



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO – PRPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO – PPGAN

NARA VANESSA DOS ANJOS BARROS

**BIOACESSIBILIDADE *IN VITRO*, IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS
E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM GRÃOS CRUS E COZIDOS DE CULTIVARES
DE FEIJÃO-CAUPI BIOFORTIFICADAS**

TERESINA – PI

2019

NARA VANESSA DOS ANJOS BARROS

**BIOACESSIBILIDADE *IN VITRO*, IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS
E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM GRÃOS CRUS E COZIDOS DE CULTIVARES
DE FEIJÃO-CAUPI BIOFORTIFICADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Linha de Pesquisa: Controle de Qualidade de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo (DN/PPGAN-UFPI).

TERESINA – PI

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do CCS
Serviço de Processamento Técnico

Barros, Nara Vanessa dos Anjos.
B277b Bioacessibilidade *in vitro*, identificação de compostos fenólicos e atividade antioxidante em grãos crus e cozidos de cultivares de feijão-caupi biofortificadas / Nara Vanessa dos Anjos Barros. – 2019.
160 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, 2019.

Orientação: Profª. Drª. Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo.

Bibliografia

1. *Vigna unguiculata* Bioacessibilidade. 2. Digestão *in vitro*. 3. Compostos Fenólicos. 4. Flavonoides. 5. Compostos bioativos. I. Título.

CDD 613. 2

NARA VANESSA DOS ANJOS BARROS

**BIOACESSIBILIDADE *IN VITRO*, IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS
E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM GRÃOS CRUS E COZIDOS DE CULTIVARES
DE FEIJÃO-CAUPI BIOFORTIFICADAS**

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Titular Dr^a. Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo (DN/PPGAN/UFPI)
(Orientadora-Presidente)

Prof^a. Dr^a. Luiza Helena Meller da Silva (PPGCTA/ UFPA)
(Membro Externo- 1^a Examinadora)

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues Marques (CTAL/IFMA/PPGAN)
(Membro Externo- 2^o Examinador)

Prof. Dr. Maurisrael de Moura Rocha (EMBRAPA/PPGAN)
(Membro Externo- 3^o Examinador)

Prof. Dr. Jorge Minoru Hashimoto (EMBRAPA/PPGAN)
(Membro Interno - 4^o Examinador)

Prof. Titular Dr. Alessandro de Lima (CG/IFPI)
(Membro Externo - Suplente 1)

Prof. Dr. Kaesel Jackson Damasceno e Silva (EMBRAPA/PPGAN)
Membro Interno - Suplente 2

Aos meus pais, Maria do Carmo dos Anjos Barros e Francisco Bianor Barros,

As minhas avós (*in memoriam*), Maria Amélia Barros e Maria José dos Anjos,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a força e ânimo necessários para vencer em mais esta etapa da minha vida. “...Há um tempo para todo o propósito debaixo do céu...” (Ec 3:1). Para alguns, mais cedo, para outros mais tarde, mas Jesus cumprirá todas as suas promessas.

À professora Regilda Moreira-Araújo, por todo conhecimento transmitido, disponibilidade, paciência e carinho nesses dez anos de orientação. Lembro-me do convite feito a mim no dia da apresentação dos projetos da disciplina de análise sensorial de alimentos, para concorrer a bolsa do Programa Institucional de Bolsas de Inovação Tecnológica (PIBIT). A primeira orientação dela nessa modalidade, e ela viu um potencial em mim que nem eu mesma sabia que tinha. Depois da iniciação científica, veio a especialização, mestrado e doutorado. Eu evoluí muito como profissional e ser humano durante todos esses anos. Foi muito gratificante ver o Laboratório de Bromatologia e Bioquímica de Alimentos (LABROM/BIOQ) crescer tanto, sob sua coordenação, sempre trabalhando incansavelmente na busca de novos financiamentos, metodologias mais atualizadas, novas ideias e objetivos. Muito obrigada por sempre estar disponível para seus orientandos. Serei eternamente grata pelas oportunidades concedidas a mim.

Ao professor Marcos Araújo, pelo carinho e atenção durante todos os encontros que tivemos. Agradeço por cada conselho concedido, pela sua preocupação, alegria e torcida verdadeiras.

À Universidade Federal do Piauí (UFPI) pela excelência no Ensino, Pesquisa, Extensão e Internacionalização. Foi meu endereço diário durante treze anos de formação acadêmica e, atualmente, meu local de trabalho como docente.

Aos meus pais, Maria do Carmo Barros e Francisco Bianor Barros. Por todo amor, companhia, exemplo e força. Obrigada por não medirem esforços para minha educação, meu conforto e por serem meu porto seguro, diante das adversidades da vida.

Aos professores membros da banca de qualificação e defesa, por contribuírem com seus conhecimentos e as correções do trabalho desde a pré-banca.

A todos os meus alunos do curso de Nutrição no Campus Senador Helvídio Nunes de Barros (CSHNB/Picos-PI). Vocês me ensinaram e ensinam muito sobre a conduta e postura de um docente. E me fazem acreditar que realmente escolhi a profissão certa para minha vida.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição (PPGAN), pelo conhecimento repassado.

Ao prof. Dr. Maurisrael Rocha, pela oportunidade concedida inicialmente na orientação do Doutorado. Obrigada por todo auxílio na execução da pesquisa, pelos materiais fornecidos e as cultivares de feijão-caupi.

A todos os funcionários do Departamento de Nutrição da UFPI e PPGAN, pela prestatividade e companhia desde 2006, em especial ao Seu Osvaldo e Dona Maísa, que com seu jeito, humildade e palavras tão simples transformavam o meu dia.

Ao Wallisson Daniel, grande amigo, por ser essa pessoa incrível e sempre presente, mesmo de longe. Obrigada pela ajuda perante as mais diversas situações.

À Regina Cavalcante, minha amiga e parceira da vida acadêmica e profissional. Muito obrigada por todos os conselhos e torcida. Entramos juntas na UFPI/CSHNB e no PPGAN, e seremos doutoras JUNTAS!. Sem dúvidas, uma grande irmã que Deus me presenteou para me acompanhar na estrada da vida.

À Bruna Abreu, por ser essa pessoa única e incrível. Agradeço por você ter entrado na minha vida de forma inesperada, como um encontro de almas que já se conheciam de outras vidas. Obrigada por conhecer a minha pior versão, e mesmo assim, ter decidido ficar.

À Rayssa Porto, por todos os momentos divididos no LABROM/BIOQ, nas análises, disciplinas e aprendizado construído nesses anos.

A todos os colegas do LABROM/BIOQ, pela alegria e companheirismo de todos os dias, em especial ao Leonardo Negrão, Rayane Oliveira e Luana Ferraz, que levarei pra sempre comigo em meu coração.

Aos amigos que a UFPI me deu, em especial, Rodrigo Barbosa, Paulo Víctor e Gleyson Moura, pelo companheirismo e por estarem sempre presentes nessa árdua caminhada.

As minhas amigas de curso, Lívia Patrícia Batista, Leanny Almeida, Maiara Leal e Natália Quaresma, por todos os momentos compartilhados na UFPI e também na vida. Apesar da distância física, sei que posso contar com todas vocês sempre que eu precisar.

A todos os meus familiares e demais colegas que não foram citados anteriormente, mas que contribuíram para minha evolução e crescimento pessoal e profissional.

*“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para
todo propósito debaixo do céu...”*

(Eclesiastes 3:1)

RESUMO GERAL

BARROS, N. V. A. **Bioacessibilidade *in vitro*, identificação de compostos fenólicos e atividade antioxidante em grãos crus e cozidos de cultivares de feijão-caupi biofortificadas.** 2019. 160 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Teresina – PI.

Os grãos de feijão-caupi contêm compostos bioativos dos quais se destacam os compostos fenólicos, que estão concentrados no tegumento da semente e têm o potencial de auxiliar na proteção do organismo contra doenças crônicas não transmissíveis. Pesquisas que avaliem as frações acessíveis à absorção pelo organismo dos compostos bioativos durante a digestão gastrointestinal *in vitro* de grãos de feijão-caupi são escassos. Assim, este estudo objetivou avaliar a bioacessibilidade *in vitro* dos compostos fenólicos e atividade antioxidante nos grãos de cultivares biofortificadas de feijão-caupi, antes e após a cocção. Os grãos crus das cultivares BRS Aracê, BRS Tumucumaque e BRS Xiquexique foram analisadas em triplicata na forma de farinha, e os grãos cozidos macerados em conjunto como caldo após a cocção em panela de pressão doméstica por 13 minutos. Foram determinados os conteúdos de compostos fenólicos e flavonoides totais, proantocianidinas e atividade antioxidante pelo método de captura dos radicais livres DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) e FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), por meio da espectrofotometria, antes e após a cocção, e em todas as fases do processo digestivo (oral, gástrica, duodenal e colônica). Pesquisaram-se oito ácidos fenólicos, e a identificação e quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os grãos da cultivar BRS Tumucumaque apresentaram maiores conteúdos de compostos fenólicos totais antes (297,23 mg/100g ± 4,24) e após (147,15 mg/100g ± 6,94) e de flavonoides totais antes (49,36 mg/100g ± 2,02) e após (23,97 mg/100g ± 0,67) a cocção. Não foi detectada a presença de antocianinas nos grãos. Para os teores de taninos, verificou-se uma redução estatisticamente significativa nos grãos com o cozimento, com maior retenção na cultivar BRS Aracê. Para a atividade antioxidante, após o processamento, observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$). O conteúdo de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante foram reduzidos após a cocção, mas aumentaram com a digestão gastrointestinal simulada *in vitro*, devido à liberação de formas ligadas. Nos grãos crus foram identificados cinco ácidos fenólicos após a digestão *in vitro* (ácidos gálico, clorogênico, cafeico, p-cumárico e ferúlico), enquanto que nos grãos cozidos três foram identificados (ácidos gálico, cafeico e ferúlico). Os ácidos fenólicos sofreram degradação sob condições gastrointestinais, entretanto, os grãos das três cultivares de feijão-caupi biofortificadas avaliadas mantiveram compostos com relevante bioatividade (grãos crus – ácidos gálico, cafeico e p-cumárico; grãos cozidos – ácidos gálico e cafeico) e atividade antioxidante, que podem auxiliar na proteção contra doenças crônicas não transmissíveis, o que ratifica que o feijão-caupi é um alimento fonte de antioxidantes naturais, para inclusão na ingestão diária da população.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*. Processamento térmico. Digestão *in vitro*. Fenólicos. Flavonoides. Compostos bioativos.

GENERAL ABSTRACT

BARROS, N. V. A. ***In vitro* bioaccessibility, identification of phenolic compounds and antioxidant activity in raw and cooked grains of biofortified cowpea cultivars.** 2019. 160 f. Thesis (Doctorate) - Postgraduate Program in Food and Nutrition, Federal University of Piauí, Teresina - PI.

Cowpea grains contain bioactive compounds of which phenolic compounds are prominent, which are concentrated in the seed coat and have the potential to assist in protecting the organism against chronic noncommunicable diseases. Researches that evaluate the fractions accessible to the body's absorption of bioactive compounds during *in vitro* gastrointestinal digestion of cowpea beans are scarce. Thus, this study aimed to evaluate the *in vitro* bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant activity in the biofortified grains cowpea before and after cooking. The raw grains of the cultivars BRS Aracê, BRS Tumucumaque and BRS Xiquexique were analyzed in triplicate in flour form, and the cooked grains macerated together as broth after cooking in a domestic pressure cooker for 13 minutes. The contents of phenolic and total flavonoids compounds, proanthocyanidins and antioxidant activity were determined by the free radical capture method DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline -6-sulfonic acid) and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), by means of spectrophotometry, before and after cooking, and in all phases of the digestive process (oral, gastric, duodenal and colonic). Eight phenolic acids were investigated, and the identification and quantification was performed by high performance liquid chromatography (HPLC). Grains of cultivar BRS Tumucumaque had higher concentrations of total phenolic compounds before (297.23 ± 4.24 (mean \pm standard deviation) mg/100 g) and after (147.15 ± 6.94 mg/100 g) cooking, and also had higher concentrations of total flavonoids before (49.36 ± 2.02 mg/100 g) and after (23.97 ± 0.67 mg/100 g) cooking. Anthocyanins were not measured in the grains of either cultivar. There was a statistically significant reduction in the concentration of total flavanols after cooking, with a greater retention in cultivar BRS Aracê. For antioxidant activity, after cooking, a significant reduction was observed. The content of total phenolic compounds and antioxidant activity were reduced after cooking, but increased with *in vitro* simulated gastrointestinal digestion, due to the release of bound forms. In raw grains five phenolic acids were identified after *in vitro* digestion (gallic, chlorogenic, caffeic, p-coumaric and ferulic acids), while in cooked grains three were identified (gallic, caffeic and ferulic acids). The phenolic acids underwent degradation under gastrointestinal conditions; however, the grains of the three biofortified cowpea cultivars maintained compounds with relevant bioactivity (raw grains - gallic, caffeic and p-coumaric acids, cooked grains - gallic and caffeic acids) and activity antioxidant, which may help protect against non-transmissible chronic diseases, with ratios that the cowpea a food source of natural antioxidants for inclusion in the daily intake of the population.

Key words: *Vigna unguiculata*. Thermal processing. Digestion *in vitro*. Phenolics. Flavonoids. Bioactive compounds.

LISTA DE FIGURAS

- 1 – Grãos da cultivar BRS Aracê
- 2 – Grãos da cultivar BRS Tumucumaque
- 3 – Grãos da cultivar BRS Xiquexique
- 4 – Estruturas químicas dos principais ácidos fenólicos (derivados do ácido benzoico e cinâmico) identificados no feijão-caupi.

LISTA DE QUADROS

QUADROS

- 1 – Classes e subclasses comerciais e características dos grãos de feijão- caupi.
- 2 – Composição de polifenóis nos grãos de cultivares de feijão-caupi.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS QUÍMICAS EM PORTUGUÊS

ABREVIATURAS E SIGLAS

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CFT	Compostos Fenólicos Totais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DCNTs	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DG	Digestão Gastrointestinal
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EC	Equivalente de Catequina
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária
EQ	Equivalente de Quercetina
IB	Índice de Bioacessibilidade
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de Confiança
LSPA	Levantamento Sistemático da Produção Agrícola
pH	Potencial Hidrogeniônico
RL	Radicais Livres
TGI	Trato Gastrointestinal

FÓRMULAS QUÍMICAS

AlCl_3	Cloreto de Alumínio
$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Acetato de Sódio
HCl	Ácido Clorídrico
KCl	Cloreto de Potássio
Na_2CO_3	Carbonato de Sódio
NaNO_2	Nitrito de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS EM INGLÊS

AA	Antioxidant Activity
ABTS	2,2'-azinobis (3- ethylbenzothiolin-6-sulfonic acid)
ANOVA	Analysis of Variance
BI	Bioavailability Index
CE	Catechin Equivalents
CI	Confidence Interval
COST	European Cooperation in Science & Technology
Cy-Glu-3	Cyanidine-3-glucoside
DPPH	1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
FAO	Food and Agricultural Organization
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GAE	Gallic Acid Equivalents
GD	Gastrointestinal Digestion
GT	Gastrointestinal Tract
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MRPs	Maillard Reaction Products
ND	Not Detected
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
QE	Quercetin Equivalents
RT	Retention Time
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TEAC	Antioxidant Capacity Equivalent to Trolox
TPC	Total Phenolic Compounds
TPTZ	2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	15
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
3 REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1 Feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp.)	20
3.1.1 Origem, Classificação e Importância econômica	20
3.1.2 Melhoramento genético do feijão-caupi	22
3.1.2.1 Biofortificação	23
3.1.3 Qualidade nutritiva e compostos bioativos do feijão-caupi	26
3.2 Efeito da cocção no conteúdo de compostos bioativos	30
3.3 Bioacessibilidade e biodisponibilidade em matrizes alimentares	32
3.3.1 Sistema digestivo e fatores de interação	33
3.3.1.1 Sistema gastrointestinal <i>in vitro</i>	34
3.3.2 Bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos fenólicos	36
3.3.3 Estudos de bioacessibilidade em feijão-caupi	37
REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO II	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
ARTIGO CIENTÍFICO I: Effect of cooking on the bioactive compounds and antioxidant activity in grains cowpea cultivars	48
ARTIGO CIENTÍFICO II: Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Grains of Biofortified Cowpea Cultivars, Before and After Cooking	64
ARTIGO CIENTÍFICO III: Effect of <i>in vitro</i> gastrointestinal digestion on the phenolic compound content and antioxidant activity in cowpea cultivar BRS Xiquexique	84
ARTIGO CIENTÍFICO IV Bioacessibilidade <i>in vitro</i> no grão cru e cozido de feijão-caupi cultivar BRS Tumucumaque	101
ARTIGO CIENTÍFICO V: Bioacessibilidade <i>in vitro</i> de compostos fenólicos da cultivar de feijão-caupi BRS Aracê antes e após a cocção	118
5 DISCUSSÃO GERAL	137
6 CONCLUSÕES	140
APENDICE A – CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO PARA DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	142
APÊNDICE B – CURVA PADRÃO DE QUERCETINA PARA DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS	143
APÊNDICE C – CURVA PADRÃO DE CATEQUINA PARA DETERMINAÇÃO DE PROANTOCIANIDINAS	144

APÊNDICE D – CURVA PADRÃO DE TROLOX UTILIZADA NA ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH	145
APÊNDICE E - CURVA PADRÃO DE TROLOX UTILIZADA NA ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS	146
APÊNDICE F - CURVA PADRÃO DE TROLOX UTILIZADA NA ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP	147
APÊNDICE G – OUTRAS PRODUÇÕES PUBLICADAS	
Artigo científico: Efeitos do processamento no teor de compostos bioativos em cultivares de feijão-caupi.	148
APÊNDICE H – OUTRAS PRODUÇÕES PUBLICADAS	
Capítulo de livro: Conteúdo de bioativos e atividade antioxidante em cultivares de feijão-caupi antes e após o cozimento	155

CAPÍTULO I

Introdução, Objetivos e Referencial Teórico

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma leguminosa comumente conhecida no Brasil como caupi, feijão-caupi, feijão-de-corda, macássa, feijão de praia, macassar, dentre outras. O Brasil é o quarto produtor mundial dessa leguminosa, constituindo-se num dos principais componentes da dieta alimentar, nas zonas rural e urbana, gerando emprego e renda para milhares de pessoas (FREIRE-FILHO et al., 2017). O feijão-caupi é uma excelente fonte de proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais, fibras alimentares, além de apresentar baixa quantidade de gordura e um bom perfil de aminoácidos (ANDRADE JÚNIOR et al., 2002).

Além dos benefícios nutricionais, o feijão-caupi é rico em compostos bioativos com destaque para os polifenóis, principalmente os ácidos fenólicos e flavonoides, que estão mais concentrados no revestimento do grão (AWIKA; DUODU, 2017). Assim, esta leguminosa apresenta elevada atividade antioxidante, bem estabelecida na literatura (BARROS et al., 2017; CAVALCANTE et al., 2017; MARATHE et al., 2011; MOREIRA-ARAÚJO et al., 2017; NDERITU et al., 2013).

Por outro lado, Fabbri e Crosby (2016) relataram que as leguminosas contêm diversos anti nutrientes ou fatores antinutricionais, sendo necessário antes da sua utilização um método de processamento térmico adequado para redução ou eliminação desses compostos. Pallermo, Pellegrini e Fogliano (2014) em extensa revisão da literatura demonstraram que a cocção promoveu mudanças no conteúdo de fitoquímicos dos vegetais, com o aumento ou redução destes componentes químicos.

É consenso na literatura que a cocção reduz o conteúdo de compostos fenólicos em leguminosas, como o feijão-caupi (ADEBOOYE; SINGH, 2007; BARROS et al., 2017; CAVALCANTE et al., 2017; MTOLO; GERRANO; MELLEME, 2017; YADAV et al., 2018). Zhao et al. (2019) justificaram que esta diminuição pode ser devida à lixiviação de polifenóis hidrossolúveis para a água de cozimento, ou então às mudanças estruturais de compostos fenólicos que ocorrem durante o processamento térmico. Assim, os fitoquímicos são influenciados pelos métodos de cocção e, como resultado, a atividade antioxidante do alimento também é afetada. A cocção do feijão-caupi não produz um caldo espesso, e a maioria das preparações culinárias na qual esta leguminosa é utilizada, o caldo é desprezado.

Além disso, para que estes compostos exerçam os benefícios esperados à saúde humana deve ser levado em consideração o estado bioquímico em que esses chegam à corrente sanguínea e atingem tecidos alvos. Assim, é de grande importância o entendimento do destino dos compostos bioativos do alimento no trato gastrointestinal (TGI) durante a digestão. Nesse aspecto, a bioacessibilidade dos nutrientes representa a quantidade de um composto liberado da matriz alimentar e solubilizado na fase aquosa (quimo), que está disponível para absorção na circulação sistemática por meio da parede do intestino (DUPONT, 2016; LUCAS-GONZÁLEZ et al., 2018).

Atualmente, os métodos de simulação da digestão gastrointestinal podem ser realizados *in vivo* ou *in vitro*. Devido às restrições éticas e econômicas dos métodos *in vivo*, os modelos de digestão gastrointestinal (DG) *in vitro* são vistos como uma alternativa interessante, pois podem reproduzir, com precisão, as condições bioquímicas de diferentes fases envolvidas no processo de digestão (ALMINGER et al., 2014; LUCAS-GONZÁLEZ et al., 2018; MINEKUS et al., 2014).

De acordo com a literatura, a DG *in vitro* afetou de forma positiva o conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante nos grãos de feijão-caupi. Hachibamba et al. (2013) e Mtolu, Gerrano e Mellem (2017) observaram que após a DG simulada houve um aumento da quantidade de compostos antioxidantes acessíveis e a absorção de componentes benéficos dos grãos de feijão-caupi cozido no nível intestinal.

A investigação da funcionalidade *in vitro* dos compostos fenólicos presentes nos grãos de feijão-caupi é escassa. Não existem estudos até o presente momento que abordem, em cada etapa do processo digestivo, o conteúdo de compostos bioativos e a atividade contra os radicais livres. Baseado em busca na literatura científica disponível, diversos grãos de cultivares de feijão-caupi ainda não foram avaliadas, entre elas as cultivares melhoradas geneticamente de forma convencional BRS Aracê, BRS Xiquexique e BRS Tumucumaque.

O valor nutritivo e funcional dos grãos de feijão-caupi sofre influência de vários fatores, tais como o processamento térmico e a digestão. Nessa perspectiva, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito da simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* sobre o conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante nos grãos das cultivares de feijão-caupi BRS Aracê, BRS Xiquexique e BRS Tumucumaque, antes e após a cocção.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a bioacessibilidade *in vitro* de compostos fenólicos e atividade antioxidante em grãos crus e cozidos de cultivares de feijão-caupi biofortificadas.

2.2 ESPECÍFICOS

- Analisar o teor de compostos fenólicos, flavonoides e proantocianidinas totais e atividade antioxidante antes e após a cocção de grãos de três cultivares de feijão-caupi biofortificadas.
- Determinar os teores de compostos fenólicos, flavonoides e proantocianidinas totais e atividade antioxidante nas quatro fases do processo digestivo (oral, gástrica, duodenal e colônica), nos grãos crus e cozidos de três cultivares de feijão-caupi biofortificadas.
- Identificar os ácidos fenólicos antes e após a digestão *in vitro*, nos grãos crus e cozidos de três cultivares de feijão-caupi biofortificadas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.)

3.1.1 Origem, Classificação e Importância econômica

O feijão-caupi é uma planta da família Leguminosae, gênero *Vigna*, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp., subespécie *unguiculata*. Devido à existência de grande variabilidade genética, as cultivares brasileiras são classificadas em cinco cultigrupos, a saber: Unguiculata, Biflora, Sesquipedalis, Textilis e Melanophthalmus. Na produção de grãos secos, a maioria dos cultivares brasileiros provém dos cultigrupos Unguiculata e Melanophthalmus (FREIRE-FILHO et al., 2017).

O feijão-caupi é uma das culturas de grãos de leguminosas mais importantes nas regiões do semiárido e trópicos que cobrem a Ásia, a África, o sul da Europa, América Central e do Sul, amplamente cultivada como cultura polivalente que é utilizada não só para a alimentação humana e medicina, mas também como ração animal (SPRENT; ODEE; DAKORA, 2010). Segundo dados da *Food and Agricultural Organization* (FAO), os três maiores produtores mundiais de feijão-caupi estão no continente africano, sendo a Nigéria (2,6 milhões de toneladas), Niger (950 mil toneladas) e Burkina Faso (405 mil toneladas) (FAO, 2017). No entanto, estes dados de produção podem estar subestimados em razão de países como Brasil, por exemplo, e outros não apresentarem estatísticas separadas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), apesar de apresentarem volume expressivo de produção.

O Brasil figura como o quarto maior produtor mundial, com uma área plantada de 1.282.258 hectares (ha), 479.011 toneladas de produção e produtividade de 374 kg/ha. De acordo com o 11º levantamento realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2018), referente à safra 2017/2018 de grãos no Brasil, os dados são bem mais promissores, com a produção de feijão-caupi nesse período de 848,3 mil toneladas, produzidas em 1.520,3 mil/ha, com uma produtividade média de 558 kg/ha.

Freire-Filho et al. (2017) relataram que no Brasil, o feijão-caupi foi introduzido no século XVI pelos colonizadores portugueses, no estado da Bahia e, posteriormente, expandiu-se para outros estados. Atualmente, a produção da leguminosa está em constante expansão, principalmente para as áreas do cerrado das regiões Sudeste e Centro-Oeste. Nestas, o caupi é cultivado na forma de safrinha

por pequenos e médios produtores, com a mesma tecnologia utilizada na produção da soja.

Para Rocha, Damasceno-Silva e Menezes-Júnior (2017), a expansão do feijão-caupi nos cerrados do Brasil deve-se ao desenvolvimento de novas tecnologias para o cultivo mecanizado, bem como o melhoramento genético que vem sendo desenvolvido para a obtenção de cultivares com arquitetura moderna de planta, ciclo de maturação mais precoce e uniforme, além de melhor qualidade sensorial e tecnológica dos grãos.

O feijão-caupi é utilizado para várias finalidades e em diversos sistemas de produção. Este pode ser comercializado como grãos secos (mercado principal), grãos imaturos (feijão fresco ou feijão verde), farinha para acarajé e sementes. O mercado do feijão-caupi gira em torno, principalmente da produção de grãos secos e imaturos. Bastante apreciado por seu sabor e cozimento mais fácil, é utilizado em vários pratos típicos da região Nordeste, sendo o baião-de-dois o mais popular, prato típico onde o feijão-caupi e o arroz são cozidos juntos (ANDRADE et al., 2010).

Devido a variações fenotípicas em seus grãos, como a cor de tegumento por exemplo, o feijão-caupi recebe muitos nomes populares no Brasil que variam de acordo com a região do país. É conhecido popularmente como feijão-de-corda, feijão macassa ou feijão macassar, na região Nordeste; feijão-de-praia, feijão-da-estrada ou feijão-da-colônia, na região Norte; feijão-miúdo, na região Sul; feijão catador e feijão gurutuba, em algumas regiões do Estado da Bahia e norte de Minas Gerais; e feijão fradinho, no Estado do Rio de Janeiro (NEVES et al., 2011).

Em virtude dos diferentes tipos de feijão-caupi comercializados, surgiu à necessidade de padronização da classificação da cultura, conforme mostra o Quadro 1. Nesta classificação, o feijão-caupi é dividido em classes e subclasses comerciais, de acordo com a coloração do tegumento.

Quadro 1 - Classes e subclasses comerciais e características dos grãos de feijão-caupi.

Classe⁽¹⁾	Subclasse⁽²⁾	Característica do grão⁽²⁾
Branco	Branco liso	Tegumento branco e liso
	Branco rugoso	Tegumento branco e rugoso
	Fradinho	Tegumento branco, rugoso com halo preto
	Olho-marrom	Tegumento branco, podendo ser liso ou rugoso com halo marrom
	Olho-vermelho	Tegumento branco, podendo ser liso ou rugoso com halo vermelho
Preto	Preto-fosco	Tegumento preto, liso e fosco
	Preto-brilhoso	Tegumento preto, liso e brilhoso
Cores	Mulato liso	Tegumento marrom e liso
	Mulato rugoso	Tegumento marrom e rugoso
	Canapu	Tegumento marrom-claro, liso, comprimido nas extremidades
	Sempre-verde	Tegumento esverdeado-claro e liso
	Verde	Tegumento e/ou cotilédones verdes
	Manteiga	Tegumento creme-amarelo, liso ou levemente enrugado
	Vinagre	Tegumento vermelho e liso
	Azulão	Tegumento azulado e liso
	Corujinha	Tegumento mosqueado cinza ou azulado liso
	Rajado	Tegumento de cor marrom, liso com rajas longitudinais mais escuras
Misturado		Produto com grãos de diferentes classes e subclasses

Fonte: FREIRE-FILHO et al. (2017).

3.1.2 Melhoramento genético do feijão-caupi

O melhoramento genético desta leguminosa tem como objetivo principal, o desenvolvimento de novas cultivares que se adequem a diferentes perfis de

agricultores e consumidores. Dessa forma, busca em curto prazo, desenvolver cultivares de arquitetura diversificada, aumentar a produção de grãos, resistência às doenças e pragas, às altas temperaturas e estresses hídricos. Além disso, há uma preocupação em aumentar os níveis de nutrientes importantes para a população, como proteína, ferro, zinco, fibra e bem como o conteúdo de compostos bioativos, sem esquecer sua qualidade visual e culinária (FREIRE FILHO et al., 2011).

Os primeiros estudos gerais envolvendo o melhoramento genético do feijão-caupi no Brasil iniciaram-se no ano de 1925. Entre os anos de 1963 a 1973, após intensos estudos envolvendo Institutos de Pesquisas e Universidades, houve a liberação das primeiras cultivares de feijão-caupi no Brasil, realizada pela Universidade Federal do Ceará. Um marco importante ocorreu no ano de 1991, onde a Embrapa montou uma equipe de trabalho com feijão-caupi, que passou a ser liderada pela Embrapa Meio-Norte, em Teresina, Piauí. Atualmente, a rede de trabalho passou por uma ampliação, incluindo todos os estados da região Norte, Nordeste e os estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo. Foi possível verificar durante todos esses anos grandes avanços na qualidade dos grãos, resistência a vírus, arquitetura da planta e precocidade, viabilizando a cadeia produtiva em larga escala de forma mecanizada no cerrado brasileiro (FREIRE FILHO et al., 2011; SANTANA, 2017).

No Brasil, foram lançadas 73 cultivares melhoradas de feijão-caupi, por diferentes programas de melhoramento genético de Instituições públicas, em sua grande maioria pela Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária (Embrapa). No Brasil, a Embrapa Meio-Norte é o centro de referência em pesquisa com o feijão-caupi, localizada na região Nordeste do país (Teresina-Piauí), e possui um Banco Ativo de Germoplasma, com aproximadamente, 4.000 acessos. A coleção de base possui 4.153 acessos e são mantidos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília-Distrito Federal) (OLIVEIRA, 2018; ROCHA; DAMASCENO-SILVA; MENEZES-JÚNIOR, 2017).

3.1.2.1 Biofortificação

O programa de melhoramento de feijão-caupi da Embrapa Meio-Norte tem como um dos objetivos a biofortificação do grão para os teores de proteínas, ferro e zinco. Os programas de biofortificação BioFort e HarvestPlus tem como foco maior os

microminerais ferro e zinco. Como resultados já foram lançadas três cultivares de feijão-caupi com altos teores de ferro e zinco: BRS Aracê, BRS Tumucumaque e BRS Xiquexique.

A cultivar BRS Aracê (Figura 1) enquadra-se na classe comercial cores e subclasse comercial verde, porte da planta semi-prostrado, com grãos de forma arredondada, cor verde-oliva, tegumento liso, vagens de cor roxa, ciclo para maturação de 70-75 dias e altos teores de proteína (25%) ferro e zinco (BRS Aracê..., 2009). Representa uma boa opção para o mercado de grãos secos e imaturos (feijão-verde) (ROCHA; DAMASCENO-SILVA; MENEZES-JÚNIOR, 2017).



Figura 1 – Grãos da cultivar BRS Aracê. Fonte: A autora.

