESSARIOS PARA INIBIR 40% DA ATIVIDADE ENZIMATICA DE α -AMILASE

Dias após a antese	μg de fenólicos ¹ (fração etanol)	μg de fenólicos ² (fração acetona)
15	6,2	1,45
31	5,2	2,55
45	4,9	0,25

1. Última fração eluída com etanol
2. Fração única eluída com acetona a 50%

CONCLUSÕES

Os teores de fenólicos totais e de taninos, durante o desenvolvimento do feijão aroana 80, aumentaram até o 31° e 24° dias após a antese, respectivamente. Após esse período, apresentam uma diminuição e tendência à estabilização.

Tendo em vista os perfis de eluição dos fenólicos do Sephadex LH-20, a diminuição gradativa da catequina acompanhada do aumento de seus polímeros (compostos intermediários) e do aumento da capacidade de inibição da α -amilase pancreática, pode-se constatar que há polimerização destes fenólicos (taninos) durante o desenvolvimento das sementes do feijão.

REFERÊNCIAS

1. Haslan, E. Vegetable tannins. *Recent Adv. Phytochem*, 12:475-523, 1979.
2. Gustavson, K.H. Interaction of vegetable tannins with polyamides as proof of the dominant function of the peptide bond of collagen for its binding of tannins. *J. Polymer Sci.*, 12:317-324, 1954.
3. Oh, H.J., Hoff, J.E., Armstrong, G.S. & Haff, L.A. Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. *J. Agric. Food. Chem.*, 28:394-398, 1980.
4. Artz, W.E., Bishop, P.D., Dunker, A.K., Shamis, E.G. & Swanson, B.G.H. *Agric. Food Chem.*, 35:417-421, 1987.
5. Wehr, H.M. Reactions of protein with phenols and quinones: evaluation of amino acid modification and protein digestibility. PH. D. Thesis. Oregon State Univ. 1973.
6. Hagerman, A.E. & Butler, L.G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem.*, 256:4494-4497, 1981.
7. Bate-Smith, E.C. Haemanalysis of tannins: The concept of relative astringency. *Phytochem.*, 12:907-912, 1973.
8. Porter, L.J. & Woodruffe, J. Haemanalysis of tannins: The relative astringency of proanthocyanidin polymers. *Phytochem.*, 23:1255-1256, 1984.

9. Elias, L.G. Fernández, D.G. Bressani, R. Possible effects of seed coat polyphenolics on the nutritional quality of bean protein. *J. Food Sci.*, 44:524-527, 1979.
10. Bressani, R., Elias, L.G. & De Espanha, M.E. Posibles relaciones entre medidas físicas, químicas y nutricionales en frijol común (*Phaseolus vulgaris*). *Arch. Latinoam. Nutr.*, 31:550-570, 1981.
11. Deshpande, S.S. & Cheryan, M. Determination of phenolic compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assays. *J. Food Sci.*, 52:332-334, 1987.
12. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the AOAC. 13th ed. Washington, D.C., The Association, 1980, p.211.
13. Swain, T. & Hillis, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I-The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* 10:63-68, 1959.
14. Price, M.L., Van Scoyoc, S & Butler, L.G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.*, 26:1214-1218, 1978.
15. Roux, D.G. & Maihs, R.E. Selective spray reagents of the identification and estimation of flavonoid compounds associated with condensed tannins. *J. Chromat.*, 4:65-74, 1960.
16. Bernfeld, P. Amylases, a and B. *Methods in enzymology*. New York, Academic Press, 1955, v.I, p. 149.
17. Strumeyer, D.H. A modified starch for use in amylase assays. *Anal. Biochem.*, 19:61-71, 1967.
18. Loewenberg, J.R. The development of bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.) *Plant Physiol.*, 30:24-250, 1955.
19. Deshpande, S.S. & Cheryam, M. Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry beans. *J. Food Sci.*, 50:905-910, 1985.
20. Coelho, J.V. Fenólicos totais e taninos durante o desenvolvimento do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) Sao Paulo, Universidade de São Paulo, 1987, 117 p. (Tese de Doutorado).