A cultivar BRS Tumucumaque (Figura 2) enquadra-se na classe comercial branco e subclasse comercial branco-liso, porte da planta semiereto, com grãos de forma levemente reniforme, cor branca, tegumento liso, vagens de cor roxa, ciclo para maturação de 65-70 dias, bom teor de proteína (23,5%) e altos teores de ferro e zinco (BRS Tumucumaque..., 2009). Representa uma boa opção para o mercado de grãos secos e imaturos (feijão-verde) (ROCHA; DAMASCENO-SILVA; MENEZES-JÚNIOR, 2017).



Figura 2 – Grãos da cultivar BRS Tumucumaque. Fonte: A autora.

A cultivar BRS Xiquexique (Figura 3) enquadra-se na classe comercial branco e subclasse comercial branco-liso, porte da planta semi-prostrado, com grãos de forma arredondada, cor branca, tegumento liso, vagens de cor amarelo-avermelhada, ciclo para maturação de 65-75 dias, bom teor de proteína (23,23%) e altos teores de ferro e zinco (BRS Xiquexique..., 2008). Esta cultivar é uma opção no combate às carências nutricionais, como a deficiência de micronutrientes (ROCHA; DAMASCENO-SILVA; MENEZES-JÚNIOR, 2017).



Figura 3 – Grãos da cultivar BRS Xiquexique. Fonte: A autora.

Oliveira (2016) avaliou a adaptabilidade e estabilidade das concentrações de ferro e zinco e a qualidade química em 10 linhagens e duas cultivares de feijão-caupi, em ensaios de validação conduzidos em municípios dos Estados do Piauí e Maranhão. Como resultados, observou-se que a cultivar BRS Xiquexique e as linhagens MNC04-762F-9 e MNC04-774F-78 apresentaram as maiores concentrações de ferro e zinco no grão, além de elevada adaptabilidade e estabilidade nos ambientes avaliados.

Baseado no exposto, o melhoramento genético do feijão-caupi é importante devido ao desenvolvimento e lançamento no mercado de cultivares com melhor valor nutritivo e funcional, podendo auxiliar na prevenção de doenças carenciais e crônicas não transmissíveis (DCNT's), além de grãos com forma, cor, tamanho e características tecnológicas que atendam às exigências do mercado.

3.1.3 Qualidade nutritiva e compostos bioativos do feijão-caupi

O feijão-caupi é uma excelente fonte de proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais, fibras alimentares, além de apresentar baixa quantidade de gordura e um bom perfil de aminoácidos, sendo que o teor destes nutrientes pode variar de acordo com as práticas agronômicas realizadas na cultura e manejo pós-colheita (ANDRADE JÚNIOR et al., 2002). Em relação aos ácidos graxos, destaca-se o palmítico (50%), seguido dos ácidos esteárico, oleico e linoleico, sendo este último um ácido graxo essencial (SALGADO; LIVEIRA; GUERRA, 2008).

Entretanto, Carvalho et al. (2012) destacaram que o feijão-caupi possui algumas propriedades indesejáveis que são comuns a outras sementes de leguminosas, como a deficiência dos aminoácidos metionina e cisteína, bem como consideráveis conteúdos de fatores antinutricionais como inibidores de protease, lectinas, ácido fítico, taninos, entre outros.

Os grãos de feijão-caupi também contêm compostos bioativos que são benéficos para a saúde humana, como os compostos fenólicos. Estes se concentram no tegumento da semente e têm o potencial de proteger o corpo contra doenças crônicas não transmissíveis. Dentre os principais tipos de compostos fenólicos presentes, destacam-se os ácidos fenólicos e flavonoides (SOMBIÉ et al., 2018).

Diversos estudos foram realizados para a caracterização dos compostos bioativos no feijão-caupi, conforme mostrado no Quadro 2.

Quadro 2 – Composição de polifenóis nos grãos de cultivares de feijão-caupi.

Compostos fenólicos	Solvente	Cultivar	Produto	Teores	Referência
Polifenóis totais	Metanol 80%	Vermelha	Farinha	2,086 ± 0,058 mg EAG/100 g	Marathe et al. (2011)
	Metanol 80%	Marrom	Farinha	6,378 ± 0,054 mg EAG/100 g	Marathe et al. (2011)
	Metanol 80%	Texas cream 40 (creme)	Farinha	46.48 ± 0.78 mg EAG/100 g	Adjei-Fremah et al. (2015)
	Metanol 80%	Mississippi silver (marrom)	Farinha	269,39 ± 1,35 mg EAG/100 g	Adjei-Fremah et al. (2015)
	Metanol 80%	C4 (branca)	Farinha	480,195± 15,286 mg.kg ⁻¹	Dalaram (2015)
	Metanol 80%	C1 (branca)	Farinha	721,952 ±25,004 mg.kg ⁻¹	Dalaram (2015)
	Metanol 80%	C5 (vermelha)	Farinha	825,703 ± 8,493 mg.kg ⁻¹	Dalaram (2015)
	Metanol (50%)- Acetona (70%)	BRS Tumucuma que	Farinha	177 ± 0,78 mg EAG/100 g	Moreira-Araújo et al. (2017)
	Metanol (50%)- Acetona (70%)	Pingo de Ouro, 1-2	Farinha	437 ± 2,48 mg EAG/100 g	Moreira-Araújo et al. (2017)
	Acetona 80%	TVU 14676 (marrom)	Farinha	692,03 ± 9,58 mg EAG/100 g	Sombié et al. (2018)
	Acetona 80%	CR06-07 (vermelha)	Farinha	250,84 ± 19,79 mg EAG/100 g	Sombié et al. (2018)
	Metanol (50%)- Acetona (70%)	BRS Xiquexique	Farinha	199,05 ± 1,98 mg EAG/100 g	Moreira-Araújo et al. (2018)
Fenólicos livres	Etanol 80%	preta	Farinha	75,57 ± 2,59 mg EAG/100 g	Gutiérrez-Uribe, Romo-Lopez e Serna-Saldívar (2011)
Flavonoides totais	Acetona 70%	Agrinawa (vermelha)	Farinha	211,03 ± 3,50 ug/g	Nderitu et al. (2013)
	Acetona 70%	Agrinawa (vermelha)	Cozido	163,24 ± 2,33 ug/g	Nderitu et al. (2013)
	Acetona 70%	Black-eye (creme)	Farinha	34,01 ± 2,50 ug/g	Nderitu et al. (2013)
	Acetona 70%	Black-eye (creme)	Cozido	19,94 ± 0,26 ug/g	Nderitu et al. (2013)

Quadro 2 (Continuação) – Composição de polifenóis nos grãos de cultivares de feijão-caupi.

Compostos fenólicos	Solvente	Cultivar	Processamento	Teores	Referência
Flavonoides totais	Água	Oloka	Farinha	0,81%±0,014	Aziagba et al. (2017)
	Metanol (50%)- Acetona (70%)	BRS Tumucumaque	Farinha	45,8 ± 0,31 mg EQ/100 g	Moreira-Araújo et al. (2017)
	Metanol (50%)- Acetona (70%)	Pingo de Ouro, 1-2	Farinha	6,44 ± 0,15 mg EQ/100 g	Moreira-Araújo et al. (2017)
	Metanol (50%)- Acetona (70%)	BRS Xiquexique	Farinha	67,96 ± 0,54 mg EQ/100 g	Moreira-Araújo et al. (2018)
	Acetona 80%	TVU 14676 (marrom)	Farinha	20,10 ± 0,96 mg EQ/100 g	Sombié et al. (2018)
	Acetona 80%	CR06-07 (vermelha)	Farinha	20,86 ± 0,55 mg EQ/100 g	Sombié et al. (2018)
	Metanol 70%	15 cultivares homozigotas	Farinha	363,6 a 453,9 mg de equivalente de rutina por 100 g	Nassourou et al. (2016)
Flavonoides livres	Etanol 80%	preta	Farinha	97,50 ± 2,00 mg EQ/100 g	Gutiérrez-Uribe, Romo-Lopez e Serna-Saldívar (2011)

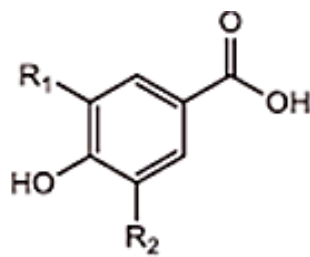
Legenda: EAG – Equivalentes em Ácido Gálico; EQ – Equivalentes em Quercetina.

Conforme o Quadro 2, observou-se teores de compostos fenólicos variáveis entre os estudos. Para Deng et al. (2013), os teores de compostos bioativos em frutas, hortaliças e leguminosas são influenciados por muitos fatores, incluindo região geográfica, clima e condições de armazenamento. Além disso, Awika e Duodu (2017) enfatizaram que o teor de compostos fenólicos no feijão-caupi varia significativamente dependendo do fenótipo, bem como os métodos e padrões usados para extração e técnicas de processamento térmico aplicados.

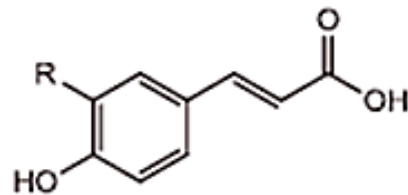
Devido ao crescente interesse nos benefícios à saúde, os compostos fenólicos presentes nos grãos de feijão-caupi têm sido objeto de muitos estudos. Estes

compostos são benéficos para a saúde humana e animal devido às suas propriedades antioxidante (ADJEI-FREMAH et al., 2015; SOMBIÉ et al., 2018), anti-inflamatória (OJWANG et al., 2015), anticancerígena (GUTIÉRREZ-URIBE; ROMO-LOPEZ; SERNA-SALDÍVAR, 2011), antiaterogênica (CUI et al., 2012), hipoglicêmica e hipotensora (SREERAMA; SASHIKALA; PRATAPE, 2012).

Nos grãos de feijão-caupi, os ácidos fenólicos são os principais componentes da grande classe de compostos fenólicos. Os ácidos fenólicos são importantes metabólitos secundários das plantas que funcionam como componentes estruturais da parede celular, intermediários da biossíntese e de moléculas de sinalização, bem como atuam na defesa da planta. Na sua estrutura química, eles são formados por um anel fenólico e um grupo ácido carboxílico. No feijão-caupi, os principais ácidos fenólicos obtidos são derivados do ácido cinâmico ou benzoico (NDERITU et al., 2013), conforme mostrado na Figura 4.



Derivados do ácido benzoico:
 $R_1 = R_2 = H$, ácido *p*-hidroxibenzoico
 $R_1 = R_2 = OH$, ácido gálico
 $R_1 = OH, R_2 = H$, ácido protocatecoico



Derivados do ácido cinâmico:
 $R = H$, ácido *p*-cumárico
 $R_1 = OH$, ácido cafeico
 $R_1 = OCH_3$, ácido ferúlico

Figura 4 - Estruturas químicas dos principais ácidos fenólicos (derivados do ácido benzoico e cinâmico) identificados no feijão-caupi.

Fonte: AWIKA e DUODU (2012) adaptado.

Alguns estudos demonstraram os tipos de compostos fenólicos presentes em grãos de cultivares de feijão-caupi cruas. Cai, Hettiarachchy e Jalaluddin (2003) ao avaliarem dezessete variedades de feijão-caupi cultivadas no Arkansas, identificaram o ácido protocatecoico como o principal ácido fenólico presente nas formas esterificadas, com conteúdo variando de $9,3 \pm 1,3$ mg/100 g a $92,7 \pm 0,8$ mg/100 g. No estudo de Gutiérrez-Urbe, Romo-Lopez e Serna-Saldívar (2011), os autores verificaram em grãos de cultivar de feijão-caupi com tegumento preto, comercializada

em Yucatan no México, a presença de ácidos fenólicos livres, que foram os ácidos ferúlico ($26,25 \pm 3,47$ ug/g) e cumárico ($1,25 \pm 0,52$ ug/g). Na pesquisa de Zia-Ul-Haq et al. (2013), verificou-se a presença dos ácidos neoclorogênico, clorogênico e cafeico em quatro cultivares de feijão-caupi no Paquistão.

Para grãos de cultivares cruas e biofortificadas com os minerais ferro e zinco, em estudo de Moreira-Araújo et al. (2017) obtiveram $45,4 \pm 2,667$ mg/100 g de ácido gálico e $27,8 \pm 2,991$ mg/100 g de ácido cafeico na cultivar BRS Tumucumaque; os mesmos autores verificaram na cultivar BRS Xiquexique elevados teores de ácidos gálico ($67,19 \pm 6,200$ mg/100 g) e ferúlico ($32,07 \pm 0,753$ mg/100 g) (MOREIRA-ARAÚJO et al., 2018).

As composições químicas e funcionais presentes nos grãos do feijão-caupi variam consideravelmente de acordo com fatores ambientais e genéticos. Assim, torna-se de fundamental importância a identificação e quantificação dos principais compostos fenólicos presentes nas novas cultivares desenvolvidas por meio de melhoramento genético.

3.2 Efeito da cocção no conteúdo de compostos bioativos

O feijão-caupi tem seu consumo limitado devido à presença de certos fatores antinutricionais, como os compostos fenólicos, taninos e ácido fítico. Os taninos inibem a digestibilidade proteica, enquanto o ácido fítico reduz a biodisponibilidade de alguns minerais essenciais. Assim, torna-se necessário o processamento térmico antes do seu consumo, pois os estudos demonstraram que os diferentes métodos de cocção melhoram a qualidade nutricional de leguminosas em extensões variáveis (AVANZA et al., 2013).

Para Zhao et al. (2019), os benefícios do processamento dos alimentos são inúmeros, como a melhoria da segurança alimentar, aumento do valor nutricional e a formação ou liberação de fitoquímicos naturais com propriedades funcionais e bioativas (ou seja, propriedades antioxidantes ou antimicrobianas). Entretanto, pode resultar em algumas consequências indesejadas, como a perda de nutrientes e a formação de compostos tóxicos com efeitos negativos no sabor, textura ou cor do alimento.

Diversos estudos já foram realizados com o objetivo de verificar os efeitos das diferentes técnicas de cocção nas propriedades nutritivas e funcionais das

leguminosas. Dentre estas incluem-se: cozinhar a vapor, sob pressão e no micro-ondas, assar, ferver, fritar e refogar (FABBRI; CROSBY, 2016). As condições empregadas na cocção levam à indução de uma série de mudanças nas propriedades físicas, composição química e modificações enzimáticas dos alimentos, conforme relataram Zhao et al. (2019).

López-Martínez et al. (2017) enfatizaram também que é possível ocorrer a redução dos compostos bioativos de leguminosas após a cocção devido a rearranjos químicos, como a ligação de compostos fenólicos com outras substâncias orgânicas ou a lixiviação de compostos fenólicos solúveis em água na água de cozimento. Por isso, Barros et al. (2017) alertaram a importância do consumo de feijão-caupi mais o caldo de cocção, para maior retenção dos compostos com propriedades antioxidantes.

Considerando a atividade sequestradora de radicais livres, o uso de altas temperaturas pode melhorar as propriedades antioxidantes dos compostos que ocorrem naturalmente ou à formação de novos compostos, como os produtos da reação de *Maillard* ou *Maillard Reaction Products* (MRPs), que geralmente exibem elevadas propriedades antioxidantes; ou pode implicar inativação de peroxidases que possuem propriedades pró-oxidantes, aumentando assim, a atividade antioxidante do alimento (MURADOR et al., 2018).

Para o grão de feijão-caupi, diversos estudos demonstraram que a cocção diminui o conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (BARROS et al., 2017; CAVALCANTE et al., 2017; MTOLO; GERRANO; MELLEEM, 2017; YADAV et al., 2018). O efeito final da cocção na concentração dos compostos bioativos depende dos parâmetros utilizados no processamento (tempo e temperatura), da estrutura da matriz alimentar e a natureza química do composto específico.

Adebooye e Singh (2007) concluíram em seu estudo com duas variedades de feijão-caupi (C-152 e S-1552) que a descorticação e cozimento resultaram em perdas significativas de taninos, compostos fenólicos e fitatos. Contudo, a cocção não afetou a composição mineral (Ca, Fe, Mn, Zn, K, Mg e Cu), ao passo que houve perdas significativas nos teores de minerais com a retirada do tegumento.

No estudo de Barros et al. (2017), que objetivou analisar o efeito da cocção nos níveis de compostos bioativos e atividade antioxidante em três cultivares de feijão-caupi (BRS Aracê, BRS Tumucumaque e BRS Xiquexique), foram observadas perdas significativas destes compostos após a cocção, com elevada transferência destes para o caldo.

Entretanto, em pesquisa desenvolvida por Cavalcante et al. (2017) com cinco cultivares de feijão-caupi (BRS Marataoã, BR 17-Gurguéia, BRS Itaim, BRS Cauamé e BRS Guariba), houve um aumento no teor de compostos fenólicos considerando o grão cozido mais o caldo de cocção, que pode ter sido resultado de maior solubilização e extração dos compostos, devido ao amolecimento ou ruptura das células vegetais. Os maiores níveis destes compostos foram verificados nas cultivares BRS Marataoã e BR 17-Gurguéia.

Yadav et al. (2018), ao avaliarem os efeitos de tratamentos térmicos (autoclavagem, micro-ondas, fervura e torrefação) e não térmicos (imersão e fermentação) em quatro cultivares de feijão-caupi (EC4216, BL2, Kohinoor e Gomati) verificaram que o processamento térmico reduziu o conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides totais e atividade antioxidante (*Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP*). De todos os tratamentos usados, a fermentação aumentou a retenção de compostos bioativos e a atividade antioxidante das cultivares analisadas.

Assim, não há um consenso na literatura a respeito dos efeitos da cocção sobre as propriedades nutritivas e funcionais das leguminosas, como o feijão-caupi. Sendo de grande importância a verificação do efeito do processamento térmico nas características nutritivas e funcionais desta leguminosa.

3.3 Bioacessibilidade e biodisponibilidade em matrizes alimentares

A nutrição humana compreende um conjunto de processos que envolvem desde a ingestão do alimento até a sua assimilação e absorção celular. Os efeitos benéficos deste dependem do aporte de nutrientes contidos nos alimentos ingeridos. Entretanto, devido à complexidade de fatores envolvidos durante as diversas etapas da nutrição, sabe-se que a quantidade de um nutriente presente na dieta é diferente da quantidade do mesmo que é utilizada pelo organismo (BOLAND, 2016).

Neste sentido, torna-se importante distinguir os termos biodisponibilidade e bioacessibilidade. O termo biodisponibilidade refere-se à absorção, distribuição, o metabolismo, tempo de meia vida efetiva, os mecanismos de ativação e inativação e a excreção do composto em questão (OLIVEIRA; BASTOS, 2011). Segundo Tognon (2012), a bioacessibilidade refere-se à quantidade de um nutriente presente em um alimento liberada no TGI durante a digestão. Considerando o total bioacessível,

apenas uma fração tornar-se-á disponível para funções fisiológicas ou para uso posterior, ou seja, biodisponível.

A bioacessibilidade de um composto é dependente tanto do processo de digestão, incluindo fatores como a composição química de fluidos digestivos, potencial hidrogeniônico (pH), acidez, períodos de tempo de permanência do alimento em cada etapa do processo, quanto depende da liberação a partir da matriz alimentar (concentração inicial no alimento, composição e interações com a matriz), considerando as condições *in vivo* como as *in vitro* (ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012; HELAL et al., 2014). Entretanto, a biodisponibilidade depende da bioacessibilidade do composto e da sua capacidade de atravessar a mucosa intestinal (HELAL et al., 2014).

3.3.1 Sistema digestivo e fatores de interação

A digestão permite que os alimentos sejam reduzidos em partículas menores até se tornarem pequenas o suficiente para serem absorvidas. Esta função de absorção é desenvolvida, principalmente, pelo intestino, particularmente pelo intestino delgado (CÔRREA, 2011). Na digestão dos alimentos, implicam-se dois processos principais que ocorrem simultaneamente: a transformação mecânica, em que pedaços maiores de comida são divididos em pedaços menores, que começa na boca e continua no estômago; e a transformação enzimática, em que várias enzimas diferentes reduzem macromoléculas em moléculas menores para serem absorvidas, começando da boca até no intestino (ALMINGER et al., 2014).

O TGI é composto pela boca, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado, o qual é dividido em duodeno jejuno e íleo, intestino grosso, que é composto por ceco, cólon e reto, e ânus. Além destes, também estão associados ao TGI outros órgãos e glândulas que atuam diretamente no processo de digestão, como o fígado e o pâncreas (HENDRY et al., 2014; JOHNSTONE et al., 2014).

O processo de digestão inicia-se na boca, onde, através da mastigação ocorre a redução das partículas alimentares, com o auxílio da enzima amilase. Em seguida, o bolo alimentar percorre a região da faringe, neste momento a válvula epiglote é responsável pelo fechamento da laringe (canal respiratório), permitindo a passagem do bolo alimentar em direção ao esôfago, que por meio dos movimentos peristálticos empurram o alimento para o estômago (BOLAND, 2016).

No estômago, tem-se a atividade do ácido clorídrico (pH 2,0) e da enzima pepsina, que atua em meio ácido clivando as moléculas de polipeptídios. Nesta fase, o bolo alimentar permanece durante um período de 2 a 4 horas, formando o quimo, caracterizado pela sua acidez própria e textura pastosa e coloração esbranquiçada. Após a digestão, o quimo formado no estômago é direcionado para o intestino delgado, principal sítio de digestão de nutrientes. Secreções que contém bicarbonato de sódio e enzimas digestivas elevam o pH para dar continuidade ao processo digestivo de proteínas, lipídios e amido (HENDRY et al., 2014; JOHNSTONE et al., 2014).

Logo após a digestão no intestino delgado, os restos alimentares não digeridos chegam ao intestino grosso, local onde continua ocorrendo a absorção de água e onde as bactérias colônicas podem continuar a digestão dos restos de alimentos que resistiram às fases anteriores e produzir alguns nutrientes, principalmente vitaminas, entretanto, esta contribuição para o estado nutricional é mínima. Nessa etapa, também são formadas as fezes que são eliminadas do corpo através do ânus (BOLAND, 2016).

3.3.1.1 Sistema gastrointestinal *in vitro*

Ensaio *in vivo* de bioacessibilidade e biodisponibilidade são muitas vezes de alto custo, trabalhosos e demorados, além de serem limitados devido a considerações éticas. Assim, foram desenvolvidos sistemas *in vitro* que permitem a previsão de alterações fitoquímicas durante a DG. Estes métodos permitiram o rastreamento de um número comparativamente grande de amostras e/ou condições, estudando os impactos separados e combinados de cada estágio da digestão na liberação e disponibilidade de fitoquímicos, o que dificilmente seria possível estudar *in vivo* (ALMINGER et al., 2014).

Os estudos *in vitro* simulam as condições fisiológicas e os eventos que ocorrem durante a digestão no TGI humano. Os estudos de bioacessibilidade são úteis para avaliar possíveis interações entre os nutrientes e o composto de interesse, bem como, o efeito do processamento, cultivar, condições de cultivo sobre a matriz do alimento e seu impacto sobre a bioacessibilidade do composto de interesse (ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012).

Nas técnicas de simulação de DG *in vitro*, um método é aplicado sobre a amostra alimentar, reproduzindo as condições fisiológicas que ocorrem durante a digestão humana, levando em consideração as três áreas do sistema digestivo (boca, estômago e intestino) e considerando os principais fatores da simulação, como por exemplo, a temperatura, velocidade de agitação, a composição química e enzimática da saliva e dos sucos gástrico, duodenal e biliar. Após esta, o produto resultante é destinado à quantificação do composto de interesse, permitindo assim avaliar sua bioacessibilidade (WITTSIEPE et al., 2001), a partir da sua matriz durante o trânsito gastrointestinal (HUR et al., 2011).

O primeiro modelo de simulação da DG foi desenvolvido por Miller et al. (1981), para o estudo da bioacessibilidade do ferro. Desde então, foram criados vários modelos diferentes, o que dificultou a comparação dos resultados entre os estudos e aumentou as chances de obtenção de resultados contraditórios. Os modelos empregados diferem principalmente na inclusão de vários estágios de digestão (oral, gástrico, intestino delgado, intestino grosso); tempos de digestão; pH; a natureza das enzimas digestivas envolvidas; e concentrações de eletrólitos e ácidos biliares (ALMINGER et al., 2014).

Para Dupont (2016), os modelos *in vitro* podem ser estáticos ou dinâmicos. Os modelos estáticos são operados com concentrações pré-fixadas e volumes de materiais digeridos, sais, enzimas e dentre outros, enquanto que os modelos dinâmicos mimetizam as mudanças contínuas nas condições físico-químicas e visam simular a passagem do bolo alimentar por meio do TGI. No entanto, esses modelos são muito mais trabalhosos e custosos do que os modelos estáticos.

Para minimizar a dificuldade de comparação entre os diferentes protocolos de modelos de digestão estáticos, a rede de Cooperação Europeia em Ciência e Tecnologia (*European Cooperation in Science & Technology - COST*) propôs uma ação que foi denominada de INFOGEST, com o objetivo de disseminar e melhorar os conhecimentos básicos atuais sobre digestão de alimentos, sobre a liberação durante a digestão de componentes benéficos à saúde humana e para promover a harmonização dos modelos de digestão usados atualmente. Assim, foi proposto um método de digestão estática padronizado baseado em condições relevantes que podem ser aplicadas para várias finalidades. Todos os parâmetros do protocolo (pH, duração das diferentes etapas, concentrações de enzimas, etc.) são baseados em dados humanos disponíveis e foram amplamente discutidos durante mais de dois

anos para chegar a um consenso entre os especialistas. Este foi publicado por Minekus et al. (2014).

A literatura demonstrou que pode haver uma baixa correlação com resultados *in vivo*, enfatizando que os estudos *in vitro* não podem substituir os estudos *in vivo*, devendo ser considerados, portanto, como uma ferramenta de classificação ou categorização, fornecendo uma estimativa dos parâmetros de bioacessibilidade e biodisponibilidade que poderiam ser observados em estudos *in vivo* (ETCHEVERRY; GRUSAK; FLEIGE, 2012; HELAL et al., 2014).

3.3.2 Bioacessibilidade e biodisponibilidade de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, também conhecidos como polifenóis, compreendem um grupo de metabólitos, que geralmente estão envolvidos na defesa contra a radiação ultravioleta ou agressão por agentes patogênicos. Caracterizam-se pela presença de um ou mais anéis aromáticos ligados ao menos a um grupamento – OH e/ou outros substitutos (MANACH et al., 2004). De acordo com a estrutura química, podem ser feitas distinções entre os tipos de compostos fenólicos e estes podem ser classificados em: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e lignanas (VELDERRAIN-RODRÍGUEZ et al., 2014).

Chen et al. (2014) e Oliveira et al. (2009) sugeriram que estes compostos podem exercer numerosos efeitos benéficos *in vivo*, principalmente relacionados à elevada atividade antioxidante doando um átomo de hidrogênio ou um elétron para outros compostos, sequestrar os radicais livres e extinguir oxigênio *singlete*. Entretanto, os teores de compostos fenólicos presentes na dieta podem diferir significativamente quanto a biodisponibilidade e às propriedades biológicas. Devido a isso, o impacto da DG *in vitro* sobre a estabilidade dos compostos polifenólicos e, portanto, sobre suas propriedades antioxidantes, tem sido um dos tópicos mais amplamente examinados durante a última década (CHEN et al., 2014; DE ANCOS et al., 2017)

Os efeitos benéficos à saúde exercidos pelos polifenóis possuem fatores determinantes, sendo estes a estabilidade ao processo gastrointestinal e a sua bioacessibilidade (TAGLIAZUCCHI et al., 2010), isto inclui liberação da matriz alimentar, tamanho da partícula, transformações decorrentes da variação do pH, reações de oxidação e interações com os componentes da matriz, como as proteínas,

e até mesmo com outros polifenóis (ALMINGER et al., 2014). De maneira geral, o conteúdo bioacessível de um nutriente costuma ser menor do que aquele encontrado na matriz alimentar, já que durante o processo digestivo diversos fatores irão influenciar na estabilidade do composto (CARDOSO et al., 2015).

Em geral, a biodisponibilidade dos polifenóis da dieta é relativamente baixa (VELDERRAIN-RODRIGUEZ et al., 2014). Os ácidos fenólicos e alguns flavonoides, como por exemplo, flavonas, catequinas e quercetina apresentam menor peso molecular e, por este motivo, são mais facilmente absorvidos (MARTIN; APPEL, 2010). Em contrapartida, polifenóis com maior tamanho molecular, como por exemplo as proantocianidinas (taninos condensados), estes são absorvidos em menor quantidade, pois necessitam de uma hidrólise prévia (HACKMAN et al., 2008).

Ao iniciar a digestão na boca, os polifenóis sofrem pouca influência das enzimas salivares, devido ao pouco tempo de contato. Porém, durante esta primeira fase há redução no tamanho das partículas do alimento, que aumentam a superfície de contato para as outras enzimas das fases gástricas e intestinal (BOHN, 2014). A maioria dos polifenóis são separados da matriz alimentar durante a fase gástrica da digestão, pois o pH ácido induz a hidrólise e/ou transformação, como a hidrólise de oligômeros de proantocianidinas ou quebra de moléculas de açúcar ligadas a estrutura dos polifenóis (VELDERRAIN-RODRIGUEZ et al., 2014).

As mudanças que ocorrem nestes compostos durante a fase gástrica dependem da interação deles com a matriz dos alimentos e sua estrutura química. O intestino é o maior sítio de absorção e transformação dos polifenóis. Nesta fase, o pH do meio volta a ser alcalino (pH = 7,0) e por essa razão alguns polifenóis que não sofreram transformação substancial ou perda no estômago podem ser instáveis no meio alcalino do intestino, dependendo novamente da estrutura química (VELDERRAIN-RODRIGUEZ et al., 2014).

3.3.3 Estudos de bioacessibilidade em feijão-caupi

Os compostos fenólicos encontram-se presentes em várias plantas que compõem a dieta humana, sendo especialmente abundantes apenas em frutas, vegetais, grãos integrais e leguminosas, cacau, chá, café e vinhos tintos (WILLIAMSON, 2017). As leguminosas são amplamente consumidas em todo o mundo. No Brasil, o consumo de feijão é bastante elevado, já que este grão,

juntamente com o arroz, compõe a base da alimentação brasileira. O feijão-caupi é uma semente leguminosa que serve como uma fonte de proteína acessível, e por este fator, amplamente consumida em muitos países em desenvolvimento (ALUKO et al., 1997).

Estudos recentes têm demonstrado que os compostos fenólicos encontrados no feijão apresentam efeitos benéficos à saúde, devido a sua atividade antioxidante anti-inflamatória e também potencial para inibir enzimas relacionadas à absorção de glicose (MOJICA et al., 2015). Porém, deve-se ter cautela quando se relaciona os efeitos benéficos à saúde com os compostos presentes na matriz alimentar, já que a quantidade de polifenóis ingerida não reflete necessariamente a quantidade utilizada pelo organismo. Por isso, é importante conhecer a bioacessibilidade e a biodisponibilidade das substâncias bioativas (MANACH et al., 2004).

Vários estudos mostraram que a digestão induz mudanças importantes nos compostos fenólicos de diferentes alimentos levando a alterações na atividade antioxidante, contudo, pouco se sabe sobre as modificações trazidas pela DG nos compostos fenólicos do feijão-caupi (NDERITU et al., 2013). Observou-se que a digestão *in vitro* afetou de forma positiva o conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante nos grãos de feijão-caupi, com um aumento da quantidade de compostos antioxidantes acessíveis para possível absorção de componentes benéficos dos grãos cozidos a nível intestinal (HACHIBAMBA et al, 2013; MTOLO; GERRANO; MELLEME, 2017).

Entretanto, Faller, Fialho e Liu (2012), na avaliação da feijoada, um prato típico do Brasil elaborado com o feijão preto, obtiveram como resultados que não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) no conteúdo de fenólicos e flavonoides totais após a simulação da digestão *in vitro*. A atividade antioxidante total, medida pelo método *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC), foi maior para a feijoada sem a digestão quando comparada aos extratos digeridos.

Embora o interesse por esse assunto tenha aumentado recentemente, não existem estudos até o presente momento que abordem, em cada etapa do processo digestivo, o conteúdo de compostos bioativos e a proteção destes contra os radicais livres, a exemplo dos grãos das cultivares biofortificadas de feijão-caupi BRS Aracê, BRS Tumucumaque e BRS Xiquexique. É necessário, portanto, analisar as frações acessíveis de compostos fenólicos dos alimentos durante a cocção e digestão

gastrointestinal, e sua bioacessibilidade, os quais são importantes determinantes dos potenciais benefícios à saúde que estes podem oferecer.

REFERÊNCIAS

- ADEBOOYE, O. C.; SINGH, V. Effect of cooking on the profile of phenolics, tannins, phytate, amino acid, fatty acid and mineral nutrients of whole-grains and decorticated vegetable cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Journal of Food Quality**, v. 30, n. 6, p. 1101-1120, 2007.
- ADJEI-FREMAH, S.; JACKAI, L.; WORKU, M. Analysis of Phenolic Content and Antioxidant Properties of Selected Cowpea Varieties Tested in Bovine Peripheral Blood. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 10, n. 4, p. 235-245, 2015.
- ALMINGER, M.; AURA, A. M.; BOHN, T.; DUFOUR, C.; EL, S. N.; GOMES, A.; KARAKAYA, S.; MARTÍNEZ-CUESTA, M. C.; MCDUGALL, G. J.; REQUENA, T.; SANTO, C. N. *In Vitro* Models for Studying Secondary Plant Metabolite Digestion and Bioaccessibility. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 413-436, 2014.
- ALUKO, R.E.; YADA, R.Y.; LENCKI, R.W.; MARANGONI, A.G. Structural and functional properties of a partially purified cowpea (*Vigna unguiculata*) globulin modified with protein kinase and glycopeptidase. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v. 45, n. 1, p. 2907–2913, 1997.
- ANDRADE JUNIOR, A. S.; SANTOS, A. A. dos; ATHAYDE SOBRINHO, C.; BASTOS, E. A.; MELO, F. de B.; VIANA, F. M. P.; FREIRE FILHO, F. R.; CARNEIRO, J. da S.; ROCHA, M. de M.; CARDOSO, M. J.; SILVA, P. H. S. da; RIBEIRO, V. Q. **Cultivo de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**. Teresina: Embrapa-Meio Norte, 2002. 110 p. (Embrapa Meio-Norte. Sistema de Produção, 2).
- ANDRADE, F. N.; ROCHA, M. M.; GOMES, R. L.; FREIRE FILHO, F. R.; RAMOS, S. R. R. Estimativas de parâmetros genéticos em genótipos de feijão-caupi avaliados para feijão fresco. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2, p. 253-258, 2010.
- AVANZA, M.; ACEVEDO, B.; CHAVES, M.; AÑÓN, M. Nutritional and anti-nutritional components of four cowpea varieties under thermal treatments: Principal component analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 148-157, 2013.
- AWIKA, J. M.; DUODU, K. G. Bioactive polyphenols and peptides in cowpea (*Vigna unguiculata*) and their health promoting properties: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 686–697, 2017.
- AZIAGBA, B. O.; OKEKE, C. U.; EZEABARA, A. C.; ILODIBIA, C. V.; UFELE, A. N.; EGBOKA, T. P. Determination of the Flavonoid Composition of Seven Varieties of

Vigna unguiculata (L.) Walp as Food and Therapeutic Values. **Universal Journal of Applied Science**, v. 5, n. 1, p. 1-4, 2017.

BARROS, N. V. A.; ROCHA, M. M.; GLÓRIA, M. B. A.; ARAÚJO, M. A. M.; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. Effect of cooking on the bioactive compounds and antioxidant activity in grains cowpea cultivars. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 5, p. 824-831, 2017.

BOHN, T. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. **Nutrition Reviews**, v. 72, n. 7, p. 429-452, 2014.

BOLAND, M. Human digestion – a processing perspective. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 7, p. 2275-2283, 2016.

BRS Aracê: cultivar de feijão-caupi com grãos de cor verde-oliva e rica em ferro e zinco. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2009. 1 Folder.

BRS Tumucumaque: cultivar de feijão-caupi com ampla adaptação e rica em ferro e zinco. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2009. 1 Folder.

BRS Xiquexique: cultivar de feijão-caupi rica em ferro e zinco. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2008. 1 Folder.

CAI, R.; HETTIARACHCHY, N. S.; JALALUDDIN, M. High-performance liquid chromatography determination of phenolic constituents in 17 varieties of cowpeas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 1623-1627, 2003.

CARDOSO, C.; AFONSO, C.; LOURENÇO, H.; COSTA, S.; NUNES, M. L. Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk-benefit evaluation of food. **Food Science & Technology**, v. 41, p. 5-23, 2015.

CARVALHO, A. F. U.; SOUSA, N. M.; FARIAS, D. F.; ROCHA-BEZERRA, L. C. B.; SILVA, R. M. P.; VIANA, M. P.; GOUVEIA, S. T.; SAMPAIO, S. S.; SOUSA, M. B.; LIMA, G. P. G.; MORAIS, S. M.; BARROS, C. C.; FREIRE FILHO, F. R. F. Nutritional ranking of 30 Brazilian genotypes of cowpeas including determination of antioxidant capacity and vitamins. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 26, n. 1-2, p. 81-88, 2012.

CAVALCANTE, R. B. M.; ARAÚJO, M. A. M.; ROCHA, M. M.; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. Effect of thermal processing on chemical compositions, bioactive compounds, and antioxidant activities of cowpea cultivars. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 4, p. 1050-1058, 2017.

CHEN, G. L.; CHEN, S. G.; ZHAO, Y. Y.; LUO, C. X.; LI, J.; GAO, Y. Q. Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after *in vitro* digestion. **Industrial Crops and Products**, v. 1, n. 57, p. 150–157, 2014.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acomp. safra bras. grãos**, v. 5 - Safra 2017/18, n.11 - , Brasília, p. 1-148 ago. 2018.

CÔRREA, M.C.S.M. **Anatomia e fisiologia**. Curitiba: e-Tec, 2011.

CUI, E.J.; SONG, N-H.; SHRESTHA, S.; I-S, CHUNG; KIM, J-Y.; JEONG, T-S; BAEK, N-I. Flavonoid glycosides from cowpea seeds (*Vigna sinensis* K.) inhibit LDL oxidation. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 619-624, 2012.

DALARAM, I. S. Total polyphenol content and antioxidant capacity of cowpea effect of variet and locality. **Potravinarstvo**, v. 9, n. 1, p. 358-364, 2015.

DE ANCOS, B.; CILLA, A.; BARBERÁ, R.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; CANO, M. Influence of orange cultivar and mandarin postharvest storage on polyphenols, ascorbic acid and antioxidant activity during gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 225, n. 1, p. 114–124, 2017.

DENG, G-F.; LIN, X.; XU, X-R.; GAO, L-L.; XIE, J-F.; LI, H-B. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. **Journal of Functional Foods**. v. 5, n. 1, p. 260-266, 2013.

DUPONT, D. *In Vitro* Digestion Models. In: SMITHERS, G. **Reference Module in Food Sciences**. Elsevier, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965210913?via%3Dihub>>. Acesso: 22 de janeiro de 2019.

ETCHEVERRY, P.; GRUSAK, M. A.; FLEIGE, L. E. Application of *in vitro* bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. 317, p. 1-22, 2012.

FABBRI, A. D. T.; CROSBY, G. A. A review of the impact of preparation and cooking on the nutritional quality of vegetables and legumes. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 3, p. 2–11, 2016.

FALLER, A. L. K.; FIALHO, E.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity of feijoad whole meal coupled with an *in vitro* digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 19, p. 4826-4832, 2012.

FAO (2017). FAOSTAT. **Crops. Cow peas, dry**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Acesso em: 20 abr. 2019.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. de M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. do S.; RODRIGUES, E. V. **Feijão-caupi: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, p. 84, 2011.

FREIRE-FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; RODRIGUES, J. E. L. F.; VIEIRA, P. F. M. J. A cultura: aspectos socioeconômicos. In: Do Vale, J. C. **Feijão-caupi: do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2017. p. 9-34.

GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; ROMO-LOPEZ, I.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Phenolic composition and mammary cancer cell inhibition of extracts of whole cowpeas (*Vigna*

unguiculata) and its anatomical parts. **Journal of Functional Foods**, v. 3, p. 290-297, 2011.

HACHIBAMBA, T.; DYKES, L.; AWIKA, J.; MINNAAR, A.; DUODU, K. G. Effect of simulated gastrointestinal digestion on phenolic composition and antioxidant capacity of cooked cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties. **International Journal of Food Science Technology**, v. 48, n. 12, p. 2638–2649, 2013.

HACKMAN, R. M.; POLAGRUTO, J. A.; ZHU, Q. Y.; SUN, B.; FUJII, H.; KEEN, C. L. Flavanols: digestion, absorption and bioactivity. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 195-208, 2008.

HELAL, A.; TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; CONTE, A. Bioaccessibility of polyphenols and cinnamaldehyde in cinnamon beverages subjected to *in vitro* gastro-pancreatic digestion. **Journal of functional Foods**, v. 7, p. 506-516, 2014.

HENDRY, C.; FARLEY, A.; MCLAFFERTY, E.; JOHNSTONE, C. The digestive system: part 2. **Nursing Standard**. v. 28, n. 25, p. 37-44, 2014.

HUR, S. J.; LIM, B. O.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. *In vitro* human digestion models for food applications. **Food Chemistry**. v. 125, n. 1, p. 1–12. 2011.

JOHNSTONE, C.; HENDRY, C.; FARLEY, A.; MCLAFFERTY, E. The digestive system: part 1. **Nursing Standard**, v. 28, n. 24, p. 37-45, 2014.

LEVANTAMENTO Sistemático da Produção Agrícola (LSPA). Rio de Janeiro: IBGE, v. 18, 2006; v. 19, 2007; v. 20, 2008; v. 21, 2009; v. 22, 2010; v. 23, 2011; v. 24, 2012; v. 25, 2013; v. 26, 2014; v. 27, 2015.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, L. X.; LEYVA-LÓPEZ, N.; GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E. P.; HEREDIA, J. B. Effect of cooking and germination on bioactive compounds in pulses and their health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 624–634, 2017.

LUCAS-GONZÁLEZ, R.; VIUDA-MARTOS, M.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. *In vitro* digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. **Food Research International**, v. 107, p. 423–436, 2018.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MARATHE, S. A.; RAJALAKSHMI, V.; JAMDAR, S. N.; SHARMA, A. Comparative study on antioxidant activity of different varieties of commonly consumed legumes in India. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2005-2011, 2011.

MARTIN, K.; APPEL, C. L. Polyphenols as dietary supplements: a double-edged sword. **Nutrition and Dietary Supplements**, v. 2, p. 1-12, 2010.

MILLER, DD, SCHRICKER, BR, RASMUSSEN, RR, VAN CAMPEN, D. An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 34, n. 10, p. 2248–2256, 1981.

MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIEU, C.; CARRIÈRE, F.; BOUTROU, R.; CORREDIG, M.; DUPONT, D.; DUFOUR, C.; EGGER, L.; GOLDING, M.; KARAKAYA, S.; KIRKHUS, B.; LE FEUNTEUN, S.; LESMES, U.; MACIERZANKA, A.; MACKIE, A.; MARZE, S.; MCCLEMENTS, D. J.; MÉNARD, O.; RECIO, I.; SANTOS, C. N.; SINGH, R. P.; VEGARUD, G. E.; WICKHAM, M. S.; WEITSCHIES, W.; BRODKORB, A. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus. **Food & Function**, v. 5, n. 6, p. 1113-1124, 2014.

MOJICA, L.; MEYER, A.; BERHOW, M. A.; MEJÍA, E. G. Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, *in vitro* inhibition of α -amylase and α -glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. **Food Research International**, v. 69, p. 38–48, 2015.

MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R.; SAMPAIO, G. R.; SOARES, R. A. M.; SILVA, C. P.; ARAÚJO, M. A. M.; ARÉAS, J. A. G. Identification and quantification of antioxidant compounds in cowpea. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 5, p. 799-805, 2017.

MOREIRA-ARAUJO, R. S. R. SAMPAIO, G. R.; SOARES, R. A. M.; SILVA, C. P.; ARAÚJO, M. A. M.; ARÉAS, J. A. G. Identification and quantification of phenolic compounds and antioxidant activity in cowpeas of BRS Xiquexique cultivar. **Revista Caatinga**, v. 31, n. 1, p. 209-216, 2018.

MURADOR, D.; BRAGA, A. R.; DA CUNHA, D.; DE ROSSO, V. Alterations in phenolic compound levels and antioxidant activity in response to cooking technique effects: A meta-analytic investigation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 2, p. 169-177, 2018.

MTOLO, M.; GERRANO, A.; MELLEM, J. Effect of simulated gastrointestinal digestion on the phenolic compound content and *in vitro* antioxidant capacity of processed Cowpea (*V. unguiculata*) cultivars. **CyTA - Journal of Food**, v. 15, n. 3, p. 391–399, 2017.

NASSOUROU, M. A.; NJINTANG, Y. N.; NOUBISSIÉ, T. J-B.; NGUIMBOU, R. M.; BELL, J. M. Genetics of seed flavonoid content and antioxidant activity in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **The Crop Journal**, v. 4, n. 5, p. 391-397, 2016.

NDERITU, A. M.; DYKES, L.; AWIKA, J. M.; MINNAAR, A.; DUODU, K. G. Phenolic composition and inhibitory effect against oxidative DNA damage of cooked cowpeas as affected by simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1763–1771, 2013.

NEVES, A. C.; CAMARA, J. A. da S.; CARDOSO, M. J.; SILVA, P. H. S. da; ATHAYDE SOBRINHO, C. **Cultivo do feijão-caupi em sistema agrícola familiar**.

Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 15p. (Embrapa Meio-Norte. Circular Técnica, 51).

OJWANG, L. O.; BANERJEE, N.; NORATTO, G. D.; ANGEL-MORALES, G.; HACHIBAMBA, T.; AWIKA, J. M.; MERTENS-TALCOTT, S. U. Polyphenolic extracts from cowpea (*Vigna unguiculata*) protect colonic myofibroblasts (CCD18Co cells) from lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation – modulation of microRNA 126. **Food & Function**, v. 6, n. 1, p. 145-153, 2015.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; BAROOS, M. P.; MANO, C. M.; GOULART, M. O. F. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**, v. 115, n. 1, p. 469–475, 2009.

OLIVEIRA, D.M.; BASTOS, D.H.M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n.6, p. 1051-1056, 2011.

OLIVEIRA, J. M. S. **Composição centesimal e mineral de genótipos de feijão-caupi tipo fradinho**. 2018. 79 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2018.

PALERMO, M.; PELLEGRINI, N.; FOGLIANO, V. The effect of cooking on the phytochemical content of vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 6, p. 1057-70, 2014.

ROCHA, M. M.; DAMASCENO-SILVA, K. J.; MENEZES-JÚNIOR, J. A. N. Cultivares. In: Do Vale, J. C. **Feijão-caupi: do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2017. p. 9-34.

SANTANA, S. R. A. **Divergência genética em genótipos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) por descritores morfoagronômicos e variáveis multicategóricas**. 2017. 85 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2017.

SALGADO, S. M.; LIVEIRA, A. V. S.; GUERRA, N. B. **Aspectos alimentares**. In: BRITO, E. S. (Ed.). **Feijão-caupi**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. p. 25-38, 2008.

SOMBIÉ, P. A. E. D.; COMPAORÉ, M.; COULIBALY, A. Y.; OUÉDRAOGO, J. T.; TIGNÉGRÉ, J. B. D. L. S.; KIENDRÉBÉOGO, M. Antioxidant and Phytochemical Studies of 31 Cowpeas (*Vigna unguiculata* (L. Walp.)) Genotypes from Burkina Faso. **Foods**, v. 7, n. 143, p. 1-9, 2018.

SREERAMA, Y. N.; SASHIKALA, V. B.; PRATAPE, V. M. Phenolic compounds in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their antioxidant and enzyme inhibitory properties associated with hyperglycemia and hypertension. **Food Chemistry**, v. 133, n. 1, p. 156-162, 2012.

SPRENT, J. I.; ODEE, D. W.; DAKORA, F. D. African legumes: A vital but under-utilized resource. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 5, p. 1257–1265, 2010.

TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; BERTOLINI, D.; CONTE, A. *In vitro* bio accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, v. 120, p. 599-606, 2010.

TOGNON, A. L. **Quantificação e avaliação da bioacessibilidade in vitro de micro e macroelementos em frutas, hortaliças e cereais**. 2012. 128 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2012.

VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, G. R.; PALAFOX-CARLOS, H.; WALL-MEDRANO, A.; AYALA-ZAVALA, J. F.; CHEN, C. Y.; ROBLES-SÁNCHEZ, M.; ASTIAZARAN-GARCÍA, H.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Phenolic compounds: their journey after intake. **Food & Function**, v. 5, n. 2, p. 189-197, 2014.

WILLIAMSON, G. The role of polyphenols in modern nutrition. **Nutrition Bulletin**, v. 42, n. 3, p. 226-235, 2017.

WITTSIEPE, J.; SCHREY, P.; HACK, A.; SELENKA, F.; WILHELM, M. Comparison of different digestive tract models for estimating bioaccessibility of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/F) from red slag 'Kieselrot', **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 203, p. 263-273, 2001.

YADAV, N.; KAUR, D.; MALAVIYA, R.; SINGH, M.; FATIMA, M.; SINGH, L. Effect of thermal and non-thermal processing on antioxidant potential of cowpea seeds. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 437-451, 2018.

ZHAO, C.; LIU, Y.; LAI, S.; CAO, H.; GUAN, Y.; CHEANG, W. S.; LIU, B.; ZHAO, K.; MIAO, S.; RIVIERE, C.; CAPANOGLU, E.; XIAO, J. Effects of domestic cooking process on the chemical and biological properties of dietary phytochemicals. **Trends in Food Science & Technology**, v. 85, p. 55-66, 2019.

ZIA-UL-HAQ, M.; AHMAD, S.; AMAROWICZ, R.; DE FEO, V. Antioxidant activity of the extracts of some cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp) cultivars commonly consumed in Pakistan. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2005-2017, 2013.

CAPÍTULO II

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO CIENTÍFICO I

Effect of cooking on the bioactive compounds and antioxidant activity in grains cowpea cultivars, publicado na revista Ciência Agronômica, ISSN: 1806-6690.

Effect of cooking on the bioactive compounds and antioxidant activity in grains cowpea cultivars

Efeito da cocção no conteúdo de compostos bioativos e atividade antioxidante nos grãos de cultivares de feijão-caupi

Nara Vanessa dos Anjos Barros², Maurisrael de Moura Rocha³, Maria Beatriz Abreu Glória⁴, Marcos Antônio da Mota Araújo⁵ and Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo^{6*}

ABSTRACT - The present study evaluated the effect of cooking on the levels of bioactives compounds and antioxidant activity in grains cowpea cultivars. The analysis were performed on the raw samples and after cooking in pressure cooker. Regarding the bioactive compounds present, the grain cultivar BRS Aracê exhibited the highest levels of total phenolic compounds (mg/100 g) both before and after cooking, 205.10 ± 2.89 and 150.62 ± 2.64 , respectively. Spermine and spermidine were identified in the cultivars (mg/kg) BRS Milênio in the amount of 120.5 in crude and 50.4 in cooked grain, in the BRS Tumucumaque in the amount of 116.2 in crude and 47.9 in cooked grain, exhibited significant losses of these compounds after cooking. It was not detected the presence of anthocyanins and flavonoids in the grain cultivars. For the antioxidant activity were observed different behaviors for each grain cultivar in the two methods evaluated. The grain cultivar BRS Aracê presented the highest antioxidant activity before cooking according to both methods tested ($\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g}$), 614.7 ± 5.43 (DPPH) and 660.1 ± 7.98 (ABTS). The grain cultivar BRS Xiquexique 419.8 ± 6.80 exhibited the highest antioxidant activity and the grain cultivar BRS Milênio 552.1 ± 4.78 after cooking. A strong correlation between the antioxidant activity and phenolic content and total flavonoid was found. It is concluded that the grains cultivars maintained important nutritional and functional characteristics following processing, recommending that the cowpea consumption with broth cooking for retaining compounds with antioxidant properties.

Key words: *Vigna unguiculata*. Functional food. Antioxidants. Processing.

RESUMO - O presente estudo visou avaliar a influência do cozimento no conteúdo de compostos bioativos e atividade antioxidante nos grãos de cultivares de feijão-caupi. As análises foram realizadas em cultivares cruas e após o cozimento em panela de pressão doméstica. Para os compostos bioativos, o grão da cultivar BRS Aracê apresentou os maiores conteúdos de compostos fenólicos totais antes ($205,10 \text{ mg}/100 \text{ g} \pm 2,89$) e após ($150,62 \text{ mg}/100 \text{ g} \pm 2,64$) o cozimento ($p < 0,05$). Foram identificadas as poliaminas espermina e espermidina nas cultivares (mg/kg), destacando-se a BRS Milênio no grão cru com 120,5 e no grão cozido de 50,4, e BRS Tumucumaque no grão cru de 116,2 e no grão cozido de 47,9, com perdas significativas ($p < 0,05$) após o cozimento. Não foi detectada a presença de antocianinas e flavonóis nos grãos das cultivares. Para a atividade antioxidante, observaram-se comportamentos diferenciados para cada grão das cultivares nos dois métodos avaliados. Antes do cozimento, o grão da cultivar BRS Aracê apresentou maior atividade antioxidante pelos dois métodos avaliados ($\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g}$) $614,7 \pm 5,43$ (DPPH) e $660,1 \pm 7,98$ (ABTS). O grão da cultivar BRS Xiquexique exibiu elevada atividade antioxidante de $419,8 \pm 6,80$ e o grão da cultivar BRS Milênio de $552,1 \pm 4,78$, após o cozimento. Foi constatada forte correlação entre a atividade antioxidante e o teor de fenólicos e flavonoides totais. Concluiu-se que após o processamento, os grãos das cultivares mantiveram características nutritivas e funcionais relevantes, recomendando-se o consumo do feijão-caupi com o caldo de cocção para retenção de compostos com propriedades antioxidantes.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*. Alimento funcional. Antioxidantes. Processamento.

DOI: 10.5935/1806-6690.20170097

*Autor para correspondência

Recebido para publicação 14/08/2016; aprovado em 16/11/2016

²Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Bloco 13, Ininga, Teresina-PI, Brasil, 64.049-550, nara.vanessa@hotmail.com

³Embrapa Meio Norte, Avenida Duque de Caxias, 5650, Teresina-PI, Brasil, maurisrael.rocha@embrapa.br

⁴Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, Bloco 3, Sala 2091, Pampulha, Belo Horizonte-MG, Brasil, 31.210-90, mbeatriz@farmacia.ufmg.br

⁵Gerência de Planejamento, Fundação Municipal de Saúde, Teresina-PI, Brasil, regmarjoao@hotmail

⁶Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Bloco 13, Ininga, Teresina-PI, Brasil, 64.049-550, regilda@ufpi.edu.br.

INTRODUCTION

Cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) is one of the most important legumes produced in tropical and subtropical regions worldwide, especially in the developing countries of Africa, Latin America and Asia. This species provides the main source of proteins, calories, dietary fiber, minerals and vitamins for a large segment of the world's population (PHILLIPS *et al.*, 2003).

This legume is also known as crowder-pea, southern pea or black-eyed pea. Because of its hardiness, it is well known for its adaptability to water, heat and salt stress and is widely grown by small- and medium-scale producers in the Brazilian Northeast and Northern regions, where it represents is a key source of income and employment (FREIRE FILHO *et al.*, 2005).

Among legumes, the common bean is characterized as a food with good nutritional value and high levels of bioactive compounds with significant antioxidant activity, including flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins and isoflavones, and some phenolic acids (SILVA *et al.*, 2009).

Cooking of this legume leads to loss of cellular structure integrity, with migration of components occurring through leaching, resulting in a reduction of its phytochemical constituents. Furthermore, heat treatment can promote thermal degradation, and nutrient loss may occur via the action of enzymatic or non-enzymatic factors, including light and oxygen (VOLDEN *et al.*, 2009). The effects vary depending on the cultivar and treatment, as studies have shown that cooking significantly reduces the levels of phenolic compounds and antioxidant activity (assessed by *in vitro* assays) (XU; CHANG, 2011).

In light of the above considerations, together with the importance of cowpea in Brazilian eating habits (especially in the Northeast), its nutritional and functional characteristics (particularly regarding bioactive compounds), the scarcity of data on the levels of these compounds in grain cowpea grown in Brazil and the effect of cooking on new grains cultivars, the present study aimed to evaluate the effect of cooking on the levels of bioactive compounds in grains cowpea cultivars.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Grains cowpea cultivars from two different lots were provided by the Department of Genetic Resources and Breeding of the Brazilian Agricultural Research Corporation, Mid-North (Embrapa Meio-Norte), Teresina - Piauí (PI), Brazil, and maintained in the Laboratory

of Bromatology and Food Biochemistry, Department of Nutrition/Center for Health Sciences/Federal University of Piauí (Universidade Federal do Piauí - UFPI) at 8°C in polyethylene bags until analysis.

Four grains cowpea cultivars were analyzed before and after cooking: BRS Aracê, BRS Tumucumaque, BRS Milênio and BRS Xiquexique. The grains raw samples were analyzed within a one-week interval after they were received, and the cooking step was conducted after completing the raw bean analyses. The raw grain cowpea was ground in a rotor mill cyclone type (Tecnal, Model TE-651/2, Piracicaba-SP, Brazil) until a homogenous powder was obtained (0.5 mesh). The cowpeas were cooked at a bean:water ratio of 1:3 (w/v) in a 2 L domestic pressure cooker, for 13 minutes, over medium heat, after constant steam output through the pressure valve. The cooking broths resulting from boiling the four cultivars were stored in plastic containers (50 mL) at a temperature of 8 °C for subsequent analyses.

Analysis of bioactive compounds

The extracts of grain cowpea samples were initially prepared according to the method described by Rufino *et al.*, (2010), using the solvents 50% methanol (50:50, v/v) e 70% acetone (70:30, v/v) and Milli-Q water.

The levels of phenolic compounds in the extracts were determined spectrophotometrically using the Folin-Ciocalteu reagent and absorbance readings of the samples were conducted at 765 nm in a spectrophotometer (BEL, Model 1102, Monza, Milan, Italy). The results are expressed as grams of gallic acid equivalents (GAE) per 100 g of sample. The concentration of total phenolic compounds was assessed through interpolation of the absorbance using a previously constructed gallic acid standard curve (SINGLETON; ROSSI, 1965).

The method described by Blasa *et al.* (2006) was used to assess total flavonoids and the absorbance was then measured at 425 nm in a spectrophotometer (BEL, Model 1102, Monza, Milan, Italy). Different concentrations of quercetin (0-100 mg/L) were used to construct a standard curve, and the results are expressed as milligrams of quercetin equivalents (mg QE)/100 g sample.

Analysis of the levels of total anthocyanins (TA) was performed following the pH-difference method (GIUSTI; WROLSTAD, 2001). The absorbance was measured in a spectrophotometer (BEL, Model 1102, Monza, Milan, Italy) at the peak wavelength of each sample and at 700 nm, in buffer solutions at pH 1.0 and pH 4.5, and using distilled water as a blank. The results are expressed as cyanidin-3-glucoside (cy-glu-3) equivalents per 100 grams of dry sample.

The levels of total flavanols were assessed colorimetrically using the vanillin method (PRICE *et al.*, 1978), and absorbance readings were performed in a spectrophotometer (BEL, Model 1102, Monza, Milan, Italy) at 500 nm. Catechin was used as a standard, and the results are expressed as milligrams of catechin equivalents/100 g of sample.

Ten bioactive amines were assessed, including spermidine, spermine, putrescine, cadaverine, serotonin, histamine, tyramine, tryptamine, phenylethylamine and agmatine. The method employed to separate, detect and quantify the amines was high-performance liquid chromatography (HPLC), with an ion-pair reversed-phase column, according to Adão and Glória (2005).

Antioxidant activity

Antioxidant activity was assessed using the DPPH free radical scavenging method, developed by Brand-Williams *et al.*, (1995) the absorbance was then measured at 515 nm in a spectrophotometer (BEL, Model 1102, Monza, Milan, Italy). A standard curve was constructed using Trolox at different concentrations (0-100 mg/L) as a reference. The results are expressed as μmol Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) per 100 g of sample.

The assay with the ABTS• radical was conducted according to Re *et al.* (1999). The absorbance was measured in a spectrophotometer (BEL, Model 1102, Monza, Milan, Italy) at 734 nm. The results are expressed in μmol TEAC per 100 g sample.

Statistical analysis

A database was created using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 17.0. Analysis of variance (ANOVA) was performed, and means were compared using Student's *t*-test (two means) to assess the significance of the differences between the two means and Tukey's test (three or more means) to assess the existence of significant differences between the means of three or more grain cultivars. Pearson's correlation coefficient was applied. The significance level adopted was $p < 0.05$ for all tests. All analyzes were performed in triplicate (ANDRADE, 2010).

RESULTS AND DISCUSSION

Bioactive compounds

Regarding bioactive compounds, Table 1 presents the levels of total phenolic compounds assessed in the grain, before and after cooking, and in the respective cooking broths.

Table 1 - Total phenolic compounds in raw and cowpea cooked grains and in the cooking broths.

Cultivars	Processing (mg GAE*/100 g)		Cooking broth (mg GAE*/100 g)
	Raw	Cooked	
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
BRS Milênio	132.83 \pm 3.12a A	96.97 \pm 0.13b A	51.32 \pm 0.67c A
BRS Aracê	205.10 \pm 2.89a B	150.62 \pm 2.64b B	35.95 \pm 0.34c B
BRS Tumucumaque	177.07 \pm 0.78a C	126.58 \pm 1.98b C	30.96 \pm 0.51c C
BRS Xiquexique	199.05 \pm 1.98a D	144.38 \pm 1.78b D	42.40 \pm 0.12c D

* Gallic acid equivalents (GAE). Mean of three replicates \pm standard deviation (SD); Lowercase letters compare the type of processing applied and uppercase letters compare between cultivars within each processing. Means followed by different lowercase letters (in columns) and different uppercase letters (in lines) are statistically different ($p < 0.05$)

The concentrations of phenolic compounds in raw beans were higher than in cooked beans in all of the cultivars evaluated. Thus, cooking significantly reduced ($p < 0.05$) the levels of this type of bioactive compound (Table 1).

For the raw beans, a significant difference between the four studied cultivars was observed, with the BRS Aracê cultivar exhibiting the highest levels of phenolic compounds (205.10 mg/100 g), followed by the BRS Xiquexique cultivar (199.05 mg/100 g). The BRS Milênio cultivar presented the lowest concentration of these compounds (132.83 mg/100 g; Table 1).

Marathe *et al.* (2011) analyzed grain legumes including the common bean, cowpea, chickpea, soybean and pea, among others, and classified them into three different groups according to the levels of phenolic compounds observed. Based on this previous study, the raw grain cowpea cultivars assessed in the present study may be classified as showing moderate levels of phenolic compounds (> 100 and < 200 mg GAE/100 g), except for the cultivar BRS Aracê, which exhibited a high level of these compounds (> 200 mg GAE/100 g). The BRS Milênio grain cultivar presented the lowest level of phenolic compounds (< 100 mg GAE/100 g) among the cooked cultivars.

All of the cooked grain cultivars differed significantly ($p < 0.05$) regarding the levels of phenolic compounds, with the highest concentration being observed in the cultivar BRS Aracê, 150.62 mg/100 g, followed by the cultivar BRS Xiquexique, with 144.38 mg/100 g. The presence of phenolic compounds was detected in all of the cooking broths, with the highest levels being observed in the cooking broth of the cultivar BRS Milênio (51.32 mg/100 g; Table 1).

As shown in Table 1, the present study recorded higher levels of phenolic compounds than were found by Adebooye and Singh (2007), who evaluated the effect of cooking on the levels of phenolic compounds in two varieties of cowpea and recorded values ranging from 40 to 50 mg GAE/100 g in cooked grains. Giami (2005) analyzed four lines of cowpea and recorded levels ranging from 99 to 196 mg/100 g in the raw lines and from 52 to 78 mg/100 g in the cooked lines.

Results similar to those recorded in the present study, i.e., significant decreases in the levels of phenolic compounds, were observed in studies conducted by Adebooye and Singh (2007), Giami (2005) and Kalpanadevi and Mohan (2013), who evaluated the effect of cooking on the levels of such compounds in different cowpea cultivars.

Several factors may affect the levels of phenolic compounds in legumes, including genetic and environmental factors and factors inherent to the conditions applied to extract these compounds from the food matrix, including the type of solvent used. Such factors may explain the differences observed in the levels of these compounds in the present work compared to other studies.

Although the levels of phenolic compounds decreased after cooking, they remained significant, considering the sum of the levels recorded in the cooked grains cultivars and their respective cooking broths. This finding shows that even after cooking, the analyzed grains cultivars remain key health-promoting factors, maintaining their function. The levels of flavonoids in the raw and cooked grains cultivars and in the cooking broths are shown in Table 2.

Table 2. Levels of total flavonoids in raw and cowpea cooked grains and in the cooking broths

Cultivars	Processing (mg QE*/100 g)		Cooking broth (mg QE*/100 g)
	Raw	Cooked	
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
BRS Milênio	65.02 ± 0.23a A	52.34 ± 0.06b A	24.27 ± 0.01c A
BRS Aracê	58.35 ± 0.11a B	42.56 ± 0.19b B	17.20 ± 0.08c B
BRS Tumucumaque	45.80 ± 0.31a C	36.11 ± 0.25b C	14.90 ± 0.03c C
BRS Xiquexique	67.96 ± 0.54a DA	41.01 ± 0.44b DB	20.17 ± 0.01c D

* Quercetin equivalents (QE). Mean of three replicates ± standard deviation (SD); Lowercase letters compare the type of processing applied and uppercase letters compare between cultivars within each processing. Means followed by different lowercase letters (in columns) and different uppercase letters (in lines) are statistically different (p < 0.05)

Cooking caused a significant decrease in the levels of total flavonoids (p < 0.05). Raw grains of BRS Xiquexique (67.96 mg/100 g) and BRS Milênio (65.02 mg/100 g) presented the highest levels of flavonoids among the raw grains of cultivars. The cultivar BRS Milênio (52.34

mg/100 g) exhibited the highest levels of flavonoids among the cooked grains cultivars, whereas the cultivar BRS Tumucumaque exhibited the lowest levels of these compounds both before and after cooking, at 45.80 and 36.11 mg/100 g, respectively. A significant transfer of flavonoids ($p < 0.05$) to the cooking broth was observed for the cultivar BRS Milênio (24.27 mg/100 g; Table 2).

Despite the decrease in the levels of flavonoids after cooking, the cowpea grains maintained significant levels of these compounds. The evaluated cowpea cultivars exhibited higher levels of flavonoids than were observed by Barreto *et al.* (2009) in Brazilian tropical fruits, including loquat (24.3 ± 0.2 mg QE/100 g), jackfruit (18.3 ± 2.9 mg QE/100 g), nectarine (23.7 ± 1.2 mg EQ/100 g) and starfruit (42.6 ± 2.3 mg QE/100 g).

Wang *et al.* (2008) reported high levels of total flavonoids in cowpea grains samples in 2004 (441.9 $\mu\text{g/g}$) and 2005 (252.9 $\mu\text{g/g}$), when analyzing 40 accessions of selected legumes, including cowpea. Cowpea grains contains high levels of the flavonoids myricetin and quercetin and low levels of genistein, kaempferol and daidzein.

Cooking may promote the destruction of bioactive compounds, including flavonoids, or they may be eliminated into the cooking broth. Such effects may explain the decrease in the levels of flavonoids observed in this study after cooking.

Table 3 shows the level of polyamines in grains cowpea cultivars before and after cooking and in the cooking broths. The polyamines spermine and spermidine were quantified in the analyzed cowpea grains. Thermal processing significantly changed ($p < 0.05$) the levels of polyamines in cowpea, which decreased after cooking.

The levels of polyamines were significantly different ($p < 0.05$) between all of the raw grains of the cultivars analyzed (Tabela 3), with the highest levels of spermidine being observed in the cultivar BRS Milênio (106.98 mg/kg), followed by BRS Tumucumaque (79.37 mg/kg) and BRS Aracê (74.68 mg/kg). The highest levels of spermine were observed in the raw grains of BRS Xiquexique (43.43 mg/kg), followed by BRS Tumucumaque (36.80 mg/kg) and BRS Aracê (25.26 mg/kg).

Table 3. Levels of polyamines in grains of cowpea cultivars before and after cooking and in the cooking broth.

Amines	Cultivar	Processing (mg/Kg)		Cooking broth (mg/Kg)
		Raw	Cooked	
		Mean \pm SD	Mean \pm SD	
Spermidine	BRS Milênio	106.98 \pm 9.75a A	37.67 \pm 2.19b A	2.44 \pm 0.10c A
	BRS Aracê	74.68 \pm 2.41a B	28.54 \pm 2.54b B	1.57 \pm 0.02c B
	BRS Tumucumaque	79.37 \pm 4.87a C	30.32 \pm 13.40b C	0.86 \pm 0.00c C
	BRS Xiquexique	69.15 \pm 3.99a D	29.47 \pm 2.32b DBC	1.09 \pm 0.01c D
Spermine	BRS Milênio	13.53 \pm 3.91a A	12.68 \pm 1.11b A	1.94 \pm 0.01c
	BRS Aracê	25.26 \pm 3.44a B	17.84 \pm 1.53b BCD	nd*
	BRS Tumucumaque	36.80 \pm 2.45a C	17.59 \pm 2.33b CBD	nd*
	BRS Xiquexique	43.43 \pm 4.88a D	15.32 \pm 2.56b DBC	nd*

Lowercase letters compare the type of processing applied and uppercase letters compare between cultivars within each processing. Means followed by different lowercase letters (in columns) and different uppercase letters (in lines) are statistically different ($p < 0.05$).

* Not detected.

The highest levels of spermidine were observed in the cultivar BRS Milênio (37.67 mg/kg), whereas this cultivar exhibited 12.68 mg/kg spermine, which was the lowest level assessed among the cooked cultivar grains. Low amounts of polyamines were recorded in the cooking broths, with no spermine being detected in the cooking broths of cultivars BRS Aracê, BRS Tumucumaque and BRS Xiquexique (Table 3).

The cultivars BRS Milênio (120.5 mg/kg) and BRS Tumucumaque (116.2 mg/kg) displayed the highest levels of total polyamines (spermine + spermidine) in the raw grains. Significant losses of these substances were observed after cooking, ranging from 53.3-60.2%. Significant differences were observed between the raw ($p = 0.003$) and cooked ($p = 0.028$) grains of cultivars regarding the levels of total polyamines.

The presence of spermidine and spermine was expected in the grains cowpea cultivars because polyamines are naturally present in plant foods. The higher levels of spermidine compared with spermine were also expected, corroborating the results of Kalac and Krausová (2005). In a literature review, these authors found spermidine levels ranging from 7.7 to 8.8 mg/kg in cooked green beans, from 33.2 to 62.1 mg/kg in soybean and from 2.9 to 88.4 mg/kg in green peas. These values are indicative of the importance of the levels of these compounds in the raw cowpea cultivars examined in the present study, which are comparatively higher.

Results similar to the present study were observed by Lima *et al.* (2006) when they evaluated 10 foods typically consumed by Brazilians, including common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). The authors reported a predominance of spermine and spermidine in the beans, with a decrease of these substances occurring after the legume was cooked. The levels of spermidine ranged from 1.30 to 0.85 $\mu\text{g/g}$ and the levels of spermine from 2.62 to 2.28 $\mu\text{g/g}$ in raw and cooked beans, respectively.

Considering the data recorded in the present study, additional studies are needed to identify and quantify the levels of polyamines in beans and their performance, taking into account changes in storage and processing conditions, as these data are important for diet planning in the nutritional management of healthy patients or patients with specific pathologies.

Total anthocyanins and flavanols were undetectable in the grains cowpea samples both before and after cooking in the present study.

Similar results were reported in a study by Ranilla *et al.* (2009), in which no condensed tannins were detected in cooked black and brown beans. It was suggested that this result arose from the formation of insoluble complexes between proteins and tannins and between carbohydrates and tannins in whole grains, leading to failure of extraction of the compounds with the solvent and thus non-detection of these compounds in the method using the vanillin reagent.

In a study addressing the profile of condensed tannins (or proanthocyanidins) in six different cowpea genotypes, Ojwang *et al.* (2013) also did not detect these compounds when using the HCl-vanillin test in white and green cowpea genotypes. These authors suggested that the accumulation of these compounds is genetically controlled.

Antioxidant activity

The antioxidant activity of grains cowpea cultivars analyzed using the DPPH and ABTS free radical scavenging methods, before and after cooking, is shown in Table 4. A significant decrease was observed in the antioxidant activity of the studied cultivars after cooking.

Table 4 - Antioxidant activity in raw and cowpea cooked grains and in the cooking broths according to the DPPH and ABTS methods

Method	Cultivars	Processing ($\mu\text{mol TEAC}^*/100 \text{ g}$)		Cooking broth
				($\mu\text{mol TEAC}^*/100 \text{ g}$)
		Raw	Cooked	
		Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
DPPH	BRS Milênio	566.0 \pm 9.67a A	349.7 \pm 5.87b A	286.6 \pm 3.76c A
	BRS Aracê	614.7 \pm 5.43a B	336.1 \pm 4.99b B	167.9 \pm 2.98c B
	BRS Tumucumaque	551.5 \pm 4.89a C	278.4 \pm 5.23b C	140.2 \pm 2.09c C
	BRS Xiquexique	575.4 \pm 7.98a D	419.8 \pm 6.80b D	225.8 \pm 2.56c D
ABTS	BRS Milênio	655.6 \pm 5.87a A	552.1 \pm 4.78b A	335.9 \pm 3.56c A
	BRS Aracê	660.1 \pm 7.98a BA	523.4 \pm 7.32b B	174.4 \pm 8.65c B
	BRS Tumucumaque	556.7 \pm 8.65a C	420.6 \pm 9.43b C	154.8 \pm 4.85c C
	BRS Xiquexique	608.5 \pm 9.09a D	494.6 \pm 1.43b D	204.5 \pm 4.12c D

* Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). Mean of three replicates \pm standard deviation (SD); Lowercase letters compare the type of processing applied and uppercase letters compare between cultivars within each processing. Means followed by different lowercase letters (in columns) and different uppercase letters (in lines) are statistically different ($p < 0.05$)

Xu and Chang (2012) observed antioxidant activity, ranging from 107 $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g}$ in yellow soybean to 1,940 $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g}$ in black bean, when using the DPPH method to analyze health-promoting effects related to the antioxidant activity of 13 legumes consumed in the United States, including peas, lentils, soybeans, garbanzo beans, cowpeas and common beans. The levels determined in the present study using the DPPH method were higher than the values observed by those authors in yellow pea samples (358 $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g}$), garbanzo beans (294 $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g}$), green peas (277 $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g}$) and yellow soybeans (107 $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g}$) and lower than those recorded in cowpeas (707 $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g}$).

Xu and Chang (2009), who analyzed the effect of thermal processing on the antioxidant properties in grains of common beans, observed decreases in DPPH values ranging from 46-67%. Furthermore, these authors concluded that cooking at high pressures promotes slower cooking times (10 minutes) than cooking performed at atmospheric pressure as well as smaller losses of antioxidant substances (phenolic compounds) to the cooking broth.

Results different from those found in the present study were observed by Marathe *et al.* (2011), who analyzed cowpea varieties with red and brown seed coats. A high antioxidant capacity was assessed using the DPPH (values greater than 400 $\mu\text{mol DPPH}/\text{g}$ sample) and ABTS (values greater than 12.0 $\mu\text{mol TEAC}/\text{g}$ sample) methods. The studied varieties exhibited high levels of phenolic compounds due to the color of the seed coat, which was reflected in the

antioxidant capacity. This may explain the differences observed in the present study because the analyzed beans had light-colored seed coats (white and green).

However, the levels measured in the present study were higher than the values assessed by Oboh (2006), who evaluated the ability of raw cowpea samples (two cultivars with white seed coats and three with brown) to scavenge the free radical DPPH, recording percentages of free radical inhibition in the range of 5.5-29.9%. High percentages of inhibition of the DPPH radical were observed in the present study, which ranged from 40-50% in the raw cultivars and from 25-40% after cooking.

The reduced antioxidant action recorded in the present study may have occurred because thermal processing promotes the destruction of bioactive compounds, leading to their reduction and/or the formation of new compounds with pro-oxidant action.

Among the analyzed bioactive compounds, a strong correlation ($R^2=0.98$) was observed between the levels of phenolic compounds (particularly the total flavonoids) in the grains cowpea extracts and the antioxidant activity evaluated using the two methods (data not shown).

Thus, the phenolic compounds (specifically the flavonoids) contributed to the high antioxidant activity of the analyzed cultivars, as the raw cultivar BRS Aracê exhibited the highest levels of phenolic compounds, which was reflected in its high DPPH and ABTS free radical-scavenging capacities.

The correlations of the total phenolic compounds and flavonoids with the results of the antioxidant activity assessment tests were high, corroborating the reports of other researchers, including Marathe *et al.* (2011) and Xu and Chang (2012), when evaluating legumes.

Hassimoto *et al.* (2005) emphasized that antioxidant activity does not result from one specific antioxidant compound alone, but rather from the synergism among such compounds, resulting in the total antioxidant activity of foods. The present study suggests that the antioxidant activity of the analyzed cowpea cultivars basically results from the total phenolic compound class of bioactive compounds, among which the total flavonoids stood out in particular.

The grains cowpea studied both before and after cooking mostly showed high levels of bioactive compounds and antioxidant activity, corroborating several studies and reinforcing the role of beans as a functional food. The consumption of cooked grains together with the cooking broth contributes to retaining substances with antioxidant properties, including phenolic compounds and flavonoids. This is a key health-promoting aspect, and dietary supplementation with cowpea and/or cowpea flour in food products is recommended to help reduce the risk of no communicable chronic diseases, including cardiovascular disease, diabetes and cancer.

CONCLUSIONS

1. The cowpea grains studied before and after cooking showed high contents of bioactive compounds and antioxidant activity, which is consistent with several studies, reinforcing the role of beans as functional food, highlighting cultivar BRS Aracê;
2. Flavonoids were the main bioactive compounds contribute to the antioxidant activity of grain cowpea cultivars, confirmed by the high correlation observed;
3. For all bioactive compounds evaluated, thermal processing applied promoted a significant decrease in the content of these, however, grains remained relevant nutritional and functional characteristics, it is recommended to cowpea consumption with the cooking broth for retaining compounds with antioxidant properties.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq) for funding the study through Public Notice no. 482292/2011-3, the National Program for Academic Cooperation/Collaboration Project (Programa Nacional de Cooperação Acadêmica/CASADINHO, PROCAD/CASADINHO), Process no. 552239/2011-9 and the Project with Process no. 301939/20128. Additionally, we thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES) for the graduate scholarship granted, and the Brazilian Agricultural Research Corporation - Mid North (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa - Meio Norte) for providing the cowpea cultivars used in the study.

REFERENCES

- ADÃO, R. C.; GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines and carbohydrate changes during ripening of 'Prata' banana (*Musa acuminata* x *M. balbisiana*). **Food Chemistry**, v. 90 n. 4, p. 705-711, 2005.
- ADEBOOYE, O. C.; SINGH, V. Effect of cooking on the profile of phenolics, tannins, phytate, amino acid, fatty acid and mineral nutrients of whole-grains and decorticated vegetable cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Journal of Food Quality**, v. 30, n. 6, p. 1101-1120, 2007.
- ANDRADE, D. F. **Statistics for the agricultural and biological sciences: thoughts on experimentation**. 4. ed. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2010.

- BARRETO, G. P. M.; BENASSIB, M. T.; MERCADANTE, A. Z. Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by multivariate analysis to free radical scavenger activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 10, p. 1856-1861, 2009.
- BLASA, M. et al. Raw *Millefiori* honey is packed full of antioxidants. **Food Chemistry**, v. 97, n. 2, p. 217-222, 2006.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- FREIRE FILHO, F. R. et al. Melhoramento genético. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 29-92.
- GIAMI, S. Y. Compositional and nutritional properties of selected newly developed lines of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 7, p. 665-673, 2005.
- GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. In: R. E. Wrolstad (Ed.), Anthocyanins: Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: J. Wiley, & Sons, p.1-13, 2001.
- HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 2928-2935, 2005.
- KALAC, P.; KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. **Food Chemistry**, v. 90, n. 1-2, p. 219-230, 2005.
- KALPANADEVI, V.; MOHAN, V. R. Effect of processing on antinutrients and *in vitro* protein digestibility of the underutilized legume, *Vigna unguiculata* (L.) Walp subsp. *Unguiculata*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 2, p. 455-461, 2013.
- LIMA, G. P. P. et al. Polyamines contents in some foods from Brazilian population basic diet. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1294-1298, 2006.
- MARATHE, S. A. et al. Comparative study on antioxidant activity of different varieties of commonly consumed legumes in India. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2005-2011, 2011.
- OBOH, G. Antioxidant properties of some commonly consumed and underutilized tropical legumes. **European Food Research Technology**, v. 224, n. 1, p. 61-65, 2006.

- OJWANG, L. O. et al. Proanthocyanidin profile of cowpea (*Vigna unguiculata*) reveals catechin-o-glucoside as the dominant compound. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 35-43, 2013.
- PHILLIPS, R. D. et al. Utilization of cowpeas for human food. **Field Crops Research**. v. 82, n. 2-3, p. 193-213, 2003.
- PRICE, M. L.; SCOYOC, S. V.; BUTLER, L. G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 1214-1218, 1978.
- RANILLA, L. G.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Effect of different cooking conditions on phenolic compounds and antioxidant capacity of some selected brazilian bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n.13, p. 5734–5742, 2009.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABST radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.
- RUFINO, M. S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, vol. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.
- SINGLETON, V. I.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid agents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.
- SILVA, A. G.; ROCHA, L. C.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Physico-chemical characterization, protein digestibility and antioxidant activity of comun bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food and Nutrition**, Araraquara, v. 20, n. 4, p. 591-598, 2009.
- VOLDEN, J. et al. Effect of thermal treatment on glucosinolates and antioxidant-related parameters in red cabbage (*Brassica oleracea* L. ssp. *capitata* f. *rubra*). **Food Chemistry**, v. 109, n. 3, p. 595-605, 2008.
- VOLDEN, J. et al. Processing (blanching, boiling, steaming) effects on the content of glucosinolates and antioxidant-related parameters in cauliflower (*Brassica oleracea* L. ssp. *botrytis*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 63-73, 2009.
- WANG, M. L. et al. Flavonoid content in different legume germplasm seeds quantified by HPLC. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v. 6, n. 1, p. 62-69, 2008.
- XU, B.; CHANG, S. K. C. Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of Pinto and Black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4754-4764, 2009.

XU, B.; CHANG, S. K. C. Reduction of antiproliferative capacities, cell-based antioxidant capacities and phytochemical contents of common beans and soybeans upon thermal processing. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 974-981, 2011.

XU, B.; CHANG, S. K. C. Comparative study on antiproliferation properties and cellular antioxidant activities of commonly consumed food legumes against nine human cancer cell lines. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1287-1296, 2012.

CAPÍTULO II

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO CIENTÍFICO II

Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Grains of Biofortified Cowpea Cultivars, Before and After Cooking, submetido à revista Current Nutrition and Food Sciences, ISSN: 1573-4013.

Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Grains of Biofortified Cowpea Cultivars, Before and After Cooking

Nara Vanessa dos Anjos Barros^a, Bruna Barbosa de Abreu^a, Marcos Antônio da Mota Araújo^b, Maurisrael de Moura Rocha^c, Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo^{a*}

^aDepartament of Nutrition, Food and Nutrition Postgraduate Program, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí,, Brazil, ^bMunicipal Health Foundation, Teresina, Piauí, Brazil, ^cEmbrapa, Teresina, Piauí, Brazil

Abstract: Objective: This study aimed to identify and quantify phenolic compounds in grains of biofortified cowpea (*Vigna unguiculata*) cultivars before and after cooking. **Method:** We analyzed two cultivars of genetically improved cowpeas, namely BRS Aracê and BRS Tumucumaque. Cultivars were analyzed (in triplicate) raw and after cooking in a pressure cooker. Concentrations of phenolics, flavonoids, anthocyanins, total flavanols, and antioxidant activity were determined. Phenolic compounds were identified and quantified using high performance liquid chromatography (HPLC). **Results:** Grains of cultivar BRS Tumucumaque had higher concentrations of total phenolic compounds before (297.23 ± 4.24 (mean \pm standard deviation) mg/100 g) and after (147.15 ± 6.94 mg/100 g) cooking, and also had higher concentrations of total flavonoids before (49.36 ± 2.02 mg/100 g) and after (23.97 ± 0.67 mg/100 g) cooking. Anthocyanins were not measured in the grains of either cultivar. There was a statistically significant reduction in the concentration of total flavanols after cooking, with a greater retention in cultivar BRS Aracê. Similarly, antioxidant activity was significantly reduced after cooking, with greater reductions in cultivar BRS Tumucumaque than in cultivar BRS Aracê. Five phenolic acids were identified and quantified, including gallic, caffeic, and ferulic acids. **Conclusion:** We conclude that cooking affected the concentrations of phenolic compounds, as well as the antioxidant activity resulting from these. The cultivars analyzed contained beneficial compounds that can contribute to disease prevention and health maintenance.

Keywords: *Vigna unguiculata*, bioactive compounds, phenolic acids, total flavonoids, total flavanols, antioxidant activity, thermal processing.

1. INTRODUCTION

Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] is a legume commonly known in Brazil as caupi, string beans, or macassar beans. According to the 11th survey conducted by the National Supply Company (CONAB) [1], 848,300 metric ton of cowpeas were produced in 1,520.3 thousand hectares in Brazil in 2017-2018, with an average productivity of 558 kg ha⁻¹.

Cowpea is a staple food that provides large amounts of protein, carbohydrates, dietary fiber, B vitamins, and essential minerals, and has a low lipid content and few

antinutritional factors. Cowpeas also contain bioactive compounds which have beneficial effects on human health [2]. Such compounds include the polyphenols, which have high antioxidant activity [3, 4, 5, 6].

According to Zhao *et al.* [7], epidemiological studies have reported that the consumption of foods rich in phenolic antioxidants protects against chronic non-communicable diseases, such as cancer, aging, diabetes and cardiovascular diseases. Phenolic antioxidants act as kidnappers of free radicals, reducing agents, and metal ion chelators, preventing oxidative damage to biomolecules such as DNA, lipids, and proteins.

In cowpeas, phenolic compounds are concentrated in the seed coat of the grains, and provide most of the coloring of the seed of this legume. The main types of polyphenols present in legumes, particularly in cowpeas, are phenolic acids and flavonoids. In addition, the concentration of phenolic compounds and the functional properties of cowpea vary according to the cultivar [2], and the thermal processing applied, and thus, there is variation in the antioxidant activity [8].

Several earlier studies have shown that cooking significantly reduces the concentrations of phenolic compounds and antioxidant activity (assessed by *in vitro* assays) in cowpea cultivars [3, 9]. The reduction of concentrations of phenolic compounds obtained under conditions of high temperature and pressure cooking can be caused by chemical transformations, decomposition of phenolic compounds, the conversion of these compounds into other products or insoluble phenolic-protein complexes, as well as the polymerization and/or decomposition of aromatic structures.

Previous studies have described the types of phenolic compounds present in cowpea cultivars [5, 10, 11, 12]. For example, Zia-Ul-Haq *et al.* [12] described the presence of chlorogenic and caffeic acids, and neochlorogenic acid in four cowpea cultivars consumed in Pakistan. Cai, Hettiarachchy and Jalaluddin [10] assessed 17 cowpea varieties grown in Arkansas, and identified protocatechuic acid as the main phenolic acid present in the esterified forms, with concentrations ranging from 9.3 ± 1.3 to 92.7 ± 0.8 mg/100 g.

Using grains of cultivars biofortified with the minerals iron and zinc, Moreira-Araújo *et al.* [5] obtained concentrations of 45.4 ± 2.667 mg/100 g of gallic acid and 27.8 ± 2.991 mg/100 g of caffeic acid in cultivar BRS Tumucumaque. The same authors found high gallic (67.19 ± 6.20 mg / 100 g) and ferulic (32.07 ± 0.753 mg / 100

g) acid concentrations in the cultivar BRS Xiquexique [11]. These studies analyzed raw grains of cowpea cultivars, in the form of flour.

It is well established in the literature that cooking promotes chemical and physical modifications in foods, as well as in phytochemical concentrations. However, studies evaluating the profile of bioactive compounds and the effect of thermal processing on grains of cowpea cultivars are rare. Thus, the objective of the present study was to identify and quantify the bioactive compounds and antioxidant activity in grains of two biofortified cowpea cultivars, before and after cooking.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1 Reagents and standards

Folin-Ciocalteu reagent, catechin, 2,2'-azinobis (3- ethylbenzothiolin-6-sulfonic acid) (ABTS), 1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Gallic acid, hydrochloric acid (HCl), sodium carbonate (Na₂CO₃), methanol, acetone, potassium chloride (KCl), sodium acetate (CH₃COONa. 3 H₂O) and vanillin, were acquired from Vetec (Rio de Janeiro-RJ, Brazil). Sodium nitrite (NaNO₂), sodium hydroxide (NaOH), aluminum chloride (AlCl₃), citric acid, ferric chloride and quercetin were acquired from Cromoline (Diadema-SP, Brazil).

TPTZ (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine), acetonitrile, methyl alcohol and the phenolic acid standards used were gallic, caffeic, chlorogenic, ellagic, epicatechin, ferulic, p-coumaric and quercetin, which were acquired from Sigma (St. Louis, MO, USA). All reagents used were analytical grade, except for chromatographic analysis reagents, which were HPLC grade. Ultrapure water for dilution of samples and standards was obtained from a milli-Q system (Millipore Corp, Milford, MA, USA).

2.2 Samples

The grains of cowpea cultivars from two different cultivars were supplied by the Genetic Resources and Breeding Sector (Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI, Brazil) and kept in the Laboratory of Bromatology and Food Biochemistry (Department of Nutrition/Health Sciences Center, Federal University of Piauí, Teresina-PI, Brazil) at a temperature of 8 °C, in polyethylene bags, until analysis.

Grains of two cowpea cultivars, BRS Aracê and BRS Tumucumaque, were analyzed before and after cooking. The raw samples were analyzed one week after

receiving them, and the cooking was performed after the analyses in the raw grains were completed. To process raw cowpeas, they were crushed in a cyclone mill (Tecnal, 651/2, São Paulo, Brazil) until a homogeneous powder (0.5 mesh) was obtained. The cowpeas were cooked using a bean:water ratio of 1:3 (w/v) in a 2 L domestic pressure cooker for 13 minutes, at 121 °C. After cooking, the cooked grains and the respective cooking broth were macerated, and stored under refrigeration (± 8 °C) until the subsequent analyses [3].

2.3 Preparation of extracts

The extracts of the cowpea samples were prepared according to the methodology of Rufino *et al.* [13], using a mixture of the following solvents: methanol (50%), acetone (70%), and milli-Q water.

2.4 Analysis of bioactive compounds

The concentrations of phenolic compounds in the extracts were determined by spectrophotometry using Folin-Ciocalteu reagent, and the readings of the absorbances of the samples were performed at 765 nm using a spectrophotometer (BEL, Model 1102, Monza, Milan, Italy). The results are expressed as milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per 100 g of dry sample. The concentration of total phenolic compounds was measured by interpolation of absorbance using a standard curve of previously constructed gallic acid standards [14].

The method described by González-Aguilar *et al.* [15] was used to evaluate the concentration of total flavonoids, and the absorbance was then measured at 425 nm in a spectrophotometer (BEL, Model 1102, Monza, Milan, Italy). Different concentrations of quercetin (0-100 mg/L) were used to construct a standard curve, and the results are expressed as milligrams of quercetin equivalents (QE) per 100 g of dry sample.

The analysis of the total anthocyanin concentration was performed following the pH difference method [16]. The absorbance was measured in a spectrophotometer (BEL, model 1102, Monza, Milan, Italy) at the maximum absorption wavelength of each sample and at 700 nm, in buffer solutions at pH 1.0 and pH 4.5, and using distilled water as a blank. The results are expressed as equivalents of cyanidine-3-glucoside (Cy-Glu-3) per 100 grams of dry sample.

The concentration of total flavanols or condensed tannins were evaluated colorimetrically using the vanillin method [17], and the absorbance readings were performed in a spectrophotometer (BEL, Model 1102, Monza, Milan, Italy) at 500 nm. The catechin was used as a standard, and the results are expressed as milligrams of catechin equivalents (CE) per 100 g of dry sample.

2.5 Identification of phenolic compounds

The identification and quantification of phenolic compounds were performed by high performance liquid chromatography (HPLC), according to the methods of Pereira et al. [18] and Tiberti et al. [19].

The phenolic acid standards used were solubilized in pure methanol. The mobile phases used were filtered through HAWP and HVWP membranes of aqueous and organic solvents, respectively (0.45 mm pore size, Millipore Corporation, Milford, MA, USA), with the aid of a vacuum pump. Before the samples were injected into the chromatograph, they were filtered in filters for syringes with 0.45 μm pore and 33 mm diameter (Millipore Corporation, Milford, MA, USA).

The phenolic compounds were analyzed using a LC-20 AT high-performance liquid chromatograph (Shimadzu Corporation, Japan). The separation was performed using a Shimadzu GVP-ODS pre-column (10 mm \times 4.6 mm) in line with a Shim-pack VP-ODS column (150 \times 4.6 mm i.d., 5- μm particle size) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) equipped with a UV-Vis SPD-20A detector. The flow rate was maintained at 0.7 mL \cdot min⁻¹ and the column temperature was maintained at 40 °C, with an injection volume of 10 μL . The gradient of the mobile phase was composed of (A) methanol with 1% acetic acid and (B) 1% acetic acid: from 0-1 min, 10% A; 1-5 min 15% A; 5-10 min, 20% A; 10-15 min, 25% A; 15-25 min, 30 % A; 25-30 min, 70 % A; 30-40 min, 80 % A; 40-50 min, 10 % A. The total run time was 50 min. The compounds were detected at 280 (i.e., gallic acid, epicatechin, and ellagic acid), 320 (i.e., caffeic, p-coumaric, chlorogenic, and ferulic acids), and 360 nm (i.e., quercetin). The peaks were identified by comparison with the retention time of standards, and the quantification of the compounds was based on the areas of the respective peaks detected using the LabSolutions acquisition software version 5.57 SP1 Copyright (Shimadzu Corporation). The column calibration was performed by injecting the standards in triplicate at nine different concentrations (i.e., 0.014; 0.056; 0.225; 0.45; 7.81; 15.62;

31.25; 62.5, and 120.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The levels of phenolic compounds were expressed as $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

2.6 Antioxidant activity

2.6.1 DPPH method

The DPPH free radical capture method was performed according to Brand-Williams *et al.* [20]. The absorbances were read at 515 nm in a spectrophotometer (BEL, model 1102, Monza, Milan, Italy). A standard curve was constructed using Trolox at different concentrations (0-100 mg/L) as a reference. The results are expressed as μmol of antioxidant capacity equivalent to Trolox (TEAC) per 100 g of dry sample.

2.6.2 ABTS method

The ABTS free radical capture method was conducted according to Re *et al.* [21]. The absorbance was measured in a spectrophotometer (BEL, Model 1102, Monza, Milan, Italy) at 734 nm. A standard curve was constructed using Trolox at different concentrations (0-100 mg/L) as a reference. The results are expressed as μmol of TEAC per 100 g of dry sample.

2.6.3 FRAP method

To evaluate the antioxidant activity using the FRAP (ferric reducing antioxidant potential) technique, the method described by Benzie and Strain [22] was used, with modifications by Arnous, Makris and Kefalas [23]. Absorbance was measured in a spectrophotometer (BEL, Model 1102, Monza, Milan, Italy) at 620 nm. A standard curve was constructed using Trolox at different concentrations (0-100 mg/L) as a reference. The averages were calculated according to the standard curve, and the results are expressed as μmol of TEAC per 100 g of dry sample.

2.7 Statistical analysis

Data analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences Program - SPSS, Version 17.0 [24]. The results are shown as means and standard deviations. Before starting the statistical analyses, the Kolmogorov-Smirnov non-parametric normality test was applied to test for normal distribution of the data. Subsequently, Student's T-test was used to verify the differences between the averages of raw and cooked grains, and the types of cultivars, while analysis of

variance (ANOVA), and Tukey multiple comparisons test were used to identify differences between concentrations of the phenolic compounds, with significance set at $p \leq 0.05$, and a confidence interval (CI) of 95% [25].

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

Table 1 shows the concentrations of total phenolic compounds obtained in the grains of the two cultivars, before and after cooking.

Table 1. Concentration of total phenolic compounds in raw and cooked grains of two different cultivars of biofortified cowpeas.

Cultivars	Total phenolic compounds (mg GAE */100 g)	
	Raw grains	Cooked grains
BRS Aracê	227.98 ± 4.12 ^{aA}	126.58 ± 0.00 ^{bA}
BRS Tumucumaque	297.23 ± 4.24 ^{aB}	147.15 ± 6.94 ^{bB}

Results are shown as mean ± standard deviation. *Gallic acid equivalents. The same lowercase letters between the raw and cooked cowpeas and the same uppercase letters between the cultivars indicate there is no significant difference between the averages (Student's t test, $p \leq 0.05$, 95% confidence interval).

The results demonstrated that the concentrations of phenolic compounds in the raw grains were higher than in the grains subjected to cooking, for both cultivars evaluated. Thus, cooking led to a significant reduction ($p \leq 0.05$) in the concentration of this bioactive compound (Table 1).

We found a statistically significant difference between concentrations of phenolic compounds in raw grains of the two cultivars studied, with a higher concentration of phenolic compounds (297.23 mg/100 g) in cultivar BRS Tumucumaque. This concentration is higher than that obtained by Adjei-Fremah, Jackai and Worku [26] in methanol extracts of the leaves and grains of seven varieties of cowpea, which contained an average concentration of polyphenols of 290.51 ± 38.02 mg GAE/100g in the leaves and 118.10 ± 71.96 mg GAE/100g in the grains. After cooking, the cultivar BRS Aracê had the lowest concentration of phenolic compounds (126.58 mg/100 g) (Table 1).

Based on a study by Marathe *et al.* [11], who analyzed vegetables such as common bean (*Phaseolus vulgaris*), cowpea, chickpea (*Cicer arietinum*), soybean

(*Glycine max*), and pea (*Pisum sativum*), among others, vegetables with different concentrations of phenolic compounds can be classified in three different groups. These authors classified vegetables as those with low concentrations of total phenolic compounds (<100 mg GAE/100 g), those with moderate concentrations of total phenolic compounds (100-200 mg GAE/100 g), and those with high concentrations of total phenolic compounds (>200 mg GAE/100 g). Thus, the raw grains of the cowpea cultivars analyzed in this study can be classified as vegetables with high concentrations of phenolic compounds, while the cooked grains can be classified as vegetables with a moderate concentration of phenolic compounds.

The concentrations of total flavonoids in the grains of raw and cooked cultivars are shown in Table 2. Cooking resulted in a significant decrease ($p \leq 0.05$) in the concentrations of these compounds. The highest concentrations of total flavonoid compounds were obtained in the cultivar BRS Tumucumaque, before and after cooking.

Table 2. Concentrations of total flavonoids in raw and cooked grains of two different cultivars of biofortified cowpeas.

Cultivars	Total flavonoids (mg QE */100 g)	
	Raw grains	Cooked grains
BRS Aracê	42.82 ± 1.01 ^{aA}	22.45 ± 1.18 ^{bA}
BRS Tumucumaque	49.36 ± 2.02 ^{aB}	23.97 ± 0.67 ^{bA}

Results are shown as mean ± standard deviation. *Quercetin equivalent. The same lowercase letters between the raw and cooked cowpeas and the same uppercase letters between the cultivars indicate there is no significant difference between the averages (Student's t test, $p \leq 0.05$, 95% confidence interval).

The reduction in the concentration of phenolic compounds and total flavonoids after cooking was also observed in other studies. Cavalcante et al. [27] evaluated five leguminous cultivars using the same methodology as used in this study, and found significant reductions in concentrations of these bioactive compounds. These authors emphasized that cultivar BRS Marataoã had the highest concentrations of total polyphenols and total flavonoids in raw and cooked grains.

Sombié et al. [2] analyzed 31 cowpea genotypes from Burkina Faso, and obtained lower concentrations of phenolic compounds (63.14 to 190.7 mg GAE/100 g)

and flavonoids (7.46 to 23.95 QE/100 g) than those found in this study. However, in a study by Zia-UI-Haq et al. [12], higher concentrations of phenolic compounds (1,190 – 1,620 mg GAE/100 g) were found in the flours of four raw cowpea cultivars consumed in Pakistan.

The total concentration of flavonoids obtained in the raw grains was consistent with that reported by Salawu et al. [28], who analyzed the nutritional composition and concentrations of phenolic compounds and total flavonoids of cowpeas commonly consumed in Nigeria that were and were not infested with cowpea weevils (*Callosobruchus maculatus*), and reported concentrations ranging from 36 to 95 mg of QE per 100 g of sample.

Wang et al. [29], when analyzing 40 varieties of selected vegetables, including cowpeas, found high concentrations of total flavonoids in cowpeas sampled in 2004 (441.9 µg/g) and 2005 (252.9 µg/g). Aziagba et al. [30] verified that all parts of the varieties of cowpeas (leaves, stems, roots, and seeds) contain different concentrations of flavonoids. The Oloka variety, in particular, was found to contain the highest concentrations of flavonoids in the stem, roots, and seeds. The authors reported that cowpeas are a good source of flavonoids and, therefore, can be useful as food, and in the manufacture of drugs.

The differences in the concentrations of bioactive compounds observed in the present study in comparison with those reported in other studies are to be expected, considering that, according to Deng et al. [31], the concentrations of substances with bioactive properties in fruits and legumes are influenced by genetic factors, geographic region, climate, degree of maturity and storage condition. Furthermore, according to Marathe et al. [4], the extraction capacity of phenolic compounds varies depending on the type of solvent (polarity) used, the degree of polymerization of phenolic compounds, interaction with other food constituents, as well as the extraction time and temperature. Methanol is the most suitable solvent for extraction of these compounds, and was one of the solvents used in the present study.

The presence of anthocyanins was not observed in the grains of the cultivars analyzed. According to Ha et al. [32], the total anthocyanin concentration in cowpeas was correlated with the grain coating phenotype, since this bioactive compound is mainly located in the tegument. Thus, it is not surprising that we did not detect total anthocyanins in the cultivars evaluated in the present study, since they were cultivars with light teguments (white color - BRS Tumucumaque and green - BRS Aracê).

The concentration of total flavanols in the grains of both cowpea cultivars was significantly reduced after cooking, as shown in Table 3.

Table 3. Concentrations of total flavanols and percentage of reduction in flavanol concentration in raw and cooked grains of two different cultivars of biofortified cowpeas.

Cultivars	Condensate tannins (mg CE* / 100 g)		
	Raw grains	Cooked grains	Reduction (%)
BRS Aracê	4.72 ± 0.00 ^a A	3.75 ± 0.00 ^b A	20.55
BRS Tumucumaque	12.81 ± 0.67 ^a B	2.35 ± 0.00 ^b A	81.66

Results are shown as mean + standard deviation. *Catechin equivalent. The same lowercase letters between the raw and cooked cowpeas and the same uppercase letters between the cultivars indicate there is no significant difference between the averages (Student's t test, $p \leq 0.05$, 95% confidence interval).

The highest concentrations of flavanols were found in the raw grain of the cultivar BRS Tumucumaque. There was no significant difference ($p > 0.05$) between concentrations of flavanols in the cooked grains of the two cultivars, even though there was a difference in the raw grain. It is important to highlight that the cultivar BRS Aracê had a higher retention of the flavanol concentration, because after cooking there was a reduction in flavanol concentration of 20.5%, compared to an approximate loss of 82.0% in cultivar BRs Tumucumaque.

In a study by Cavalcante et al. [27], thermal processing caused a decrease in the concentration of flavanols or condensed tannins in the grains of cultivars BRS Itaim and BRS Cauamé, due to the ability of tannins to spread from cotyledon to endosperm and to bind to proteins, which would hinder quantification by the traditionally used methods. This decrease was also observed by Ramírez-Cárdenas, Leonel and Costa [33], who evaluated different common bean grains, and found a 64-83% reduction in flavanol concentration. Similarly, Adebooye and Singh [9] analyzed two varieties of whole decorticated cowpea grains before and after cooking, and found a significant reduction in tannins, and retention percentages of 52% and 59% for these compounds.

The antioxidant activity, measured using DPPH, ABTS, and FRAP methods, was higher in raw and cooked grains of cultivar BRS Tumucumaque than in cultivar Aracê (Table 4).

Table 4. Antioxidant activity, measured using by DPPH, ABTS, and FRAP methods, in different raw and cooked grains of two cultivars of biofortified cowpeas.

Method	Cultivars	$\mu\text{mol TEAC}^* / 100\text{g}$	
		Raw grains	Cooked grains
DPPH	BRS Aracê	490.55 + 22.05 ^{aA}	336.14 + 8.34 ^{bA}
	BRS Tumucumaque	493.54 + 14.26 ^{aB}	278.39 + 8.34 ^{bB}
ABTS	BRS Aracê	799.21 ± 15.71 ^{aA}	428.88 ± 6.74 ^{bA}
	BRS Tumucumaque	837.73 ± 15.39 ^{aB}	528.92 ± 17.83 ^{bB}
FRAP	BRS Aracê	356.53 ± 7.85 ^{aA}	162.30 ± 7.85 ^{bA}
	BRS Tumucumaque	453.10 ± 6.79 ^{aB}	274.86 ± 2.61 ^{bB}

Results are shown as mean ± standard deviation. *Antioxidant capacity equivalent to Trolox. The same lowercase letters between the raw and cooked cowpeas and same uppercase letters between the cultivars indicate there is no significant difference between the averages (Student's T test, $p \leq 0.05$, 95% confidence interval).

After processing, a significant reduction ($p \leq 0.05$) was observed in the antioxidant activity. This reduction may have been due to cooking promoting the destruction of bioactive compounds, leading to reductions in concentrations of bioactive compounds, and/or the formation of new compounds with pro-oxidant action. The method of capturing the ABTS radicals was the most effective in determining the antioxidant activity, since the highest concentrations were observed both in the raw and cooked grains using this method, as also found by Barros et al. [3] and Cavalcante et al. [27].

The results of the antioxidant activities in the present study were higher than those obtained by Nassourou et al. [34], who measured antioxidant activity using the ABTS method, and reported activities in the range of 14.07 to 352.04 $\mu\text{mol TEAC}/100$ g of sample in several combinations of cowpea crossings. Considering the classification proposed by Marathe et al. [4], the grains of the raw cultivars analyzed in this study had moderate antioxidant activity, with antioxidant activities in the range of 600-1200 $\mu\text{mol TEAC}/100$ g of sample.

For raw grains, the results obtained regarding antioxidant activities in the present study for the FRAP assay were higher than those observed in a study by Sombié *et al.* [2], which ranged from 25.51 to 311.46 mg QE/100 g. Moreover, the

antioxidant activities found here were also higher than those obtained in a study by Chaieb *et al.* [35], who analyzed the in vitro antioxidant activity of 13 genotypes of fava beans (*Vicia faba*).

It is important to emphasize that the antioxidant activity of plant foods is the result of the synergistic and cumulative action of a wide variety of compounds with antioxidant properties, such as vitamins C and E, and total polyphenols, mainly phenolic acids and flavonoids, in addition to carotenoids, terpenoids, and compounds originating from the reaction of Maillard and oligo mineral elements. Among these molecules, polyphenols are more widely studied, and are mainly responsible for reducing oxidative stress in humans [35].

We were able to identify the following phenolic compounds in the raw grains of the cultivars analyzed: gallic, chlorogenic, caffeic, p-coumaric, and ferulic acids (Table 5).

Table 5. Identified phenolic compounds and their concentrations in raw and cooked grains of two different cultivars of biofortified cowpeas.

Cultivars	Phenolic compounds	mg/100g	
		Raw grains	Cooked grains
BRS Aracê	Gallic	47.05 ± 0.60 ^{aA}	40.32 ± 0.50 ^{bA}
	Chlorogenic	3.43 ± 0.04 B	ND
	Caffeic	26.35 ± 0.91 ^{aC}	20.80 ± 0.55 ^{bB}
	p-coumaric	1.41 ± 0.03 B	ND
	Ferulic	23.65 ± 0.41 ^{aD}	21.68 ± 0.31 ^{aB}
BRS Tumucumaque	Gallic	55.02 ± 0.17 ^{aA}	45.10 ± 0.41 ^{bA}
	Chlorogenic	1.28 ± 0.01 B	ND
	Caffeic	25.34 ± 0.32 ^{aC}	16.28 ± 0.27 ^{bB}
	p-coumaric	1.86 ± 0.04 BD	ND
	Ferulic	18.70 ± 0.71 ^{aE}	10.89 ± 0.03 ^{bC}

Results are shown as mean ± standard deviation. ND: not detected. The same lowercase letters between the raw and cooked cowpeas indicate there is no significant difference between the averages (Student's t test, $p < 0.05$, 95% confidence interval). The same uppercase letters between the types of compounds indicate there is no significant difference between the averages (one way ANOVA with post hoc multiple comparisons, and Tukey tests, $p \leq 0.05$, 95% confidence interval).

In general, the distribution of these compounds varied between cultivars, and also by the type of processing applied. After cooking, there was a significant reduction ($p \leq 0.05$) in the concentrations of these compounds. It was not possible to quantify chlorogenic and p-coumaric acids in the cooked grains.

According to Awika and Duodu [36], the concentration of phenolic acids in cowpea grains depends on the phenotype, with concentrations ranging from 14.8 to 117.6 mg/100 g. Thus, the raw and cooked grains analyzed in this study had concentrations of phenolic acids that fit this range, and these concentrations were higher than those reported for common beans, which ranged from 19.1 to 48.3 mg/100 g for a set of 15 varieties of beans consumed in the United States [37].

For the raw grains, high concentrations of gallic, caffeic, and ferulic acid were found in the cultivars evaluated. Higher concentrations of gallic acid were found in cooked grains of both cultivars. The results of the present study for the raw grains were higher than those obtained by Deng *et al.* [31], who found 6.70 ± 0.81 mg/100 g of gallic acid and 0.66 ± 0.05 mg/100 g of chlorogenic acid in commercialized cowpea grains in Guangzhou, China.

The results obtained for raw grains of the cultivar BRS Tumucumaque in this study differ from those obtained by Moreira-Araújo *et al.* [5] for this cultivar. These differences can be explained by environmental factors, such as climatic conditions of planting and harvest, as well as the conditions used in the extraction of compounds, including the type of solvent used and method of identification, which differ between the Moreira-Araújo *et al.* [5] study and the present study.

The reduction in the concentration of phenolic acids in the grains cooked in the present study can be explained by the fact that the phenolic acids may have formed insoluble complexes with proteins and carbohydrates and, therefore, became difficult to extract. It is also possible that some phenolic compounds may have been oxidized during cooking, as reported by other researchers such as Luthria and Pastor-Corrales [37], Nderitu *et al.* [6], and Siddhuraju and Becker [38].

According to Nayeem *et al.* [39], gallic acid and its derivatives have shown potential for combatting oxidative damage, manifestations of cancer, microbial infections, neurodegenerative disorders, and aging. In addition, this phenolic acid can be used in the treatment of diabetes, ischemic heart diseases, ulcers, and other diseases. Another acid obtained in high concentrations was ferulic acid, which, according to Kumar and Pruthi [40], has a wide variety of biological activities such as antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, antiallergic, hepatoprotective, anticarcinogenic, and antithrombotic activities.

Despite the significant losses of phenolic acids during cooking, both cultivars analyzed in the present study could be used for the control and prevention of chronic

non-communicable diseases, such as hypertension, diabetes and obesity, because both cultivars contain phenolic acids with important antioxidant properties.

According to the results of our study, although the cultivar BRS Tumucumaque has high concentrations of bioactive compounds, phenolic acids, and antioxidant activities, this cultivar had higher losses of these qualities after cooking, compared to the grains of the cultivar BRS Aracê. Thus, considering that the predominant consumption form of cowpeas in Brazil is the cooked grain, and the thermal processing conditions applied, the cultivar BRS Aracê, which had a greater retention of the content of compounds with bioactive properties and high antioxidant activity, is preferable over cultivar BRS Tumucumaque.

4. CONCLUSION

Based on the results of our study, we conclude that the thermal processing applied (i.e. cooking for 13 minutes, at 121 °C) affected the concentration of phenolic compounds, as well as the antioxidant activity resulting from these compounds. The best cultivar in terms of phenolic compounds and antioxidant activity was BRS Aracê, due to the lower losses and greater retention of compounds with antioxidant properties after cooking. In addition, cooking resulted in a significant decrease in the concentration of phenolic acids in the analyzed cultivars, probably because of thermal degradation or conversion into other chemical components.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that the content of this article has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the funding granted by means of the PROCAD/CASADINHO – CNPq – CAPES, Process 552239/2011-9, Edital Universal CNPq 14/2011, Process 482292/2011-3 and Edital Universal CNPq 01/2016, Process 431314/2016-0.

NVA Barros, BB Abreu, MAM Araújo and MM Rocha worked on the research and writing of this article; as well as in the critical review and approval of the version to be published. RSR Moreira-Araújo contributed to the design, research and writing of

the manuscript, as well as the critical review and approval of the version to be published.

REFERENCES

- [1] Conab, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos - Safra 2017/18**. Brasília: Conab 2018; 5(11): 148p.
- [2] Sombié PAED, Compaoré M, Coulibaly AY, Ouédraogo JT, Tignégré JBDLS, Kiendrébéogo M. Antioxidant and Phytochemical Studies of 31 Cowpeas (*Vigna unguiculata* (L. Walp.)) Genotypes from Burkina Faso. **Foods** 2018; 7(143): 1-9.
- [3] Barros NVA, Rocha MM, Glória MBA, Araújo MAM, Moreira-Araújo RSR. Effect of cooking on the bioactive compounds and antioxidant activity in grains cowpea cultivars. **Cienc Agron** 2017; 48(5): 824-831.
- [4] Marathe SA, Rajalakshmi V, Jamdar SN, Sharma A. Comparative study on antioxidant activity of different varieties of commonly consumed legumes in India. **Food Chem Toxicol**. 2011; 49(9): 2005-2012.
- [5] Moreira-Araújo RSR, Sampaio GR, Soares RAM, Silva CP, Araújo MAM, Arêas JAG. Identification and quantification of antioxidant compounds in cowpea. **Cienc Agron** 2017; 48(5): 799-805.
- [6] Nderitu AM, Dykes L, Awika JM, Minnaar A, Duodu KG. Phenolic composition and inhibitory effect against oxidative DNA damage of cooked cowpeas as affected by simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chem** 2013; 141(3):1763–1771.
- [7] Zhao Y, Du SK, Wang H, Cai M. *In vitro* antioxidant activity of extracts from common legumes. **Food Chem** 2014; 152: 462–466.
- [8] Zhao C, Liu Y, Lai S, Cao H, Guan Y, Cheang WS, Liu B, Zhao K, Miao S, Riviere C, Capanoglu E, Xiao J. Effects of domestic cooking process on the chemical and biological properties of dietary phytochemicals. **Trends Food Sci Technol** 2019; 85: 55–66.

- [9] Adebooye OC, Singh V. Effect of cooking on the profile of phenolics, tannins, phytate, amino acid, fatty acid and mineral nutrients of whole-grains and decorticated vegetable cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **J Food Qual.** 2007; 30(6): 1101-1120.
- [10] Cai R, Hettiarachchy NS, Jalaluddin M. High-performance liquid chromatography determination of phenolic constituents in 17 varieties of cowpeas. **J Agric Food Chem.** 2003; 51(6): 1623-1627.
- [11] Moreira-Araújo RSR, Sampaio GR, Soares RAM, Silva CP, Araújo MAM, Arêas JAG. Identification and quantification of phenolic compounds and antioxidant activity in cowpeas of BRS Xiquexique cultivar. **Rev Caatinga** 2018; 31(1): 209-216.
- [12] Zia-Ul-Haq M, Ahmad S, Amarowicz R, De Feo V. Antioxidant activity of the extracts of some cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp) cultivars commonly consumed in Pakistan. **Molecules** 2013; 18(2): 2005-2017.
- [13] Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, Mancini Filho J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chem** 2010; 121(4): 996-1002.
- [14] Singleton VI, Rossi J. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid agents. **Am J Enol Vitic** 1965; 16(3): 144-158.
- [15] González-Aguilar, GA, Villegas-Ochoa MA, Martínez-Téllez MA, Gardea AA, Ayala-Zavala JF. Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. **J Food Sci** 2007; 72(3): s197–s202.
- [16] Giusti MM, Wrolstad RE In: Wrolstad RE (Ed.), Anthocyanins: Characterization and measurement with UV visible spectroscopy. **Curr. Protoc. Food Anal. Chem.** New York: J. Wiley, & Sons, 2001; p.1-13.
- [17] Price ML, Scoyoc SV, Butler LG. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **J. Agric. Food Chem** 1978; 26(5): 1214-1218.

- [18] Pereira CA, Yariwake JH, Lanças FM, Wauters JN, Tits M, Angenot L. HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochem Anal** 2004; 15(4): 241-8.
- [19] Tiberti LA, Yariwake JH, Ndjoko K, Hostettmann K. Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci** 2007; 846(1-2):378-384.
- [20] Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Sci Technol** 1995; 28(1): 25-30.
- [21] Re P, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic. Biol. Med** 1999; 26(9): 1231–1237.
- [22] Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal Biochem** 1996; 239(1): 70-76.
- [23] Arnous A, Makris D, Kefalas P. Correlation of Pigment and Flavanol Content with Antioxidant Properties in Selected Aged Regional Wines from Greece. **J Food Compost Anal** 2002; 15(6): 655-665.
- [24] SPSS, **Statistical Package for the Social Sciences – SPSS**, versão 17.0, 2006.
- [25] Hilbe J. **Methods of Statistical Model Estimation**. Boca Raton, FL: Chapman & Hall/CRC Press, 2013; 255 p.
- [26] Adjei-Fremah S, Jackai LEN, Worku M. Analysis of Phenolic Content and Antioxidant Properties of Selected Cowpea Varieties Tested in Bovine Peripheral Blood. **Am J Anim Vet Sci** 2015; 10(4): 235-245.

- [27] Cavalcante RBM, Araújo MAM, Rocha MM, Moreira-Araújo RSR. Effect of thermal processing on chemical compositions, bioactive compounds, and antioxidant activities of cowpea cultivars. **Rev Caatinga** 2017; 30(4):1050-1058.
- [28] Salawu SO, Ibukun EO, David O, Ola-Salawu BB. Effect of *Callosobruchus maculatus* Infestation on the Nutrient-antinutrient Composition, Phenolic Composition and Antioxidant Activities of Some Varieties of Cowpeas (*Vigna unguiculata*). **Adv J Food Sci Technol** 2014; 6(3): 322-332.
- [29] Wang ML, Gillaspie AG, Morris JB, Pittman RN. Flavonoid content in different legume germplasm seeds quantified by HPLC. **Plant Genet. Resourc.** 2008; 6(1): 62-69.
- [30] Aziagba BO, Okeke CU, Ezeabara CA, Ilodibia C, Ufele A. Determination of the Flavonoid Composition of Seven Varieties of *Vigna unguiculata* (L.) Walp as Food and Therapeutic Values. **Univers. J. Appl. Sci** 2017; 5(1): 1-4.
- [31] Deng G-F, Lin X, Xu X-R, Gao L-L, Xie J-F, Li H-B. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. **J Funct Foods** 2013; 5(1): 260-266.
- [32] Ha TJ, Lee M-H, Jeong YN, Lee JH, Han S-I, Park C-H, Pae S-B, Hwang C-D, Baek I-Y, Park K-Y. Anthocyanins in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp ssp. *unguiculata*]. **Food Sci. Biotechnol** 2010; 19(3): 821-826.
- [33] Ramírez-Cárdenas L, Leonel AJ, Costa NMB. Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. **Ciênc. Tecnol. Aliment** 2008; 28(1): 200-213.
- [34] Nassouru MA, Njintang YN, Noubissié, TJ-B, Nguimbou RM, Bell JM. Genetics of seed flavonoid content and antioxidant activity in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Crop J** 2016; 4(5): 391 – 397.

- [35] Chaieb N, González JL, López-Mesas M, Bouslama M, Valiente M. Polyphenols content and antioxidant capacity of thirteen faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes cultivated in Tunisia. **Food Res Int** 2011; 44(4): 970–977.
- [36] Awika JM, Duodu KG. Bioactive polyphenols and peptides in cowpea (*Vigna unguiculata*) and their health promoting properties: A review. **J Funct Foods** 2017; 38: 686–697.
- [37] Luthria DL, Pastor-Corrales MA. Phenolic acid content of fifteen dry edible beans (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. **J. Food Compos. Anal** 2005; 19(2-3): 205-211.
- [38] Siddhuraju P, Becker K. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) seed extracts. **Food Chem.** 2007; 101(1): 10-19.
- [39] Nayeem N, Asdaq SMB, Salem H, AHEI-Alfgy S. Gallic Acid: A Promising Lead Molecule for Drug Development. **J Appl Pharm Sci** 2016; 8(2): 1-4.
- [40] Kumar N, Pruthi V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. **Biotechnol Rep (Amst)** 2014; 16(4): 86–93.

CAPÍTULO II

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO CIENTÍFICO III

*Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the phenolic compound content and antioxidant activity in cowpea cultivar BRS Xiquexique, submetido à revista *Food Science and Biotechnology*. ISSN: 1226-7708*

**EFFECT OF *IN VITRO* GASTROINTESTINAL DIGESTION ON THE PHENOLIC
COMPOUND CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN BIOFORTIFIED
COWPEA CULTIVAR BRS XIQUEXIQUE**

Nara Vanessa dos Anjos Barros¹

Bruna Barbosa de Abreu²

Marcos Antônio da Mota Araújo³

Maurisrael de Moura Rocha⁴

Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo^{5*}

¹ Graduate Program in Food and Nutrition / Federal University of Piauí. Minister Petrônio Portella University Campus. Block 13. CEP 64049-550. Teresina. Piauí. Brasil.

² Federal University of Piauí. Minister Petrônio Portella University Campus. Block 13. CEP 64049-550. Teresina. Piauí. Brasil.

³ Municipal Health Foundation. Street Governador Artur de Vasconcelos, 3015. Airport. CEP 64002-530. Teresina. Piauí. Brasil.

⁴ Embrapa Meio Norte. Avenue Duque de Caxias, 5650. Buenos Aires neighborhood. CEP 64006-245. Teresina. Piauí. Brasil.

^{5*} Full Professor of the Department of Nutrition / Graduate Program in Food and Nutrition / Federal University of Piauí. Minister Petrônio Portella University Campus. Block 13. CEP 64049-550. Teresina. Piauí. Brasil. Telephone: 55 (86) 3237- Email: regilda@ufpi.edu.br.

Short version of title: Bio-accessibility of phenolic compounds in cowpea.

ABSTRACT

This study was aimed at evaluating the effect of simulated *in vitro* gastrointestinal digestion on the content of phenolic compounds and antioxidant activity in the grains of the biofortified cowpea cultivar BRS Xiquexique, before and after cooking. The content of phenolic compounds, flavonoids, and proanthocyanidins and the antioxidant activity of 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and total ferric reducing antioxidant power (FRAP) was analyzed using spectrophotometry, before and after cooking and in all phases of the digestive process. The phenolic acids were identified and quantified by high performance liquid chromatography. The total phenolic content and antioxidant activity were reduced during cooking, but increased with simulated digestion. The phenolic acids were degraded under gastrointestinal conditions. However, the grains of the cultivar of cowpea BRS Xiquexique retained relevant bioactivity of the compounds and antioxidant activity, which can potentially protect against chronic non-communicable diseases.

Keywords: *Vigna unguiculata*, Thermal processing, *In vitro* digestion, Phenolic Acids, Antioxidant activity

INTRODUCTION

High intake of legumes has been linked to lower incidence of oxidative stress and chronic non-communicable diseases. This protection stems from the presence of compounds with antioxidant activity (AA), especially phenolic compounds, which can prevent oxidative damage and apoptosis by donating electrons to free radicals. Free radicals are unstable molecules, which need to be neutralized to eliminate their harmful effect on the body (Lucas-González et al., 2018; Nderitu et al., 2013).

Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) is a leguminous plant widely cultivated in Asia, Central and South America and Africa. It is a staple food that provides large amounts of proteins, carbohydrates, dietary fiber, vitamin B, essential minerals, small amount of lipids and low levels of anti-nutritional factors (Sombié et al., 2018). These are rich in bioactive compounds such as polyphenols, phenolic acids and flavonoids, which are concentrated in the seed coating (Awika and Duodu, 2017).

The beneficial effects of bioactive compounds to human health depend on the biochemical state in which they reach the bloodstream and the target tissues. Thus, bio-accessibility of the compound refers to the amount of the compound released from the food matrix and solubilized in the aqueous phase (chyme), rendering it available for absorption into the systemic circulation through the intestinal wall (Lucas-González et al., 2018). Due to the technological and ethical limitations in the use of *in vivo* methods for studying these processes, suitable *in vitro* models have been established, which can accurately reproduce the biochemical conditions in the different phases of digestion in the gastrointestinal tract (GT) (Minekus et al., 2014).

Legumes are usually processed prior to consumption, so that they may become palatable, chewable, and digestible. Cooking improves the nutritional value of food by reducing the anti-nutritional factors, and increasing the digestibility of complex carbohydrates and proteins. The phytochemical content in food is influenced by the cooking methods used, which in turn affects the AA (Zhao et al., 2019). Several studies have shown that cooking reduces the content of total phenolic compounds (TPC) and AA in cowpea cultivars (Barros et al., 2017; Cavalcante et al., 2017; Mtolo et al., 2017; Yadav et al., 2018).

In vitro gastrointestinal digestion (GD) impacts the TPC content and AA in cowpea beans, thereby increasing the amount of accessible antioxidant compounds and the absorption of beneficial components of cooked cowpea, at the intestinal level, after digestion (Hachibamba et al., 2013; Mtolo et al., 2017).

There is insufficient literature available regarding the *in vitro* functionality of the phenolic compounds present in cowpea grains. There have not been any studies so far which have evaluated the content of bioactive compounds in the digestive process and their protective effect against free radicals. Several cowpea cultivars have not yet been studied, including BRS Xiquexique, which is a genetically improved cultivar with white skin, in addition to possessing high productivity and high levels of iron and zinc. The present study was aimed at evaluating the effect of simulated GD *in vitro*, on the phenolic compound content and AA in the grains of cowpea cultivar BRS Xiquexique, before and after cooking.

MATERIALS AND METHODS

SAMPLES

The grains of the biofortified cowpea cultivar BRS Xiquexique from two different batches were supplied by the Genetic Resources and Breeding Sector (Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI, Brazil) and kept in the Laboratory of Bromatology and Food Biochemistry (Department of Nutrition/Federal University of Piauí, Teresina-PI, Brazil) at a temperature of 8 °C, until analysis.

The raw cowpea was crushed in a cyclone mill (TE-651/2-TECNAL) until a homogeneous powder was formed (0.5 mesh). Cowpea was cooked in a bean:water ratio of 1:3 (w/v) in a domestic pressure cooker of 2 L capacity for 13 minutes at a temperature of 121 °C (Barros et al., 2017). The cooked grains and the respective cooking broth were macerated, and stored under refrigeration (± 8 °C) until subsequent analysis.

REAGENTS AND STANDARDS

Folin-Ciocalteu reagent, Catechin, 2,20-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), 2,4,6-tripyridyl-S-triazine (TPTZ), acetonitrile, methyl alcohol, enzymes for the bio-accessibility assay, and high-performance liquid chromatography (HPLC) grade standards for phenolic acids (gallic, caffeic, chlorogenic, ellagic, epicatechin, ferulic, p-coumaric, quercetin) were acquired from Sigma (St. Louis, MO, USA). Hydrochloric acid (HCl), sodium carbonate (Na₂CO₃), acetone, potassium chloride (KCl), sodium acetate (CH₃COONa.3H₂O), and vanillin were acquired from Vetec (Rio de Janeiro-

RJ, Brazil). Sodium nitrite (NaNO_2), Sodium hydroxide (NaOH), Aluminum chloride (AlCl_3), Citric acid, and Ferric chloride were acquired from Cromoline (Diadema-SP, Brazil).

SIMULATION OF *IN VITRO* GASTROINTESTINAL DIGESTION (GD)

The simulation of *in vitro* GD of 1.5 g of the samples, diluted in Milli-Q water (1:4, m.v^{-1}) was performed in four stages: oral, gastric, duodenal (Minekus et al., 2014) with simulation of the enzymatic action of the colonic microbiota (Fogliano et al., 2011). The solution was centrifuged for 40 minutes after each step at $2173.5 \times g$, and filtered by a quantitative filter paper. The supernatant was collected and its volume measured before storing at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

PREPARATION OF EXTRACTS FOR ANALYSIS

Cowpea extracts were prepared using methanol (50%), acetone (70%) and Milli-Q water in a 2:2:1 ratio. The fractions of the extracts were analyzed following *in vitro* digestion (Rufino et al., 2010).

ANALYSIS OF BIOACTIVE COMPOUNDS

The TPC concentrations were determined using the Folin-Ciocalteu reagent with absorbance measurement at 765 nm using a spectrophotometer (BEL, Model 1102, Milan, Italy). The results are expressed as milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per 100 g of dry sample. The concentration of TPC was calculated from a standard curve constructed using gallic acid standards (Singleton and Rossi, 1965).

The method described by González-Aguilar et al. (2007) was used to evaluate the concentration of total flavonoids, with absorbance measured at 425 nm. Different concentrations of quercetin (0-100 mg/L) were used to construct a standard curve, and the results are expressed as milligrams of quercetin equivalents (QE) per 100 g of dry sample.

The concentration of proanthocyanidins was measured colorimetrically using the vanillin method (Price et al., 1978), with absorbance measured at 500 nm. Catechin was used as a standard and the results were expressed as milligrams of catechin equivalents (CE) per 100 g of dry sample.

IDENTIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS

Phenolic compounds were identified and quantitated using HPLC (Pereira et al., 2004; Tiberti et al., 2007).

The analysis was performed using a chromatograph model LC20-AD (Shimadzu Corporation, Japan), with a manual injector having a 25 μ l injection loop, a UV-Vis detector (SPD-20a model), and LabSolutions software (v5.57, SP1 Copyright (Shimadzu Corporation)). The separation was performed using a Shim-Pack VP-ODS (150 \times 4.6 mm d.i., particle size of 5 μ m) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) column and a Shimadzu GVP-ODS (10 mm \times 4.6 mm) pre-column.

The mobile phase consisted of methanol with 1% acetic acid (solvent A) and 1% acetic acid (solvent B). The analysis was performed for 50 minutes, using a mobile phase gradient at a flow rate of 0.7 mL/min and an injection volume of 10 μ L.

The compounds were detected at the following wavelengths: 280 nm (gallic acid, epicatechin, and ellagic acid), 320 nm (caffeic, p-coumaric, chlorogenic, and ferulic acids), and 360 nm (quercetin). The standard curve was created using the standards at nine different concentrations (0.014, 0.056, 0.225, 0.450, 7.810, 15.620, 31.250, 62.500, and 120.000 μ g mL⁻¹) in triplicates. The identification of the compounds was based on the retention time (RT) corresponding to that of the standards and quantification of the peak areas using the LabSolutions software.

BIO-ACCESSIBILITY INDEX (BI)

The bioavailability index (BI) was used to evaluate changes in bioactive compounds due to GD and calculated according to the equation $BI (\%) = 100 \times B/C$ (Ortega et al., 2011). B is the phenolic content, flavonoids, proanthocyanidins or antioxidant activity as measured by the ABTS and FRAP assays, and C is the amount of these compounds before digestion, expressed in the same units.

ANTIOXIDANT ACTIVITY

ABTS method

The ABTS free radical capture method was conducted according to Re et al. (1999) and the absorbance measured at 734 nm. A standard curve was constructed using Trolox at different concentrations (0-100 mg/L) as a reference. The results were

expressed as μmol of antioxidant capacity equivalent to Trolox (TEAC) per 100 g of dry sample.

FRAP Method

The FRAP method described by Benzie and Strain (1996) was used and absorbance measured in at 620 nm. A standard curve was constructed using Trolox at different concentrations (0-100 mg/L) as the reference. The results were expressed as μmol of TEAC per 100 g of dry sample.

STATISTICAL ANALYSIS

Data analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences program (SPSS, v7.0). The results were presented as the mean and standard deviation. The Kolmogorov-Smirnov non-parametric normality test was applied for normal distribution, before the analysis. Subsequently, the Student's t-test was used to verify the differences between the average raw and cooked grains and the types of cultivars, while ANOVA, the Tukey multiple comparisons test was used to identify the phenolic compounds with 5% probability ($p \leq 0.05$) and a confidence interval (CI) of 95% (Hilbe and Robinson, 2013).

RESULTS AND DISCUSSION

The content of bioactive compounds was differentiated considering each stage of digestion, except for the colonic phase, in which there was significant reduction ($p \leq 0.05$) in the content of these compounds for both raw and cooked grains (Table 1).

Table 1 –TPC, total flavonoids and proanthocyanidins content before and after *in vitro* GD of the biofortified cowpea cultivar BRS Xiquexique.

Digestion steps	TPC (mg EAG.100 ⁻¹ g)		Total Flavonoids (mg QE.100 ⁻¹ g)		Proanthocyanidins (mg CE.100 ⁻¹ g)	
	Raw grain	Cooked grain	Raw grain	Cooked grain	Raw grain	Cooked grain
Before digestion	229,64 ± 7,29 ^a A	144,38 ± 0,00 ^b A	48,72 ± 1,77 ^a A	18,89 ± 0,64 ^b A	7,83 ± 0,33 ^a A	2,65 ± 0,00 ^b A
Oral	215,70 ± 3,64 ^a B	138,59 ± 2,28 ^b B	31,12 ± 1,27 ^a B	14,98 ± 0,00 ^b B	6,92 ± 0,52 ^a B	2,15 ± 0,00 ^b AB
Gastric	267,52 ± 4,55 ^a C	94,33 ± 5,01 ^b C	134,38 ± 2,73 ^a C	82,23 ± 2,73 ^b C	6,21 ± 0,00 ^a C	4,00 ± 0,00 ^b C
Duodenal	245,07 ± 7,17 ^a D	107,81 ± 5,24 ^b D	70,42 ± 2,2,18 ^a D	63,47 ± 0,00 ^b D	13,10 ± 0,00D	ND
Colonic	38,83 ± 0,00 ^a E	21,23 ± 2,28 ^b E	24,39 ± 1,10 ^a E	20,54 ± 1,09 ^b AE	2,45 ± 0,00 ^a E	2,84 ± 0,00 ^b D
BI (%)						
Oral	93,93	95,99	63,87	79,30	88,38	81,13
Gastric	116,50	65,33	275,82	435,31	79,31	150,94
Duodenal	106,72	74,67	144,54	336,00	167,30	-
Colonic	16,91	14,70	50,06	108,73	31,29	107,17

Results are shown as mean ± standard deviation. TPC: Total phenolic compounds. GD: gastrointestinal digestion. GAE: equivalents in gallic acid. QE: quercetin equivalents. CE: catechin equivalents. BI: bio-accessibility index. Nd: Not detected. The same lowercase superscripted alphabets between the raw and cooked bean types signify no significant difference between the averages according to the Student's t test ($p \leq 0.05$, 95% CI). Same uppercase letters between the phases imply is no significant difference between the averages according to the one way test ANOVA ($p \leq 0.05$, 95% CI).

Cooking promoted reduction in the TPC content before digestion due to the ability of TPC to form complexes with proteins and carbohydrates leading to difficulties in extracting them, or the oxidation of TPC during cooking (Mtolo et al., 2017).

The results of the present study before digestion were similar to that observed by Nderitu et al. (2013), in which the cooking of two cowpea cultivars (Agrinawa and Black-eye varieties) significantly reduced ($p \leq 0.05$) the total flavonoid levels quantified in both assays, by 22% and 40%, respectively. Yadav et al. (2018) also found a decrease in the content of total flavonoids with cooking under pressure in four cowpea cultivars, with a reduction in the range of 39.9% to 47.4%.

There was a significant increase ($p \leq 0.05$) in the content of TPC and total flavonoids from the oral to gastric phase, for the raw grains after GD, indicating that 116.5% and 275.82% of these compounds were bio-accessible in the stomach, respectively. The increase in the polyphenol content in the gastric phase occurs due to the rupture of the plant cell membranes, owing to acidity, enzymes, and the contact time of the substrate with the gastric fluid, which in turn increases the release of compounds into the intestinal lumen (Minekus et al., 2014).

However, there was a significant reduction ($p \leq 0.05$) in the content of TPC in the duodenum. Due to its high sensitivity to alkaline conditions, these may have been degraded or cleaved in the duodenum with the formation of new compounds, or other food components such as minerals, proteins, fibers, or sugars may have formed complexes with the phenolic compounds (Chen et al., 2016), resulting in a decrease in bio-accessibility.

There was a statistically significant reduction in total flavonoids in the gastric phase passage to the duodenal, with a decrease of 47.6% for the raw grains and 22.8% for the cooked grains. Hachibamba et al. (2013) state that some classes of TPC are more susceptible to slightly alkaline conditions in the pancreatic phase of digestion, and can be transformed into unknown or undetected structural forms. These authors reported reduction in flavonoids and hydroxycinnamic acid derivatives in broccoli by 84% and 80%, respectively, after gastric and pancreatic digestion.

However, the digestion conditions rendered TPC and total flavonoids more bio-accessible for absorption into the intestinal barrier and subsequent cellular use. The results of the present study concurred other studies on simulated GD in common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*) (Chen et al., 2015; Perez-Hernandez et al., 2016) and other cowpea cultivars (Hachibamba et al., 2013; Mtolo et al., 2017).

Significant increase ($p \leq 0.05$) in the content of proanthocyanidins up to the duodenal phase was observed, indicating that the enzymes of the GT were more effective than the solvents used in the extraction. The proanthocyanidins are released in small quantities from the food matrix due to its polymeric structure and high molecular weight. Thus, these compounds may pass to the large intestine unchanged, where the microflora of the colon can convert them into phenolic acids to exert their bioactivity (Chen et al., 2015).

In the case of cooked grains, an inverse behavior was observed for the raw grains, with a statistically significant reduction in the TPC content from the oral to the gastric phase, and an increase in the duodenal phase (Table 1). TPC may also have improved stability under pH conditions during digestion due to the protective effect of the food matrix components, such as dietary fibers, which have been reported to improve phenolic stability during *in vitro* duodenal digestion (Ortega et al., 2011).

The TPC contents and AA reduced significantly ($p \leq 0.05$) in the colonic phase, indicating low extraction of the food matrix or reduced metabolization. TPC linked to the cell wall, which are not released after solvent extraction require chemical hydrolysis to dissociate completely. Many colonic bacteria have enzymes that promote the hydrolysis of carbohydrates (pectinases, hemicellulases, and cellulases), releasing phenolics that may play a role during digestion and fermentation in the small and large intestine (Chen et al., 2015).

Thus, the bioactive compounds of cowpea seeds can exert direct protective effects *in situ* in the capture of reactive oxygen species, which are always present in the GT from diet or activation of phagocytes in the intestine. Furthermore, these compounds are antimicrobials and can interact with the local flora, thereby modulating microbial populations in the GT, with effects on the human health (Alminger et al., 2014; Chen et al., 2015).

Five phenolic acids were identified in the raw grain before GD (Table 2), which is in agreement with the study by Moreira-Araújo et al. (2018). There was a reduction in the content of phenolic acids after cooking, consistent with that observed for TPC. This is probably due to the complexation of these compounds with other substances or loss by oxidation at high temperatures.

Table 2 – Phenolic acids before and after *in vitro* GD in the duodenal phase of the biofortified cowpea cultivar BRS Xiquexique.

Grain	Phenolic acids	mg.100g ⁻¹		BI (%)
		Before GD	After GD	
Raw	Gallic	54,55 ± 0,56 ^{aA}	31,04 ± 0,62 ^{bA}	56,90
	Chlorogenic	2,04 ± 0,05 ^B	ND	-
	Caffeic	20,09 ± 0,86 ^{aC}	14,33 ± 0,27 ^{bB}	71,33
	p-coumaric	1,33 ± 0,03 ^{aD}	2,23 ± 0,17 ^{bC}	167,67
	Ferulic	29,87 ± 0,39 ^{aE}	4,28 ± 0,26 ^{bD}	14,33
Cooked	Gallic	41,37 ± 0,84 ^{aA}	26,47 ± 0,99 ^{bA}	63,98
	Chlorogenic	0,31 ± 0,00 ^B	ND	-
	Caffeic	4,22 ± 0,09 ^{aC}	0,61 ± 0,04 ^{bB}	14,45
	p-coumaric	ND	ND	-
	Ferulic	20,23 ± 0,33 ^{aD}	2,43 ± 0,07 ^{bC}	12,01

Results are shown as mean ± standard deviation. GD: gastrointestinal digestion. BI: bio-accessibility index. ND: Not detected. The same lowercase superscripted letters between the bio-accessibility before and after signifies = no significant difference between the averages according to Student's t test ($p \leq 0.05$, 95% CI). Same uppercase letters between the compounds before and after imply no significant difference between the averages according to the one way Test ANOVA (Post Hoc Multiple comparisons, the Tukey test, $p \leq 0.05$, 95% CI).

A decrease in bio-accessibility was observed with GD for most phenolic acids, similar to the observation by Nderitu et al. (2013). In Chen et al. (2016), this reduction may be related to possible structural alterations, oxidation, and/or polymerization of these phenolic compounds stimulated by the alkaline conditions of the duodenal system. However, there was an increase in the content of p-coumaric acid in the raw grain, indicating that the release of this acid was facilitated by digestion due to softening or rupture of the cell wall.

Gallic acid was present in a larger quantity in the raw and cooked extracts before and after GD (Table 2). This acid has shown potential in combating oxidative damage, manifestation of cancer, microbial infestations, neurodegenerative disorders and aging, according to Nayeem et al. (2016). The results of the present study for the raw grains were higher than those obtained by Deng et al. (2013), who found 6.7 ± 0.81 mg/100 g of gallic acid and 0.66 ± 0.05 mg/100 g of chlorogenic acid in commercial cowpea grains in Guangzhou, China.

Ferulic acid was the lowest bio-accessible fraction amongst all the phenolic acids because it is conjugated to the cell wall with other polysaccharides, which are

resistant to gastric digestion. This acid has high AA, in addition to anticancer, hypocholesterolemic and anti-inflammatory effects (Faller et al., 2012).

The lower bio-accessibility of phenolic acids after *in vitro* GD obtained in the present study can be attributed to the existing interactions in the food matrix or to their conversion, which may leave them to be poorly soluble in the GT fluids (Alminger et al., 2014). In addition, it is possible that the enzymatic digestion process may release more TPC, although all of them could not be identified by HPLC. It must be noted that some TPCs were not evaluated in cowpea grain due to the unavailability of analytical standards and hence their absence or presence cannot be conclusively proven.

Before the GD, cooking also significantly reduced ($p \leq 0.05$) the AA, similar to the reduction in the content of bioactive compounds (Table 3). This result was expected from the observed loss in the TPC, total flavonoid, and proanthocyanidin content. The reduction in activity was also consistent with other studies on cowpea grains (Barros et al., 2017; Cavalcante et al., 2017; Yadav et al., 2018).

Table 3 shows that GD promoted an increase in the AA evaluated by both methods, highlighting greater accessibility in the duodenal phase. GD promoted the release of TPC from glycosidic forms to aglycones due to hydrolysis, since the AA of aglycones may be greater than that of glycosides (Hachibamba et al., 2013).

Table 3 – Antioxidant activity before and after *in vitro* GD of the biofortified cowpea cultivar BRS Xiquexique.

Digestion steps	ABTS ($\mu\text{mol.Trolox.}100\text{ g}^{-1}$)		FRAP ($\mu\text{mol.Trolox.}100\text{ g}^{-1}$)	
	Raw grain	Cooked grain	Raw grain	Cooked grain
	Before digestion	665,02 \pm 15,69 ^a A	494,76 \pm 17,81 ^b A	294,62 \pm 6,78 ^a A
Oral	492,34 \pm 1,52 ^a B	205,84 \pm 1,21 ^b B	252,82 \pm 2,81 ^a B	96,54 \pm 0,49 ^b B
Gastric	1183,03 \pm 0,00 ^a C	612,48 \pm 8,48 ^b C	359,06 \pm 0,00 ^a C	277,95 \pm 6,38 ^b C
Duodenal	1854,44 \pm 8,85 ^a D	1841,93 \pm 26,54 ^b D	501,76 \pm 2,00 ^a D	313,05 \pm 2,01 ^b D
Colonic	241,67 \pm 0,00 ^a E	236,99 \pm 0,00 ^b E	126,14 \pm 0,11 ^a E	79,04 \pm 1,38 ^b E
BI (%)				
Oral	74,03	41,60	85,81	70,98
Gastric	177,89	123,79	121,87	70,98
Duodenal	278,86	372,28	170,31	230,17
Colonic	36,34	47,90	42,81	58,11

Results are shown as mean \pm standard deviation. GD: gastrointestinal digestion. BI: bio-accessibility index. The same lowercase superscripted letters between the types of bean cross and cooked imply no significant difference between the averages according to Student's t test ($p \leq 0.05$, 95% CI). Same uppercase letters between the phases imply no significant difference between the averages according to the one way Test ANOVA (Post Hoc Multiple comparisons, the Tukey test) ($p \leq 0.05$, 95% CI).

It is important to highlight that the FRAP assay presented lower values than the ABTS in all evaluated phases. It is possible that changes in pH and enzymatic action can produce new compounds, with AA different from that of the original compounds before digestion. In fact, although the digested extracts have demonstrated a relevant neutralization capability against ABTS radicals, the presence of other non-phenolic compounds such as amino acid and peptides derived from protein hydrolysis, may also interfere with activity. Cowpea contains on average of 22-30% of proteins, in addition to bioactive peptides, which are released after GD and have significant AA (Awika and Duodu, 2012), in addition to presenting polyamines that can also contribute to the high activity (Barros et al., 2017).

It was observed that cooking promoted a reduction in the content of TPC and AA, and *in vitro* GD increased the bio-accessibility of these compounds making them potentially available for absorption. It was also possible to observe differentiated behaviors for the levels of bioactive compounds according to the stage of the digestive process, which were justified by the characteristics of the food matrix, possible interactions between phenolic compounds, but also with amino acids, peptides, proteins and others, as well as enzymes and other constituents of food. Although the phenolic acids suffered degradation under gastrointestinal conditions, the grains of cowpea cultivar BRS Xiquexique maintained compounds with relevant bioactivity and AA, which can potentially protect against chronic non-communicable diseases.

In the conditions used in cooking, a reduction in the content of total phenolic compounds and antioxidant activity of cowpea grains was observed, which increased with simulated GD. This process has made some phenolic compounds less extractable (due to bonding with other food components) or more extractable (by releasing linked forms). Thus, it can be inferred that the products of enzymatic digestion have high bioactivity and can assist in the elimination of reactive oxygen species that cause chronic diseases.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful for grants from the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) and to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) PROCAD/CASADINHO-CNPq-CAPES, Process 552239/2011-9 and Universal Edital CNPq 14/2011, Process 482292/2011-3 and Universal Edital CNPq 01/2016, Process 431314/2016-0.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Alminger M, Aura AM, Bohn T, Dufour C, El SN, Gomes A, Karakaya S, Martínez-Cuesta MC, McDougall GJ, Requena T, Santo CN. *In Vitro* Models for Studying Secondary Plant Metabolite Digestion and Bioaccessibility. **Compr Rev Food Sci Food Saf.** 13: 413-436 (2014)
- Awika JM, Duodu KG. Bioactive polyphenols and peptides in cowpea (*Vigna unguiculata*) and their health promoting properties: A review. **J Funct Foods.** 38: 686–697 (2017)
- Barros NVA, Rocha MM, Glória MBA, Araújo MAM, Moreira-Araújo RSR. Effect of cooking on the bioactive compounds and antioxidant activity in grains cowpea cultivars. **Cienc Agron** 48(5): 824-831 (2017)
- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal Biochem.** 239(1):70-76 (1996)
- Cavalcante RBM, Araújo MAM, Rocha MM, Moreira-Araújo RSR. Effect of thermal processing on chemical compositions, bioactive compounds, and antioxidant activities of cowpea cultivars. **Rev Caatinga.** 30(4): 1050-1058 (2017)
- Chen PX, Dupuis JH, Marcone MF, Pauls PK, Liu R, Liu Q, Tang Y, Zhang B, Tsao R. Physicochemical properties and *in vitro* digestibility of cooked regular and nondarkening cranberry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and their effects on bioaccessibility, phenolic composition, and antioxidant activity. **J. Agric. Food Chem.** 63(48): 10448–10458 (2015)
- Chen GL, Chen S-G, Chen F, Xie Y-Q, Han M-D, Luo C-X, Zhao Y-Y, Gao Y-Q. Nutraceutical potential and antioxidant benefits of selected fruit seeds subjected to an *in vitro* digestion. **J Funct Foods.** 20: 317–331 (2016)
- Deng G-F, Lin X, Xu X-R, Gao L-L, Xie J-F, Li H-B. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. **J Funct Foods.** 5(1): 260-266 (2013)

Faller ALK, Fialho E, Liu RH. Cellular antioxidant activity of feijoada whole meal coupled with an *in vitro* digestion. **J. Agric. Food Chem.** 60(19): 4826-4832 (2012)

Fogliano V, Corollaro ML, Viatglione P, Napolitano A, Ferracane R, Travaglia F, Arlorio M, Costabile A, Klinder A, Gibson G. In vitro bioaccessibility and gut biotransformation of polyphenols present in the water-insoluble cocoa fraction. **Mol Nutr Food Res.** 55: 1-12 (2011)

González-Aguilar, GA, Villegas-Ochoa MA, Martínez-Téllez MA, Gardea AA, Ayala-Zavala JF. Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. **J Food Sci.** 72(3): s197–s202 (2007)

Hachibamba T, Dykes L, Awika J, Minnaar, A, Duodu, KG. Effect of simulated gastrointestinal digestion on phenolic composition and antioxidant capacity of cooked cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties. **Int J Food Sci Technol.** 48(12): 2638–2649 (2013)

Hilbe JM, Robinson AP. **Methods of Statistical Model Estimation.** Chapman & Hall/CRC Press, Boca Raton. 255 p. (2013)

Lucas-González R, Viuda-Martos M, Pérez-Alvarez JA, Fernández-López J. *In vitro* digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. **Food Res. Int.** 107: 423–436 (2018)

Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, Carrière F, Boutrou R, Corredig M, Dupont D, Dufour C, Egger L, Golding M, Karakaya S, Kirkhus B, Le Feunteun S, Lesmes U, Macierzanka A, Mackie A, Marze S, McClements DJ, Ménard O, Recio I, Santos CN, Singh RP, Vegarud GE, Wickham MS, Weitschies W, Brodkorb A. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus. **Food Funct.** 5: 1113-1124 (2014)

Moreira-Araújo RSR, Sampaio GR, Soares RAM, Silva CP, Araújo MAM, Arêas JAG. Identification and quantification of phenolic compounds and antioxidant activity in cowpeas of BRS Xiquexique cultivar. **Rev Caatinga.** 31(1): 209-216 (2018)

Mtolo M, Gerrano A, Mellem J. Effect of simulated gastrointestinal digestion on the phenolic compound content and *in vitro* antioxidant capacity of processed Cowpea (*V. unguiculata*) cultivars. **CYTA J Food.** 15(3): 391–399 (2017)

Nayeem N, Asdaq SMB, Salem H, AHEI-Alfay S. Gallic Acid: A Promising Lead Molecule for Drug Development. **J Appl Pharm Sci.** 8(2): 1-4 (2016)

Nderitu AM, Dykes L, Awika JM, Minnaar A, Duodu KG. Phenolic composition and inhibitory effect against oxidative DNA damage of cooked cowpeas as affected by simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chem.** 141(3): 1763–1771 (2013)

Ortega N, Macià A, Romero MP, Reguant J, Motilva MJ. Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an *in vitro* digestion model. **Food Chem.** 124: 65-71 (2011)

Pereira CA, Yariwake JH, Lanças FM, Wauters JN, Tits M, Angenot L. HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata*

- and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochem Anal.** 15(4): 241-248 (2004)
- Perez Hernandez L, Morgan M, Bosch C, Orfila C. Polyphenol release in Borlotti beans (*Phaseolus vulgaris*) during cooking, soaking, simulated digestion and acid hydrolysis. **Proc Nutr Soc.** 75: E53 (2016)
- Price ML, Scoyoc SV, Butler LG. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **J. Agric. Food Chem.** 26(5): 1214-1218 (1978)
- Re P, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic. Biol. Med.** 26(9): 1231–1237 (1999)
- Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, Mancini Filho J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chem.** 121(4): 996-1002 (2010)
- Sancho RAS, Pavan V, Pastore GM. Effect of *in vitro* digestion on bioactive compounds and antioxidant activity of common bean seed coats. **Food Res. Int.** 76: 74–78 (2015)
- Singleton VI, Rossi J. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid agents. **Am J Enol Vitic.** 16(3): 144-158 (1965)
- Sombié PAED, Compaoré M, Coulibaly AY, Ouédraogo JT, Tignégré JBDLS, Kiendrébéogo M. Antioxidant and Phytochemical Studies of 31 Cowpeas (*Vigna unguiculata* (L. Walp.)) Genotypes from Burkina Faso. **Foods.** 7(143): 1-9 (2018)
- Tiberti LA, Yariwake JH, Ndjoko K, Hostettmann K. Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** 846(1-2): 378-384 (2007)
- Yadav N, Kaur D, Malaviya R, Singh M, Fatima M, Singh L. Effect of thermal and non-thermal processing on antioxidant potential of cowpea seeds. **Int J Food Prop.** 21(1): 437-451 (2018)
- Zhao C, Liu Y, Lai S, Cao H, Guan Y, Cheang WS, Liu B, Zhao K, Miao S, Riviere C, Capanoglu E, Xiao J. Effects of domestic cooking process on the chemical and biological properties of dietary phytochemicals. **Trends Food Sci Technol.** 85: 55–66 (2019)

CAPÍTULO II

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO CIENTÍFICO IV

Bioacessibilidade in vitro no grão cru e cozido de feijão-caupi cultivar BRS Tumucumaque, submetido à revista Ciência Agronômica, ISSN:

0045-6888

**BIOACESSIBILIDADE *IN VITRO* NO GRÃO CRU E COZIDO DE FEIJÃO-CAUPI
BIOFORTIFICADO CULTIVAR BRS TUMUCUMAQUE**

**IN VITRO BIOACCESSIBILITY IN RAW AND COOKED GRAIN BIOFORTIFIED
COWPEA CULTIVAR BRS TUMUCUMAQUE**

RESUMO

Este estudo objetivou avaliar o efeito da bioacessibilidade *in vitro* no grão cru e cozido da cultivar de feijão-caupi BRS Tumucumaque sobre o conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante. A cultivar foi analisada (em triplicata) após obtenção de um pó homogêneo, e após cozimento em panela de pressão por 13 minutos. Foram analisados os conteúdos de compostos fenólicos e flavonoides totais, proantocianidinas e atividade antioxidante pelo método de captura dos radicais livres ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) e FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), por meio da espectrofotometria, antes e após o cozimento e em todas as fases do processo digestivo. Pesquisaram-se oito ácidos fenólicos, e a identificação e quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O conteúdo de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante foram reduzidos durante o cozimento, mas aumentaram com a digestão simulada *in vitro*, devido à liberação de formas ligadas. Nos grãos crus foram identificados quatro ácidos fenólicos após a digestão *in vitro* (ácidos gálico, cafeico, p-cumárico e ferúlico), enquanto que nos grãos cozidos três foram identificados (ácidos gálico, cafeico e ferúlico). Os ácidos fenólicos sofreram degradação sob condições gastrointestinais, entretanto, os grãos da cultivar de feijão-caupi BRS Tumucumaque mantiveram compostos com relevante bioatividade (grão cru – ácidos gálico, cafeico e p-cumárico; grão cozido – ácidos gálico e cafeico) e atividade antioxidante, que podem auxiliar na proteção contra doenças crônicas não transmissíveis, demonstrando que feijão-caupi é um alimento fonte de antioxidantes naturais bioacessíveis.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*. Processamento térmico. Digestão *in vitro*. Fenólicos. Atividade antioxidante.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of *in vitro* bioaccessibility on the raw and cooked grain of BRS Tumucumaque cowpea on the content of phenolic compounds and antioxidant activity. The cultivar was analyzed (in triplicate) after obtaining a homogeneous powder, and after cooking in a pressure cooker for 13 minutes. The contents of phenolic compounds and total flavonoids, proanthocyanidins and antioxidant activity by the ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) were analyzed, by means of spectrophotometry, before and after cooking and at all stages of the digestive process. Eight phenolic acids were investigated, and the identification and quantification was performed by high performance liquid chromatography (HPLC). The content of total phenolic compounds and antioxidant activity were reduced during cooking, but increased with simulated digestion *in vitro*, due to the release of bound forms. In the raw grains four phenolic acids were identified after *in vitro* digestion (gallic, caffeic, *p*-coumaric and ferulic acids), whereas in the cooked grains three were identified (gallic, caffeic and ferulic acids). The phenolic acids underwent degradation under gastrointestinal conditions; however, the BRS Tumucumaque cowpea grains maintained compounds with significant bioactivity (raw grain - gallic, caffeic and *p*-coumaric acids, cooked grain - gallic and caffeic acids) and antioxidant activity, which may assist in protection against chronic noncommunicable diseases, demonstrating that cowpea is a food source of natural bioaccessible antioxidants.

Key words: *Vigna unguiculata*. Thermal processing. Digestion *in vitro*. Phenolics. Antioxidant activity.

INTRODUÇÃO

O feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp.) é uma leguminosa comumente consumida em muitos domicílios de países com baixa a média renda. É uma cultura resistente adaptada às condições de seca, bastante nutritiva, com conteúdo elevado de proteínas, carboidratos, fibras alimentares, vitaminas do complexo B, minerais essenciais, além de baixos teores de lipídios e fatores antinutricionais. Os grãos de feijão-caupi também contêm compostos bioativos dos quais destacam-se os compostos fenólicos, que estão concentrados no revestimento da semente e têm o potencial de proteger o organismo contra doenças crônicas não transmissíveis (HACHIBAMBA et al., 2013; SOMBIÉ et al., 2018).

Essa potencial ação protetora das leguminosas é justificada porque os compostos fenólicos presentes podem eliminar os radicais livres, protegendo as biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA de danos relacionados ao estresse oxidativo (NDERITU et al., 2013). Os principais compostos fenólicos presentes nos grãos de feijão-caupi são os ácidos fenólicos e flavonoides, que desempenham um papel importante na proteção das plantas (SOMBIÉ et al., 2018).

Antes do seu consumo, os grãos de feijão-caupi precisam sofrer algum tipo de processamento para que se tornem palatáveis e de fácil digestão. O feijão-caupi pode ser consumido na forma de farinha, adicionado a diversos tipos de produtos alimentícios, como massas, pães, biscoitos, além de sua possível utilização em alimentos já disponíveis no mercado. A cocção dos grãos melhora o valor nutritivo das leguminosas pela redução de fatores antinutricionais e aumento da digestibilidade de carboidratos complexos e proteínas (YADAV et al., 2018). Contudo, os métodos de processamento demonstraram afetar tanto a qualidade quanto a quantidade dos compostos bioativos disponíveis. Em estudos anteriores, a cocção em panela de pressão reduziu o teor de compostos bioativos e a atividade antioxidante em grãos de cultivares brasileiros de feijão-caupi (BARROS et al., 2017; CAVALCANTE et al., 2017).

Para que os compostos bioativos exerçam os benefícios esperados à saúde humana, deve ser levado em consideração o estado bioquímico em que esses chegam à corrente sanguínea e atingem tecidos alvos. Segundo Lucas-González et al. (2018), a bioacessibilidade dos nutrientes representa a quantidade de um composto liberado da matriz alimentar e solubilizado na fase aquosa (quimo), que está disponível para absorção na circulação sistemática por meio da parede do intestino. Os modelos de digestão gastrointestinal (DG) *in vitro* são vistos como uma alternativa interessante aos modelos *in vivo*, pois podem reproduzir, com precisão, as condições bioquímicas de diferentes fases envolvidas no processo de digestão.

Estudos que avaliem a bioacessibilidade de compostos bioativos em grãos de feijão-caupi são escassos. Observou-se que a DG *in vitro* afetou de forma positiva o conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante nos grãos de feijão-caupi, com um aumento da quantidade de compostos antioxidantes acessíveis para a absorção de componentes benéficos dos grãos de feijão-caupi cozido no nível intestinal (HACHIBAMBA et al., 2013; MTOLO; GERRANO; MELLEM, 2017).

De uma maneira geral, o destino dos compostos fenólicos presentes na dieta durante o processamento térmico e a digestão gastrointestinal, e sua potencial bioacessibilidade, são importantes determinantes dos benefícios à saúde que estes alimentos podem oferecer. Assim, objetivou-se avaliar a bioacessibilidade *in vitro* no grão cru e cozido da cultivar de feijão-caupi BRS Tumucumaque sobre o conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

MATERIAIS E MÉTODOS

AMOSTRAS

Os grãos da cultivar BRS Tumucumaque biofortificada de feijão-caupi de dois lotes foram fornecidos pelo Setor de Recursos Genéticos e Melhoramento (Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI, Brasil) e mantidos no Laboratório de Bromatologia e Bioquímica de Alimentos (Departamento de Nutrição/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal do Piauí)

O feijão-caupi cru foi triturado em moinho de rotor tipo ciclone (modelo 651/2) até obtenção de um pó homogêneo (0,5 *mesh*). O cozimento do feijão-caupi foi realizado na proporção feijão:água de 1:3 (p/v) em panela de pressão doméstica de 2 L, durante 13 minutos, a temperatura de 121 °C (BARROS et al., 2017). Os grãos cozidos e caldo de cocção foram macerados e armazenados sob refrigeração (± 8 °C) até as análises subsequentes.

SIMULAÇÃO DA DIGESTÃO GASTROINTESTINAL *IN VITRO*

A simulação da digestão *in vitro* de 1,5 g das amostras, diluída em água ultrapura (1:4, m.v⁻¹), foi realizada em quatro etapas: oral, gástrica, duodenal (MINEKUS et al., 2014) e simulação da ação enzimática da microbiota colônica (FOGLIANO et al., 2011). Após cada etapa, a solução foi centrifugada (Eppendorf Centrifuge 5702) a 3600 rpm (2173,5 g), por 40 minutos, e filtrada em papel filtro quantitativo. O sobrenadante foi coletado, o volume aferido e armazenado a - 20 °C. Para todas as etapas da digestão foi preparado branco, para evitar a superestimação na quantificação dos compostos bioativos analisados.

COMPOSTOS BIOATIVOS

Elaboração dos extratos

Inicialmente, foram preparados extratos das amostras de feijão-caupi, segundo metodologia de Rufino et al, (2010), utilizando a mistura dos solventes: metanol (50%),

acetona (70%) e água ultra pura (2:2:1). Após a digestão *in vitro*, as frações dos extratos foram analisadas diretamente.

Análises dos compostos bioativos

Os compostos fenólicos totais nos extratos foram determinados por espectrofotometria utilizando o reagente de *Folin-Ciocalteu* e as leituras das absorbâncias das amostras foram realizadas a 765 nm em espectrofotômetro (modelo 1102). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de amostra. A concentração de compostos fenólicos totais foi avaliada pela interpolação da absorbância utilizando uma curva padrão de ácido gálico previamente construída (SINGLETON; ROSSI, 1965).

O método descrito por González-Aguilar et al. (2007) foi utilizado para avaliar os flavonoides totais e a absorbância foi então medida a 425 nm em um espectrofotômetro (modelo 1102). Diferentes concentrações de quercetina (0-100 mg / L) foram usadas para construir uma curva padrão, e os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de quercetina (EQ) / 100 g de amostra.

Os níveis de proantocianidinas foram avaliados colorimetricamente utilizando o método da vanilina (PRICE et al., 1978), e as leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (modelo 1102) a 500 nm. A catequina foi utilizada como padrão e os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de catequina (EC) / 100 g de amostra.

Identificação dos Compostos Fenólicos

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com o método de Pereira et al. (2004) e Tiberti et al. (2007).

Os padrões ácidos fenólicos utilizados foram: gálico, cafeico, clorogênico, elágico, epicatequina, ferúlico, p-cúmarico e quercetina, solubilizados em metanol puro. As fases móveis utilizadas foram filtradas através de membranas HAWP e HVWP de solventes aquosos e orgânicos, respectivamente (0,45 µm tamanho de poro), com o auxílio de uma bomba à vácuo. Antes das injeções das amostras no cromatógrafo, estas foram filtradas em filtros para seringa com 0.45 µm de poro e 33 mm de diâmetro.

Os compostos fenólicos foram analisados usando um cromatógrafo líquido de alta performance LC-20 AT. A separação foi realizada usando uma pré-coluna GVP-

ODS (10 mm × 4,6 mm) acoplada com uma coluna VP-ODS (150 × 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm) equipado com um detector UV-Vis SPD-20A. A taxa de fluxo foi mantida a 0,7 mL/min⁻¹ e a temperatura da coluna foi mantida a 40 ° C, com um volume de injeção de 10 µL. O gradiente da fase móvel foi composto de (A) metanol com 1% de ácido acético e (B) 1% de ácido acético: de 0 a 1 min, 10% de A; 1-5 min 15% A; 5-10 min, 20% A; 10-15 min, 25% de A; 15-25 min, 30% A; 25-30 min, 70% de A; 30-40 min, 80% A; 40-50 min, 10% A. O tempo total da corrida foi de 50 min. Os compostos foram detectados a λ 280 (ácido gálico, epicatequina e ácido elágico), λ 320 (ácidos cafeico, p-cumárico, clorogênico e ferúlico) e λ 360 nm (quercetina). Os picos foram identificados por comparação com o tempo de retenção dos padrões, e a quantificação dos compostos foi baseada nas áreas dos respectivos picos detectados utilizando o software de aquisição LabSolutions versão 5.57 SP1. A calibração da coluna foi realizada injetando os padrões em triplicado em nove concentrações diferentes (0,014; 0,056; 0,225; 0,45; 7,81; 15,62; 31,25; 62,5 e 120,0 µg · mL⁻¹). Os teores de compostos fenólicos foram calculados em mg/100 gramas.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Método ABTS

O ensaio com o radical ABTS• foi conduzido segundo Re et al. (1999). A absorbância foi medida num espectrofotômetro (modelo 1102) a 734 nm. Uma curva padrão foi construída usando Trolox em diferentes concentrações (0-100 mg / L) como referência, e os resultados expressos como µmol de atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) por 100 g de amostra.

Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Potential)

Utilizou-se o método descrito por Benzie e Strain (1996), com a absorbância foi medida em um espectrofotômetro (modelo 1102) a 620 nm. Uma curva padrão foi construída usando Trolox em diferentes concentrações (0-100 mg / L) como referência. As médias calculadas de acordo com a curva de calibração, e os resultados expressos em µmol TEAC em 100 g de amostra.

ÍNDICE DE BIOACESSIBILIDADE (IB)

Para avaliar as alterações nos compostos bioativos, ao longo da digestão gastrointestinal *in vitro*, os índices de bioacessibilidade (IB) foram calculados de

acordo com a Equação: $IB (\%) = 100 \cdot B/C$ (ORTEGA et al., 2011). Onde B é o teor de fenólicos, flavonoides, proantocianidinas ou atividade antioxidante pelos ensaios ABTS e FRAP, quantificados no sobrenadante após processo de digestão, e C, a quantidade desses compostos antes da digestão, expressa nas mesmas unidades.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada por meio do Programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, versão 17.0). Os resultados foram apresentados com média e desvio padrão. Antes de iniciar a análise estatística, foi aplicado o teste de normalidade não paramétrico de *Kolmogorov-Smirnov* para distribuição normal. Posteriormente, foi utilizado o teste t de *Student* para verificar as diferenças entre as médias de grãos crus e cozidos e os tipos de cultivares, enquanto através da ANOVA utilizou-se o teste de múltiplas comparações de *Tukey* para a identificação dos compostos fenólicos com 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$) e intervalo de confiança (IC) de 95% (HILBE e ROBINSON, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos da digestão gastrointestinal simulada sobre a liberação dos compostos fenólicos e flavonoides totais dos grãos crus e cozidos da cultivar em estudo estão demonstrados na Tabela 1. O conteúdo de compostos bioativos foi diferenciado considerando cada etapa da digestão gastrointestinal, com exceção da fase colônica, na qual houve redução significativa ($p \leq 0,05$) no teor destes compostos para ambos os grãos cru e cozido.

De acordo com a Tabela 1, antes da digestão, o cozimento aplicado promoveu uma redução no teor de compostos fenólicos totais. Barros et al. (2017) demonstraram que a redução dos compostos fenólicos totais com o cozimento deve-se a capacidade destes em formar complexos com proteínas e carboidratos, o que dificulta a sua extração, ou então pode ter ocorrido a oxidação destes no cozimento.

Os resultados do presente estudo antes da digestão foram similares ao verificado por Yadav et al. (2018), que também verificaram uma diminuição no teor de fenólicos totais (3,4% a 73,7%) e flavonoides totais (39,9% a 47,4%) com o cozimento sob pressão, durante 90 minutos, em quatro cultivares de feijão-caupi.

Tabela 1 – Teor de compostos fenólicos e flavonoides totais antes e após a digestão gastrointestinal *in vitro*, em grãos crus e cozidos da cultivar de feijão-caupi biofortificada BRS Tumucumaque.

Etapas da digestão	Fenólicos totais (mg EAG.100 ⁻¹ g)		Flavonoides totais (mg EQ.100 ⁻¹ g)	
	Grão cru	Grão cozido	Grão cru	Grão cozido
Antes da digestão	297,23 ± 4,24 ^a A	167,15 ± 6,94 ^b A	59,36 ± 2,03 ^a A	43,97 ± 0,67 ^b A
Oral	281,80 ± 2,27 ^a B	154,68 ± 0,00 ^b B	50,36 ± 1,37 ^a B	39,18 ± 0,00 ^b B
Gástrica	277,18 ± 4,55 ^a C	88,86 ± 2,19 ^b C	140,17 ± 2,72 ^a C	84,16 ± 0,00 ^b C
Duodenal	312,24 ± 0,00 ^a D	93,00 ± 5,23 ^b D	83,62 ± 2,59 ^a D	50,15 ± 0,00 ^b D
Colônica	32,39 ± 2,27 ^a E	16,30 ± 2,27 ^b E	26,58 ± 0,00 ^a E	21,30 ± 0,00 ^b E
IB (%)				
Oral	94,8	92,5	84,8	89,1
Gástrica	93,2	53,2	236,1	191,4
Duodenal	105,0	55,6	140,9	114,0
Colônica	10,9	9,7	44,8	48,4

Legenda: Resultados expressos como média ± desvio-padrão. IB: Índice de Bioacessibilidade. EAG: Equivalentes em Ácido Gálico. EQ: Equivalentes de Quercetina. Letras subscritas minúsculas iguais entre os tipos de feijão cru e cozido, não há diferença significativa entre as médias segundo teste t de Student, ao nível de 5% $p \leq 0,05$, IC 95%. Letras maiúsculas iguais entre as fases, não há diferença significativa entre as médias segundo o teste do one way ANOVA: post Hoc multiple comparisons, utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5% $p \leq 0,05$, IC 95%.

Considerando o índice de bioacessibilidade (IB), as condições empregadas na digestão gastrointestinal simulada tornaram os compostos fenólicos e flavonoides totais mais acessíveis para a absorção na barreira intestinal e posterior utilização celular. O resultado do presente estudo foi condizente com o verificado por outros pesquisadores (CHEN et al., 2015; PEREZ-HERNANDEZ et al., 2016) ao simular a digestão gastrointestinal *in vitro* em cultivares de feijão comum e em outras cultivares de feijão-caupi (HACHIBAMBA et al., 2013; MTOLO; GERRANO; MELLEM, 2017). Entretanto, este estudo diferiu do de Faller; Fialho e Liu (2012), na avaliação da feijoada, um prato típico do Brasil que combina diferentes espécies de grãos e leguminosas, no qual não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) no conteúdo de fenólicos e flavonoides totais, após a simulação da digestão.

Para os grãos cozidos, após a digestão, observou-se uma redução significativa ($p \leq 0,05$) no teor de compostos fenólicos totais da fase oral para gástrica, indicando que somente 53,2% desses compostos foram bioacessíveis no estômago. Os

flavonoides totais obtiveram maior bioacessibilidade, no entanto, houve uma redução estatisticamente significativa na passagem da fase gástrica para a duodenal destes compostos. Esse mesmo comportamento foi descrito por Hachibamba et al. (2013), que pode ser justificado porque algumas classes de compostos fenólicos são mais suscetíveis às condições levemente alcalinas na fase pancreática da digestão, e podem ser transformados em formas estruturais desconhecidas ou não detectadas. Estes autores relataram reduções de flavonoides e derivados do ácido hidroxicinâmico em brócolis em 84% e 80%, respectivamente, após digestão gástrica e pancreática.

Em relação às proantocianidinas, observou-se um aumento significativo ($p \leq 0,05$) no teor destes compostos até a fase duodenal para o grão cru (Tabela 2), indicando que as enzimas do trato gastrointestinal foram mais eficazes do que os solventes utilizados na sua extração. Chen et al. (2015) demonstraram que alguns polifenóis, como as proantocianidinas, são pouco liberados da matriz alimentar devido a sua estrutura polimérica e de alto peso molecular. Assim, estes compostos podem passar inalterados para o intestino grosso, onde a microflora do cólon pode convertê-los em ácidos fenólicos para exercer sua bioatividade, o que foi verificado para o grão cozido na fase colônica.

Tabela 2 – Teor de proantocianidinas antes e após a digestão gastrointestinal *in vitro* considerando cada fase, em grãos crus e cozidos da cultivar de feijão-caupi biofortificada BRS Tumucumaque.

Etapas da digestão	Proantocianidinas (mg EC.100 ⁻¹ g)	
	Grão cru	Grão cozido
Antes da digestão	12,80 ± 0,67 ^a A	2,35 ± 0,00 ^b A
Oral	12,37 ± 0,6 ^a A	2,39 ± 0,00 ^b A
Gástrica	11,95 ± 0,33 ^a A	3,46 ± 0,11 ^b B
Duodenal	16,55 ± 0,00 ^a B	0,63 ± 0,24 ^b C
Colônica	2,58 ± 0,00 ^a C	3,07 ± 0,16 ^a BD
IB (%)		
Oral	96,6	101,7
Gástrica	93,4	147,2
Duodenal	129,3	26,8
Colônica	20,2	130,6

Legenda: Resultados expressos como média ± desvio-padrão. IB: Índice de Bioacessibilidade. EC: Equivalentes em Catequina. Letras subscritas minúsculas iguais entre os tipos de feijão cru e cozido, não há diferença significativa entre as médias segundo teste t de Student, ao nível de 5% $p \leq 0,05$, IC 95%. Letras maiúsculas iguais entre as fases, não há diferença significativa entre as médias segundo

o teste do one way ANOVA: post Hoc multiple comparisons, utilizou-se o teste de *Tukey* ao nível de 5% $p \leq 0,05$, IC 95%.

Os teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante reduziram significativamente ($p \leq 0,05$) na fase colônica, indicando baixa extração da matriz alimentar ou reduzida metabolização. Chen et al. (2015) mostraram que compostos fenólicos ligados a parede celular que não são libertados após a extração química com solvente requerem hidrólise química para dissociar-se completamente. Muitas bactérias colônicas possuem enzimas que promovem a hidrólise de carboidratos (pectinases, hemicelulases e celulasas), liberando compostos fenólicos que poderão desempenhar um papel durante a digestão e fermentação no intestino delgado e grosso.

Assim, os compostos bioativos das sementes de feijão-caupi podem exercer efeitos protetores diretos *in situ* na captura de espécies reativas de oxigênio, pois o trato gastrointestinal é constantemente exposto a espécies reativas de oxigênio, tanto a partir da dieta quanto da ativação de fagócitos no intestino, bem como efeitos benéficos sistêmicos, conforme relatado por Sancho; Pavan e Pastore (2015).

A Tabela 3 mostra os teores de compostos fenólicos identificados nos grãos da cultivar, antes e depois da digestão. Antes da digestão, foram identificados cinco ácidos fenólicos no grão cru, o que está de acordo com Moreira-Araújo et al. (2017), que também identificaram os ácidos gálico (45,4 mg/100g), clorogênico (2,39 mg/100g) cafeico (27,8 mg/100g) e ferúlico (11,1 mg/100g), além de catequina (5,57 mg/100g) e epicatequina (8,67 mg/100g) nos grãos da mesma cultivar. Os teores diferenciados de ácidos fenólicos devem-se provavelmente por causa das diferentes safras de colheita do feijão. Após o cozimento, houve uma redução no teor dos ácidos fenólicos, que foi condizente ao observado para o conteúdo de compostos fenólicos totais.

Com a digestão, observou-se uma queda na bioacessibilidade para a maioria dos ácidos fenólicos identificados, o que foi semelhante ao verificado por Nderitu et al. (2013). Para Chen et al. (2016), esta redução pode estar relacionada a possíveis alterações estruturais, oxidação e/ ou polimerização destes compostos fenólicos estimulados pelas condições alcalinas do sistema duodenal. Entretanto, houve um aumento no teor do ácido p-cumárico no grão cru, indicando que a liberação desse ácido foi facilitada com a digestão devido ao amolecimento ou a ruptura da parede celular.

Tabela 3 - Compostos fenólicos identificados antes e após a digestão gastrointestinal *in vitro* na fase duodenal, em grãos crus e cozidos da cultivar de feijão-caupi biofortificada BRS Tumucumaque.

Grãos	Compostos	mg.100g ⁻¹		IB (%)
		Antes da digestão <i>in vitro</i>	Depois da digestão <i>in vitro</i>	
Cru	Gálico	55,02 ± 0,17 ^a A	34,00 ± 1,33 ^b A	61,8
	Clorogênico	1,28 ± 0,01 ^B	-	-
	Cafeico	25,34 ± 0,35 ^a C	18,40 ± 0,40 ^b B	72,6
	p-cumárico	1,86 ± 0,04 ^a BD	2,45 ± 0,07 ^b C	131,7
	Ferúlico	18,70 ± 0,71 ^a E	4,35 ± 0,47 ^b D	23,3
Cozido	Gálico	45,10 ± 0,42 ^a A	22,83 ± 0,61 ^b A	50,6
	Clorogênico	-	-	-
	Cafeico	16,28 ± 0,27 ^a B	9,31 ± 0,29 ^b B	57,2
	p-cumárico	-	-	-
	Ferúlico	10,90 ± 0,03 ^a C	2,35 ± 0,23 ^b C	21,6

Legenda: Resultados expressos como média ± desvio-padrão. IB: Índice de bioacessibilidade. Letras subscritas minúsculas iguais entre a bioacessibilidade antes e depois, não há diferença significativa entre as médias segundo teste t de *Student*, ao nível de 5% $p \leq 0,05$, IC 95%. Letras maiúsculas iguais entre os compostos antes e depois, não há diferença significativa entre as médias segundo o teste do one way ANOVA: post Hoc multiple comparisons, utilizou-se o teste de *Tukey* ao nível de 5% $p \leq 0,05$, IC 95%.

O ácido gálico estava presente em maior quantidade nos extratos crus e cozidos, antes e após a digestão simulada (Tabela 3). Este ácido têm mostrado potencial para combater danos oxidativos, manifestações de câncer e infestações microbianas, distúrbios neurodegenerativos e envelhecimento, conforme Nayeem et al. (2016). O ácido cafeico apresenta elevada atividade sequestradora de radicais livres, inibe a peroxidação lipídica e protege contra a oxidação da LDL (KHAN; MAALIK; MURTAZA, 2016). O ácido ferúlico foi o que apresentou menor fração bioacessível, porque este ácido encontra-se conjugado à parede celular com outros polissacarídeos, sendo bastante resistente à digestão gástrica. Este ácido possui ampla variedade de atividades biológicas como antioxidante, além de efeito anticancerígeno, hipocolesterolêmico e atividade anti-inflamatória (FALLER; FIALHO; LIU, 2012).

A menor bioacessibilidade dos ácidos fenólicos após a digestão *in vitro* obtida no presente estudo pode ser atribuída às interações existentes na matriz alimentar ou então à forma em que estes foram convertidos, que pode deixá-los pouco solúveis nos fluidos gastrointestinais (ALMINGER et al., 2014). Além disso, é possível que o

processo de digestão enzimática possa liberar mais compostos fenólicos, além dos pesquisados neste estudo.

A influência da digestão gastrointestinal *in vitro* no grão cru e cozido da cultivar BRS Tumucumaque na atividade de captura do radical ABTS, bem como na redução do íon férrico (Fe^{3+}) em ferroso (Fe^{2+}) pelo ensaio FRAP estão demonstrados na Tabela 4.

Antes da digestão, de forma similar ao obtido para o conteúdo de compostos bioativos, o processamento térmico aplicado reduziu de forma significativa ($p \leq 0,05$) a atividade antioxidante. Esse resultado já era esperado, tendo em vista que ocorreu uma perda nos teores de compostos bioativos. A redução na atividade antioxidante também foi condizente com outras pesquisas com os grãos de feijão-caupi, como no estudo de Barros et al. (2017), Cavalcante et al. (2017) e Yadav et al. (2018).

Tabela 4 – Atividade antioxidante pelo método ABTS e FRAP antes e após a digestão gastrointestinal *in vitro* considerando cada fase, em grãos crus e cozidos da cultivar de feijão-caupi biofortificada BRS Tumucumaque.

Etapas da digestão	ABTS ($\mu\text{mol.Trolox.}100\text{g}^{-1}$)		FRAP ($\mu\text{mol.Trolox.}100\text{g}^{-1}$)	
	Grão cru	Grão cozido	Grão cru	Grão cozido
Antes da digestão	837,73 \pm 15,40 ^{aA}	528,92 \pm 17,84 ^{bA}	453,11 \pm 6,79 ^{aA}	274,86 \pm 2,61 ^{bA}
Oral	436,30 \pm 0,00 ^{aB}	300,18 \pm 0,00 ^{bB}	346,79 \pm 3,57 ^{aB}	169,41 \pm 0,00 ^{bB}
Gástrica	1164,53 \pm 26,16 ^{aC}	584,70 \pm 0,00 ^{bC}	553,54 \pm 0,00 ^{aC}	308,28 \pm 0,54 ^{bC}
Duodenal	1654,28 \pm 26,54 ^{aD}	703,30 \pm 2,65 ^{bD}	701,78 \pm 2,22 ^{aD}	515,10 \pm 2,76 ^{bD}
Colônica	227,98 \pm 0,00 ^{aE}	200,70 \pm 0,00 ^{bE}	160,19 \pm 2,13 ^{aE}	114,68 \pm 0,00 ^{bE}
IB (%)				
Oral	52,1	56,8	76,5	61,6
Gástrica	139,0	110,5	122,2	112,2
Duodenal	197,5	133,0	154,9	187,4
Colônica	27,2	37,9	35,4	41,7

Legenda: Resultados expressos como média \pm desvio-padrão. 1. Letras subscritas minúsculas iguais entre os tipos de feijão cru e cozido, não há diferença significativa entre as médias segundo teste t de Student, ao nível de 5% $p \leq 0,05$, IC 95%. 2. Letras maiúsculas iguais entre as fases, não há diferença significativa entre as médias segundo o teste do one way ANOVA: post Hoc multiple comparisons, utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5% $p \leq 0,05$, IC95%.

Considerando a Tabela 4, observou-se que a digestão gastrointestinal *in vitro* promoveu um aumento da atividade antioxidante avaliada pelos dois métodos, com destaque para maior acessibilidade dos compostos na fase duodenal. Hachibamba et al. (2013) justificaram que a digestão simulada promoveu a liberação de compostos

fenólicos das formas glicosídicas para agliconas devido à hidrólise durante o processo de digestão e sugeriram que a atividade antioxidante das agliconas pode ser maior que a dos glicosídeos.

É importante destacar que o ensaio FRAP apresentou teores menores do que o ABTS em todas as fases avaliadas. É possível sugerir que as mudanças de pH e ação enzimática podem produzir novos compostos químicos, com maior ou menor atividade antioxidante em relação aos compostos originais antes da digestão. De fato, embora os extratos digeridos tenham demonstrado capacidade de neutralização relevante contra os radicais ABTS, a presença de outros compostos não-fenólicos, como peptídeos derivados da hidrólise de proteínas, além de poliaminas, podem contribuir para a atividade antioxidante elevada (BARROS et al., 2017).

Observou-se que o cozimento promoveu uma redução no teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, e a digestão gastrointestinal *in vitro* aumentou a bioacessibilidade destes compostos tornando-os potencialmente disponíveis para absorção. Foi possível ainda observar comportamentos diferenciados para os teores de compostos bioativos de acordo com a etapa do processo digestivo, que foram justificados pelas características próprias da matriz alimentar, possíveis interações entre compostos fenólicos, mas também com aminoácidos, peptídeos, proteínas e outros, bem como enzimas e demais constituintes do alimento. Apesar dos ácidos fenólicos terem sofrido degradação sob condições gastrointestinais, os grãos da cultivar de feijão-caupi BRS Tumucumaque mantiveram compostos com relevante bioatividade e atividade antioxidante, que podem potencialmente proteger contra doenças crônicas não transmissíveis.

CONCLUSÃO

Nas condições utilizadas no processamento térmico, houve uma redução no conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos grãos de feijão-caupi, porém, houve um aumento com a digestão gastrointestinal *in vitro*. Esse processo tornou alguns compostos fenólicos menos extraíveis, por causa da ligação com outros componentes dos alimentos, ou mais extraíveis, devido à liberação de formas ligadas. Assim, observou-se que os produtos da digestão enzimática apresentaram elevada bioatividade e podem auxiliar na eliminação de espécies reativas de oxigênio que causam doenças crônicas não transmissíveis.

AGRADECIMENTOS

Os autores desejam agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento concedido por meio do processo PROCAD / CASADINHO - CNPq - CAPES, 552239 / 2011-9, Edital Universal CNPq 14/2011, Processo 482292 / 2011-3 e Edital Universal CNPq 01/2016, Processo 431314 / 2016-0.

REFERÊNCIAS

- ALMINGER, M. *et al.* *In Vitro* Models for Studying Secondary Plant Metabolite Digestion and Bioaccessibility. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 413-436, 2014.
- BARROS, N. V. A. *et al.* Effect of cooking on the bioactive compounds and antioxidant activity in grains cowpea cultivars. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 5, p. 824-831, 2017.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.
- CAVALCANTE, R. B. M. *et al.* Effect of thermal processing on chemical compositions, bioactive compounds, and antioxidant activities of cowpea cultivars. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 4, p. 1050 – 1058, 2017.
- CHEN, P. X. *et al.* Physicochemical properties and *in vitro* digestibility of cooked regular and nondarkening cranberry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and their effects on bioaccessibility, phenolic composition, and antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 48, p. 10448–10458, 2015.
- CHEN G. L. *et al.* Nutraceutical potential and antioxidant benefits of selected fruit seeds subjected to an *in vitro* digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 317–331, 2016.
- FALLER, A. L. K.; FIALHO, E.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity of feijoada whole meal coupled with an *in vitro* digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 19, p. 4826-4832, 2012.

- FOGLIANO, V. *et al.* *In vitro* bioaccessibility and gut biotransformation of polyphenols present in the water-insoluble cocoa fraction. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 55, p. 1-12, 2011.
- GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. *et al.* Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 3, p. s197–s202, 2007.
- HACHIBAMBA T. *et al.* Effect of simulated gastrointestinal digestion on phenolic composition and antioxidant capacity of cooked cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties. **International Journal of Food Science Technology**, v. 48, n. 12, p. 2638–2649, 2013.
- HILBE, J.; ROBINSON, A. P. **Methods of Statistical Model Estimation**. Boca Raton, FL: Chapman & Hall/CRC Press, 2013. 255 p.
- KHAN, F. A.; MAALIK, A.; MURTAZA, G. Inhibitory mechanism against oxidative stress of caffeic acid. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n. 4, p. 695-702, 2016.
- LUCAS-GONZÁLEZ, R. *et al.* *In vitro* digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. **Food Research International**, v. 107, p. 423–436, 2018.
- MINEKUS M., *et al.* A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus. **Food & Function**, v. 5, p. 1113-1124, 2014.
- MOREIRA-ARAUJO, R. S. R. *et al.* Identification and quantification of antioxidant compounds in cowpea. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 5 (Especial), p. 799-805, 2017
- MTOLO, M.; GERRANO, A.; MELLEEM, J. Effect of simulated gastrointestinal digestion on the phenolic compound content and *in vitro* antioxidant capacity of processed Cowpea (*V. unguiculata*) cultivars. **Journal CyTA - Journal of Food**. v. 15, n. 3, p. 391–399, 2017.
- NAYEEM, N. *et al.* Gallic Acid: A Promising Lead Molecule for Drug Development. **Journal of Applied Pharmacy**, v. 8, n. 2, p. 1-4, 2016.
- NDERITU, A. M. *et al.* Phenolic composition and inhibitory effect against oxidative DNA damage of cooked cowpeas as affected by simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1763–1771, 2013.
- ORTEGA, N. *et al.* Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an *in vitro* digestion model. **Food Chemistry**, v. 124, p. 65-71, 2011.

- PEREIRA, C. A. *et al.* HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis**, v. 15, n. 4, p. 241-8, 2004.
- PEREZ HERNANDEZ, L. *et al.* Polyphenol release in Borlotti beans (*Phaseolus vulgaris*) during cooking, soaking, simulated digestion and acid hydrolysis. **Proceedings of The Nutrition Society**, v. 75, p. E53, 2016.
- PRICE, M. L.; SCOYOC, S. V.; BUTLER, L. G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 1214-1218, 1978.
- RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABST radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.
- RUFINO, M. S. M. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.
- SANCHO, R. A. S.; PAVAN, V.; PASTORE, G. M. Effect of *in vitro* digestion on bioactive compounds and antioxidant activity of common bean seed coats. **Food Research International**, v. 76, p. 74–78, 2015.
- SINGLETON, V. I.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid agents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.
- SOMBIÉ, P. A. E. D. *et al.* Antioxidant and Phytochemical Studies of 31 Cowpeas (*Vigna unguiculata* (L. Walp.)) Genotypes from Burkina Faso. **Foods**, v. 7, n. 143, p. 1-9, 2018.
- TIBERTI, L. A. *et al.* Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 846, n. 1-2, p. 378-384, 2007.
- YADAV, N. *et al.* Effect of thermal and non-thermal processing on antioxidant potential of cowpea seeds. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 437-451, 2018.

CAPÍTULO II

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO CIENTÍFICO V

Bioacessibilidade in vitro de compostos fenólicos da cultivar de feijão-caupi BRS Aracê antes e após a cocção, à ser submetido na revista Food Chemistry, ISSN:

0308-8146

BIOACESSIBILIDADE *IN VITRO* DE COMPOSTOS FENÓLICOS DA CULTIVAR DE FEIJÃO-CAUPI BIOFORTIFICADA BRS ARACÊ ANTES E APÓS A COCÇÃO

RESUMO

Avaliou-se o efeito da simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* sobre o conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante nos grãos da cultivar de feijão-caupi BRS Aracê, antes e após a cocção. Os grãos crus foram analisados na forma de farinha, e, após cozimento em panela de pressão por 13 minutos, os grãos cozidos foram macerados com o caldo. Foram analisados os conteúdos de compostos fenólicos e flavonoides totais, proantocianidinas e atividade antioxidante pelo método de captura dos radicais livres ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) e FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), por meio da espectrofotometria, antes e após o cozimento e em todas as fases do processo digestivo. Pesquisaram-se oito ácidos fenólicos, e a identificação e quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante foram reduzidos durante o cozimento, mas aumentaram com a digestão simulada, devido à liberação de formas ligadas. Nos grãos crus foram identificados cinco ácidos fenólicos após a digestão *in vitro* (ácidos gálico, clorogênico, cafeico, p-cumárico e ferúlico), enquanto que nos grãos cozidos três foram identificados (ácidos gálico, cafeico e ferúlico). Os ácidos fenólicos sofreram degradação sob condições gastrointestinais, entretanto, os grãos da cultivar de feijão-caupi BRS Aracê mantiveram compostos com relevante bioatividade (grão cru – ácidos gálico, cafeico e p-cumárico; grão cozido – ácidos gálico e cafeico) e atividade antioxidante, que podem auxiliar na diminuição da incidência de doenças crônicas não transmissíveis, comprovando que o feijão-caupi é um alimento fonte de compostos antioxidantes.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*. Processamento térmico. Digestão *in vitro*. Fenólicos. Atividade antioxidante.

1 INTRODUÇÃO

Uma dieta rica em leguminosas tem sido associada à menor incidência de estresse oxidativo e doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs), como diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares e renais. Os efeitos protetores das leguminosas

podem ser parcialmente devidos à presença de compostos fenólicos totais (CFT), que podem eliminar os radicais livres (RL), protegendo assim biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA de danos relacionados ao estresse oxidativo (NDERITU et al., 2013; SANCHO; PAVAM; PASTORE, 2015).

Essa potencial ação protetora tem despertado o interesse da comunidade científica, que identificou no feijão-caupi não apenas a presença de compostos bioativos como os ácidos fenólicos, flavonóis, flavan-3-ols, antocianinas e taninos condensados, mas também atividades anti-inflamatória e antioxidante (AA), especificamente contra radicais livres *in vitro* e *in vivo* (DENG et al., 2013; MOREIRA-ARAÚJO et al., 2017; SOMBIÉ et al., 2018). Estes compostos concentram-se no tegumento dos grãos, conferindo a maior parte da coloração das sementes de feijão-caupi (SOMBIÉ et al., 2018).

Vários estudos mostraram que a digestão induz mudanças importantes nos compostos fenólicos de diferentes alimentos levando a alterações na atividade antioxidante, contudo, pouco se sabe sobre as modificações trazidas pela digestão gastrointestinal (DG) nos fenólicos do feijão-caupi (NDERITU et al., 2013). Embora o interesse por esse assunto tenha aumentado recentemente, não existem estudos até o presente momento que abordem, em cada etapa do processo digestivo, o conteúdo de compostos bioativos e a proteção destes contra os radicais livres, a exemplo na cultivar BRS Aracê, uma cultivar de feijão-caupi melhorada geneticamente com elevados teores de proteínas, ferro e zinco, e de tegumento verde.

Para Lucas-González et al. (2018), a bioacessibilidade do composto refere-se a quantidade liberada da matriz alimentar e solubilizada na fase aquosa (quimo), tornando-se disponível para absorção na circulação sistêmica através da parede do intestino. Nesse sentido, a bioatividade dos compostos fenólicos depende da sua bioacessibilidade durante o processo digestivo, os quais serão metabolizados por fluidos eletrolíticos e enzimas gástricas, intestinais, pancreáticas, hepáticas e pela microbiota.

A DG *in vitro* tem sido utilizada com frequência para simular condições gastrintestinais, uma vez que pode ser considerada relativamente simples quando comparada ao modelo *in vivo*, além de ser segura e não apresentar restrições éticas (SANCHO; PAVAM; PASTORE, 2015). Para o feijão-caupi, a DG *in vitro* afetou o conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante, pois nos estudos de Hachibamba et al. (2013) e Mtolo, Gerrano e Mellem (2017) o teor de compostos

fenólicos e a atividade de eliminação dos radicais livres do feijão-caupi aumentaram com a digestão enzimática simulada.

As frações acessíveis dos compostos fenólicos da dieta durante o cozimento e a digestão, e sua potencial bioacessibilidade, são importantes determinantes dos potenciais benefícios à saúde que podem oferecer. Nessa perspectiva, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da digestão gastrointestinal *in vitro* do grão cru e cozido de cultivar de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) produzida no Brasil, BRS Aracê, sobre o conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

2 METODOLOGIA

2.1 AMOSTRAS

Os grãos da cultivar BRS Aracê biofortificada de feijão-caupi de dois lotes foram fornecidos pelo Setor de Recursos Genéticos e Melhoramento (Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI, Brasil) e mantidos no Laboratório de Bromatologia e Bioquímica de Alimentos (Departamento de Nutrição/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal do Piauí) a uma temperatura de refrigeração de 8 °C, em sacos de polietileno, até o momento das análises.

O feijão-caupi cru foi triturado em moinho de rotor tipo ciclone (modelo 651/2) até obtenção de um pó homogêneo (0,5 *mesh*). O cozimento do feijão-caupi foi realizado na proporção feijão:água de 1:3 (p/v) em panela de pressão doméstica de 2 L, durante 13 minutos, a temperatura de 121 °C (BARROS et al., 2017). Os grãos cozidos e caldo de cocção foram macerados e armazenados sob refrigeração (± 8 °C) até as análises subsequentes.

2.2 SIMULAÇÃO *IN VITRO* DA DIGESTÃO GASTROINTESTINAL

A simulação da digestão *in vitro* de 1,5 g das amostras, diluída em água ultrapura (1:4, m.v⁻¹), foi realizada em quatro etapas: oral, gástrica, duodenal (MINEKUS et al., 2014) e simulação da ação enzimática da microbiota colônica (FOGLIANO et al., 2011). Após cada etapa, a solução foi centrifugada (modelo 5702) a 3600 rpm (2173,5 g), por 40 minutos, e filtrada em papel filtro quantitativo. O filtrado foi coletado, o volume aferido e armazenado a - 20 °C. Para todas as etapas da digestão foi preparado branco, sem adição de amostras, para evitar a superestimação na quantificação dos compostos bioativos analisados.

2.3 COMPOSTOS BIOATIVOS

2.3.1 Elaboração dos extratos

Inicialmente, foram preparados extratos dos grãos de feijão-caupi crus e cozidos, segundo metodologia de Rufino et al., (2010), utilizando a mistura dos solventes: metanol (50%), acetona (70%) e água ultrapura (2:2:1). Após a digestão *in vitro*, foram coletadas de cada etapa da digestão o filtrado, para a realização das análises de compostos bioativos totais e atividade antioxidante.

2.3.2 Análises dos compostos bioativos

Os compostos fenólicos totais nos extratos foram determinados por espectrofotometria utilizando o reagente de *Folin-Ciocalteu* e as leituras das absorbâncias das amostras foram realizadas a 765 nm em espectrofotômetro (modelo 1102). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de amostra. A concentração de compostos fenólicos totais foi avaliada através da interpolação da absorbância utilizando uma curva padrão de ácido gálico previamente construída (SINGLETON; ROSSI, 1965).

O método descrito por González-Aguilar et al. (2007) foi utilizado para avaliar os flavonoides totais e a absorbância foi então medida a 425 nm em um espectrofotômetro (modelo 1102). Diferentes concentrações de quercetina (0-100 mg / L) foram usadas para construir uma curva padrão, e os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de quercetina (EQ) / 100 g de amostra.

Os níveis de proantocianidinas foram avaliados colorimetricamente utilizando o método da vanilina (PRICE et al., 1978), e as leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (modelo 1102) a 500 nm. A catequina foi utilizada como padrão e os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de catequina (EC) / 100 g de amostra.

2.3.3 Identificação dos Compostos Fenólicos

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), nos extratos dos grãos de feijão-caupi cru e cozidos e no filtrado obtido da fase duodenal, de acordo com o método de Pereira et al. (2004) e Tiberti et al. (2007).

Os padrões ácidos fenólicos utilizados foram: gálico, cafeico, clorogênico, elágico, epicatequina, ferúlico, p-cúmarico e quercetina, solubilizados em metanol

puro. As fases móveis utilizadas foram filtradas através de membranas HAWP e HVWP de solventes aquosos e orgânicos, respectivamente (0,45 µm tamanho de poro), com o auxílio de uma bomba à vácuo. Antes das injeções das amostras no cromatógrafo, estas foram filtradas em filtros para seringa com 0,45 µm de poro e 33 mm de diâmetro.

Os compostos fenólicos foram analisados usando um cromatógrafo líquido de alta performance LC-20 AT. A separação foi realizada usando uma pré-coluna GVP-ODS (10 mm x 4,6 mm) acoplada com uma coluna VP-ODS (150 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm) equipado com um detector UV-Vis SPD-20A. A taxa de fluxo foi mantida a 0,7 mL/min⁻¹ e a temperatura da coluna foi mantida a 40 ° C, com um volume de injeção de 10 µL. O gradiente da fase móvel foi composto de (A) metanol com 1% de ácido acético e (B) 1% de ácido acético: de 0 a 1 min, 10% de A; 1-5 min 15% A; 5-10 min, 20% A; 10-15 min, 25% de A; 15-25 min, 30% A; 25-30 min, 70% de A; 30-40 min, 80% A; 40-50 min, 10% A. O tempo total da corrida foi de 50 min. Os compostos foram detectados a λ 280 (ácido gálico, epicatequina e ácido elágico), λ 320 (ácidos cafeico, p-cumárico, clorogênico e ferúlico) e λ 360 nm (quercetina). Os picos foram identificados por comparação com o tempo de retenção dos padrões, e a quantificação dos compostos foi baseada nas áreas dos respectivos picos detectados utilizando o software de aquisição LabSolutions versão 5.57 SP1. A calibração da coluna foi realizada injetando os padrões em triplicado em nove concentrações diferentes (0,014; 0,056; 0,225; 0,45; 7,81; 15,62; 31,25; 62,5 e 120,0 µg · mL⁻¹). Os teores de compostos fenólicos foram calculados em mg/100 gramas.

2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

2.4.1 Método ABTS

O ensaio com o radical ABTS• foi conduzido segundo Re et al. (1999). A absorvância foi medida num espectrofotômetro (modelo 1102) a 734 nm. Uma curva padrão foi construída usando Trolox em diferentes concentrações (0-100 mg / L) como referência, e os resultados expressos como µmol de atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) por 100 g de amostra.

2.4.2 Método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Potential*)

Utilizou-se o método descrito por Benzie e Strain (1996), com a absorvância foi medida em um espectrofotômetro (modelo 1102) a 620 nm. Uma curva padrão foi

construída usando Trolox em diferentes concentrações (0-100 mg / L) como referência. As médias calculadas de acordo com a curva de calibração, e os resultados expressos em $\mu\text{mol TEAC}$ em 100 g de amostra.

2.5 ÍNDICE DE BIOACESSIBILIDADE (IB)

Para avaliar as alterações nos compostos bioativos, ao longo da digestão gastrointestinal *in vitro*, os índices de bioacessibilidade (IB) foram calculados de acordo com a Equação: $\text{IB (\%)} = 100 \cdot \text{B/C}$ (ORTEGA et al., 2011). Onde B é o teor de fenólicos, flavonoides, proantocianidinas ou atividade antioxidante pelos ensaios ABTS e FRAP, quantificados no sobrenadante após processo de digestão, e C, a quantidade desses compostos antes da digestão, expressa nas mesmas unidades.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada por meio do Programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS, versão 17.0). Os resultados foram apresentados com média e desvio padrão. Antes de iniciar a análise estatística, foi aplicado o teste de normalidade não paramétrico de *Kolmogorov-Smirnov* para distribuição normal. Posteriormente, foi utilizado o teste t de *Student* para verificar as diferenças entre as médias de grãos crus e cozidos e os tipos de cultivares, enquanto através da ANOVA utilizou-se o teste de múltiplas comparações de *Tukey* para a identificação dos compostos fenólicos com 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$) e nível de confiança de 95% (HILBE; ROBINSON, 2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos da digestão gastrointestinal simulada sobre a liberação dos compostos bioativos dos grãos crus e cozidos da cultivar em estudo estão demonstrados na Tabela 1. O conteúdo foi diferenciado considerando cada etapa da digestão gastrointestinal, com exceção da fase colônica, na qual houve redução significativa ($p \leq 0,05$) no teor destes compostos tanto para os grãos crus e cozidos.

De acordo com a Tabela 1, antes da digestão, o processamento térmico aplicado promoveu uma redução no teor de compostos fenólicos totais. Esta diminuição com o cozimento deve-se a capacidade dos fenólicos em formar complexos com proteínas e carboidratos, o que dificulta a sua extração, ou então pode

ter ocorrido transformações químicas, ou oxidação destes no cozimento (XU; CHANG, 2009).

Os resultados do presente estudo antes da digestão foram similares ao verificado por Cavalcante et al. (2017), no qual o cozimento de cinco cultivares de feijão-caupi brasileiras (BRS Marataoã, BR 17-Gurguéia, BRS Itaim, BRS Cauamé e BRS Guariba) reduziu significativamente ($p \leq 0,05$) os níveis de compostos fenólicos e flavonoides totais. Yadav et al. (2018) também verificaram uma diminuição no teor de compostos fenólicos e flavonoides totais com o cozimento (90 minutos) em quatro cultivares de feijão-caupi, com uma redução na faixa de 3,4% a 73,7% para os fenólicos e 39,9% a 47,4% para os flavonoides totais.

Tabela 1 – Teor de compostos fenólicos, flavonoides totais e proantocianidinas antes e após a digestão gastrointestinal *in vitro* considerando cada etapa, em grãos crus e cozidos da cultivar de feijão-caupi biofortificada BRS Aracê.

Etapas da digestão	Fenólicos totais (mg EAG.100 ⁻¹ g)		Flavonoides totais (mg EQ.100 ⁻¹ g)		Proantocianidinas (mg EC.100 ⁻¹ g)	
	Grão cru	Grão cozido	Grão cru	Grão cozido	Grão cru	Grão cozido
Antes da digestão	227,98 ± 4,12 ^a A	126,58 ± 0,00 ^a A	42,82 ± 1,01 ^a A	22,45 ± 1,18 ^b A	4,72 ± 0,00 ^a A	3,75 ± 0,00 ^b A
Oral	226,70 ± 2,27 ^a A	115,37 ± 0,00 ^b B	38,43 ± 0,00 ^a B	20,08 ± 0,00 ^b B	4,36 ± 0,49 ^a B	2,15 ± 0,00 ^b B
Gástrica	328,67 ± 0,00 ^a B	87,31 ± 0,00 ^b C	147,90 ± 0,00 ^a C	78,37 ± 0,00 ^b C	3,91 ± 0,00 ^a AC	4,67 ± 0,00 ^b AC
Duodenal	367,40 ± 0,16 ^a C	107,81 ± 5,23 ^b D	115,06 ± 0,16 ^a D	56,81 ± 0,00 ^b D	-	-
Colônica	34,00 ± 0,00 ^a D	19,52 ± 0,00 ^b E	29,81 ± 1,09 ^a E	21,30 ± 0,00 ^b AE	2,58 ± 0,18 ^a D	2,84 ± 0,00 ^b D
IB (%)						
Oral	99,4	91,1	89,7	89,4	92,4	57,3
Gástrica	144,2	69,0	345,4	349,1	82,8	124,5
Duodenal	161,2	85,2	268,7	253,1	-	-
Colônica	14,9	15,4	69,6	94,9	54,7	75,7

Legenda: Resultados expressos como média ± desvio-padrão. IB: Índice de Bioacessibilidade. EAG: Equivalentes em Ácido Gálico. EQ: Equivalentes de Quercetina. EC: Equivalentes em Catequina. Letras subscritas minúsculas iguais entre os tipos de feijão cru e cozido, não há diferença significativa entre as médias segundo teste t de *Student*, ao nível de 5% $p \leq 0,05$, IC95%. Letras maiúsculas iguais entre as fases, não há diferença significativa entre as médias segundo o teste do one way ANOVA: post Hoc multiple comparisons, utilizou-se o teste de *Tukey* ao nível de 5% $p \leq 0,05$, IC95%.

Considerando o IB, as condições empregadas na digestão gastrointestinal simulada tornaram os compostos fenólicos e flavonoides totais mais acessíveis para a absorção na barreira intestinal e posterior utilização celular. O resultado do presente estudo foi condizente com o verificado por outros pesquisadores ao simular a digestão gastrointestinal *in vitro* em cultivares de feijão comum (CHEN et al., 2015; PEREZ-HERNANDEZ et al., 2016) e em outras cultivares de feijão-caupi (HACHIBAMBA et al., 2013; MTOLO; GERRANO; MELLEME, 2017).

O estudo de Ortega et al. (2011) descreve que as enzimas utilizadas e as condições de pH (ácidas ou ligeiramente alcalinas) durante a digestão gastrointestinal simulada promovem a hidrólise de macromoléculas tais como proteínas às quais os compostos fenólicos podem ser ligados. Tais fenólicos ligados podem ser liberados e tornarem-se mais extraíveis na digestão enzimática. Além disso, os compostos fenólicos também podem ter melhor estabilidade sob condições de pH durante a digestão devido ao efeito protetor dos componentes da matriz alimentar, como fibras alimentares, as quais têm sido relatadas para melhorar a estabilidade dos compostos fenólicos durante a digestão duodenal *in vitro*.

Conforme as etapas da digestão, Tenore et al. (2015) expõem que a extração dos compostos fenólicos presentes no alimento inicia na etapa oral, já que a mastigação e a ação da enzima α -amilase podem permitir a liberação dos mesmos ligados a matriz. Assim, o conteúdo extraído nesta fase é menor do que o encontrado na amostra não digerida, concordante ao verificado no presente estudo.

Para os grãos crus, após a digestão, observou-se um aumento significativo ($p \leq 0,05$) no teor de compostos fenólicos da fase oral para gástrica, indicando que 144,2% desses compostos foram bioacessíveis no estômago. Chiang et al. (2014) justificaram esse aumento devido à hidrólise dos polifenóis polimerizados a monômeros ou agliconas causadas pela ação do suco gástrico e enzima pepsina durante a digestão gástrica, o que leva à liberação de compostos para o lúmen intestinal.

Entretanto, houve uma redução significativa ($p \leq 0,05$) no teor de compostos flavonoides totais na passagem da fase gástrica para a duodenal, com uma queda de 76,7% para os grãos crus e 96% para os grãos cozidos. Devido a sua elevada sensibilidade às condições alcalinas, estes podem ter sido degradados ou clivados no duodeno com a formação de novos compostos químicos, ou outros componentes alimentares como minerais, proteínas, fibras, açúcares podem ter formado complexos

com os flavonoides (CHEN et al., 2016), ou ainda podem ser transformados em formas estruturais desconhecidas ou não detectadas resultando na diminuição da bioacessibilidade (HACHIBAMBA et al., 2013).

Sancho, Pavan e Pastore (2015) analisaram os compostos bioativos e atividade antioxidante de feijões comuns com tegumento vermelho e preto, e verificaram que a digestão reduziu os níveis de polifenóis e antocianinas totais. Contudo, a atividade antioxidante não foi reduzida após a digestão *in vitro*. As diferenças observadas entre o presente estudo e outros já realizados se devem aos diversos métodos de cozimento, aos métodos de simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* empregados, bem como a variação da amostra.

Em relação às proantocianidinas, não foram observados estes compostos na fase duodenal. Alguns polifenóis, como as proantocianidinas, são pouco liberados da matriz alimentar devido a sua estrutura polimérica e de alto peso molecular. Assim, estes compostos podem passar inalterados para o intestino grosso, onde a microflora do cólon pode convertê-los em ácidos fenólicos para exercer sua bioatividade (CHEN et al., 2015).

Em relação aos grãos cozidos, houve redução estatisticamente significativa do conteúdo de compostos fenólicos totais da fase oral para a duodenal (Tabela 1). Para Chen et al. (2016), este fato pode estar relacionado a possíveis alterações estruturais, oxidação e/ ou polimerização dos compostos fenólicos estimulados pelas condições alcalinas do sistema duodenal.

Os teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante reduziram significativamente ($p \leq 0,05$) na fase colônica, indicando baixa extração da matriz alimentar ou reduzida metabolização. Chen et al. (2015) mostraram que compostos fenólicos ligados a parede celular que não são libertados após a extração química com solvente requerem hidrólise química para dissociar-se completamente. Muitas bactérias colônicas possuem enzimas que promovem a hidrólise de carboidratos (pectinases, hemicelulases e celulases), liberando compostos fenólicos que poderão desempenhar um papel durante a digestão e fermentação no intestino delgado e grosso. Assim, Sancho, Pavan e Pastore (2015) relataram que os compostos bioativos das sementes de feijão podem exercer efeitos protetores diretos *in situ* na captura de espécies reativas de oxigênio, pois o trato gastrointestinal é constantemente exposto a radicais livres, tanto a partir da dieta quanto da ativação de fagócitos no intestino, bem como efeitos benéficos sistêmicos.

Na Tabela 2 estão demonstrados os teores de compostos fenólicos identificados nos grãos da cultivar, antes e depois da digestão. Antes da digestão, foram identificados cinco ácidos fenólicos no grão cru, que estão de acordo com Moreira-Araújo et al. (2017), que identificaram os ácidos gálico (45,4 mg/100g), clorogênico (2,39 mg/100g) cafeico (27,8 mg/100g) e ferúlico (11,1 mg/100g), além de catequina (5,57 mg/100g) e epicatequina (8,67 mg/100g) nos grãos crus da cultivar BRS Tumucumaque (cultivar melhorada geneticamente para os teores de proteínas, ferro e zinco). Os teores diferenciados de ácidos fenólicos devem-se provavelmente ao genótipo. Após o cozimento, houve uma redução no teor dos ácidos fenólicos, que foi condizente ao observado para o conteúdo de compostos fenólicos totais, possivelmente por causa da complexação destes com outras substâncias ou perdas pela oxidação em altas temperaturas.

Tabela 2 - Compostos fenólicos identificados e respectivos teores antes e após a digestão gastrointestinal *in vitro* na fase duodenal, em grãos crus e cozidos da cultivar de feijão-caupi biofortificada BRS Aracê.

Grãos	Compostos	mg.100g ⁻¹		IB (%)
		Antes da digestão <i>in vitro</i>	Depois da digestão <i>in vitro</i>	
Cru	Gálico	47,05 ± 0,60 ^a A	32,72 ± 1,41 ^b A	69,5
	Clorogênico	3,43 ± 0,04 ^a B	1,16 ± 0,10 ^b B	33,8
	Cafeico	26,35 ± 0,91 ^a C	14,07 ± 0,64 ^b C	53,4
	p-cumárico	1,41 ± 0,03 ^a D	2,65 ± 0,07 ^b D	187,9
	Ferúlico	23,64 ± 0,42 ^a E	4,91 ± 0,74 ^b E	20,8
Cozido	Gálico	40,2 ± 0,50 ^a A	21,77 ± 0,78 ^b A	54,1
	Clorogênico	-	-	-
	Cafeico	20,80 ± 0,55 ^a B	12,53 ± 1,11 ^b B	60,2
	p-cumárico	-	-	-
	Ferúlico	21,68 ± 0,32 ^a BC	2,40 ± 0,25 ^b C	11,1

Legenda: Resultados expressos como média ± desvio-padrão. Letras subscritas minúsculas iguais entre a bioacessibilidade antes e depois, não há diferença significativa entre as médias segundo teste t de *Student*, ao nível de 5% $p \leq 0,05$, IC95%. Letras maiúsculas iguais entre os compostos antes e depois, não há diferença significativa entre as médias segundo o teste do *one way* ANOVA: post Hoc multiple comparisons, utilizou-se o teste de *Tukey* ao nível de 5% $p \leq 0,05$, IC95%.

Com a digestão, observou-se uma queda na bioacessibilidade para a maioria dos ácidos fenólicos identificados, similar ao observado no estudo de Nderitu et al. (2013). Entretanto, houve um aumento no teor do ácido p-cumárico no grão cru, indicando que a liberação desse ácido foi facilitada com a digestão devido ao amolecimento ou a ruptura da parede celular.

O ácido gálico estava presente em maior quantidade nos extratos crus e cozidos, antes e após a digestão simulada (Tabela 2). Os resultados da presente pesquisa para os grãos crus foram maiores que os obtidos por Deng et al. (2013), que verificaram $6,7 \pm 0,81$ mg / 100 g de ácido gálico e $0,66 \pm 0,05$ mg / 100 g de ácido clorogênico em grãos de feijão-caupi comercializados em Guangzhou, China. Propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (OLIVEIRA et al., 2016), propriedades anticarcinogênicas (VERMA; SINGH; MISHRA, 2013) foram atribuídas ao ácido gálico.

O ácido cafeico apresenta elevada atividade sequestradora de radicais livres, inibe a peroxidação lipídica e protege contra a oxidação da LDL (KHAN; MAALIK; MURTAZA, 2016). O ácido ferúlico foi o que apresentou menor fração bioacessível, porque este ácido encontra-se conjugado à parede celular com outros polissacarídeos, sendo bastante resistente à digestão gástrica. Este ácido possui ampla variedade de atividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antialérgica, hepatoprotetora e anticarcinogênica (KUMAR; PRUTHI, 2014).

A menor bioacessibilidade dos ácidos fenólicos após a digestão *in vitro* obtida no presente estudo pode ser atribuída às interações existentes na matriz alimentar ou então à forma em que estes foram convertidos, que pode deixá-los pouco solúveis nos fluidos gastrointestinais (ALMINGER et al., 2014). Além disso, é possível que o processo de digestão enzimática possa liberar mais compostos fenólicos, mas nem todos puderam ser identificados e quantificados com o método de HPLC utilizado. Vale ressaltar que alguns compostos fenólicos não foram avaliados no grão de feijão-caupi devido à indisponibilidade de padrões analíticos no laboratório e, portanto, não é possível afirmar a ausência dos mesmos.

A influência da digestão gastrointestinal *in vitro* no grão cru e cozido da cultivar BRS Aracê na atividade de captura do radical ABTS, bem como na redução do íon férrico (Fe^{3+}) em ferroso (Fe^{2+}) pelo ensaio FRAP estão demonstrados na Tabela 3. Antes da digestão, de forma similar ao obtido para o conteúdo de compostos bioativos,

o cozimento aplicado reduziu de forma significativa ($p \leq 0,05$) a atividade antioxidante. Esse resultado já era esperado, tendo em vista que ocorreu uma perda nos teores de compostos fenólicos e flavonoides totais e proantocianidinas, condizente com outras pesquisas com leguminosas tais como a ervilha, grão-de-bico e lentilha (XU; CHANG, 2009), e com grãos de feijão-caupi (BARROS et al., 2017; CAVALCANTE et al., 2017; YADAV et al., 2018).

Tabela 3 – Atividade antioxidante pelo método ABTS e FRAP antes e após a digestão gastrointestinal *in vitro* considerando cada etapa, em grãos crus e cozidos da cultivar de feijão-caupi biofortificada BRS Aracê.

Etapas da digestão	ABTS ($\mu\text{mol.Trolox.}100\text{g}^{-1}$)		FRAP ($\mu\text{mol.Trolox.}100\text{g}^{-1}$)	
	Grão cru	Grão cozido	Grão cru	Grão cozido
Antes da digestão	799,21 \pm 15,71 ^a A	428,88 \pm 6,74 ^b A	356,53 \pm 7,85 ^a A	162,30 \pm 7,85 ^b A
Oral	437,67 \pm 1,87 ^a C	398,84 \pm 0,00 ^b C	232,86 \pm 2,21 ^a C	147,64 \pm 2,21 ^b C
Gástrica	794,51 \pm 0,00 ^a AB	517,15 \pm 0,00 ^b B	317,06 \pm 2,62 ^a B	217,11 \pm 0,00 ^b B
Duodenal	1579,22 \pm 0,00 ^a D	1331,8 \pm 5,02 ^c D	658,89 \pm 0,00 ^a D	433,78 \pm 0,00 ^b D
Colônica	227,98 \pm 0,00 ^a E	203,96 \pm 0,02 ^b E	188,98 \pm 2,19 ^a E	88,63 \pm 0,00 ^b E
IB (%)				
Oral	54,8	93,0	65,3	91,0
Gástrica	99,4	120,6	88,1	133,8
Duodenal	197,6	310,5	184,8	267,3
Colônica	28,5	47,6	53,0	54,6

Legenda: Resultados expressos como média \pm desvio-padrão. IB: Índice de Bioacessibilidade. Letras subscritas minúsculas iguais entre os tipos de feijão cru e cozido, não há diferença significativa entre as médias segundo teste t de *Student*, ao nível de 5% $p \leq 0,05$, IC95%. Letras maiúsculas iguais entre as fases, não há diferença significativa entre as médias segundo o teste do one way ANOVA: post Hoc multiple comparisons, utilizou-se o teste de *Tukey* ao nível de 5% $p \leq 0,05$, IC95%.

Considerando a Tabela 3, observou-se que a digestão gastrointestinal simulada *in vitro* promoveu um aumento da atividade antioxidante avaliada pelos dois métodos, com destaque para maior acessibilidade na fase duodenal. A simulação da digestão promoveu a liberação de compostos fenólicos das formas glicosídicas para agliconas, devido à hidrólise, as quais apresentam maior atividade antioxidante (HACHIBAMBA et al., 2013), ou houve a conversão de compostos fenólicos em

produtos com diferentes propriedades químicas e, conseqüentemente, diferentes atividades biológicas (SANCHO; PAVAM; PASTORE, 2015).

É importante destacar que o ensaio FRAP apresentou valores inferiores aos do ABTS em todas as fases avaliadas. De fato, embora os extratos digeridos tenham demonstrado capacidade de neutralização relevante contra os radicais ABTS, a presença de outros compostos não-fenólicos, como aminoácidos e peptídeos derivados da hidrólise de proteínas, pode interferir com a atividade antioxidante. O feijão-caupi contém em média 22-30% de proteínas, além de peptídeos bioativos, que são liberados após a digestão gastrointestinal e possuem efetiva atividade antioxidante (AWIKA; DUODU, 2012), além de apresentarem poliaminas que também podem contribuir para a atividade antioxidante elevada (BARROS et al., 2017).

Observou-se que o cozimento promoveu uma redução no teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, e a digestão gastrointestinal simulada *in vitro* aumentou a bioacessibilidade destes compostos tornando-os potencialmente disponíveis para absorção. Foi possível ainda observar comportamentos diferenciados para os teores de compostos bioativos de acordo com cada etapa do processo digestivo, que foram justificados pelas características próprias da matriz alimentar, possíveis interações entre compostos fenólicos, mas também com aminoácidos, peptídeos, proteínas e outros, bem como enzimas e demais constituintes do alimento.

Apesar dos ácidos fenólicos terem sofrido degradação sob condições gastrointestinais, os grãos da cultivar de feijão-caupi BRS Aracê mantiveram compostos com relevante bioatividade e atividade antioxidante, que podem potencialmente proteger contra doenças crônicas não transmissíveis, indicando o feijão-caupi um alimento fonte de antioxidantes naturais para inclusão diária na dieta humana.

CONCLUSÃO

No cozimento utilizado houve uma redução no conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos grãos de feijão-caupi, e na digestão gastrointestinal simulada ocorreu um aumento dos mesmos. Esse processo tornou alguns compostos fenólicos menos extraíveis – ácidos clorogênico e ferúlico (devido à ligação com outros componentes dos alimentos) ou mais extraíveis – grãos crus: ácidos gálico, cafeico e p-cumárico; grãos cozidos: ácidos gálico e cafeico (pela

liberação de formas ligadas). Assim, observou-se que os produtos da digestão enzimática apresentaram elevada bioacessibilidade, que podem auxiliar na diminuição da incidência de doenças crônicas não transmissíveis, comprovando que o feijão-caupi é um alimento fonte de compostos antioxidantes.

AGRADECIMENTOS

Os autores desejam agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento concedido por meio do processo PROCAD / CASADINHO - CNPq - CAPES, 552239 / 2011-9, Edital Universal CNPq 14/2011, Processo 482292 / 2011-3 e Edital Universal CNPq 01/2016, Processo 431314 / 2016-0.

REFERÊNCIAS

- Alminger, M., Aura, A. M., Bohn, T., Dufour, C., El, S. N., Gomes, A., Karakaya, S., Martínez-Cuesta, M. C., Mcdougall, G. J., Requena, T., Santo, C. N. (2014). *In Vitro* Models for Studying Secondary Plant Metabolite Digestion and Bioaccessibility. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 13(4), 413-436.
- Awika, J. M & Duodu, K. G. (2017). Bioactive polyphenols and peptides in cowpea (*Vigna unguiculata*) and their health promoting properties: A review. **Journal of Functional Foods**, 38, 686–697.
- Barros, N. V. A., Rocha, M. M., Glória, M. B. A., Araújo, M. A. M., Moreira-Araújo, R. S. R. (2017). Effect of cooking on the bioactive compounds and antioxidant activity in grains cowpea cultivars. **Revista Ciência Agronômica**, 48(5), 824-831.
- Benzie, I. F. F. & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, 239(1), 70-76.
- Cavalcante, R. B. M., Araújo, M. A. M., Rocha, M. M., Moreira-Araújo, R. S. R. (2017). Effect of thermal processing on chemical compositions, bioactive compounds, and antioxidant activities of cowpea cultivars. **Revista Caatinga**. 30(4), 1050-1058.

Chen, P. X., Dupuis, J. H., Marcone, M.F., Pauls, P.K., Liu, R., Liu, Q., Tang, Y., Zhang, B., Tsao, R. (2015). Physicochemical properties and *in vitro* digestibility of cooked regular and nondarkening cranberry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and their effects on bioaccessibility, phenolic composition, and antioxidant activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 63(48), 10448–10458.

Chen, G. I., Chen, S-G., Chen, F., Xie, Y-Q., Han, M-D., Luo, C-X., Zhao, Y-Y., Gao, Y-Q. (2016). Nutraceutical potential and antioxidant benefits of selected fruit seeds subjected to an *in vitro* digestion. **Journal of Functional Foods**, 20, 317–331.

Chiang, Y. C., Chen, C. L., Jeng, T. L., Lin, T. C., Sung, J. M. (2014). Bioavailability of cranberry bean hydroalcoholic extract and its inhibitory effect against starch hydrolysis following *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Research International**, 64, 939-945.

Deng, G-F., Lin, X., Xu, X-R., Gao, L-L., Xie, J-F., Li, H-B. (2013). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. **Journal of Functional Foods**. 5(1), 260-266.

Fogliano, V., Corollaro, M.I., Viatglione, P., Napolitano, A., Ferracane, R., Travaglia, F., Arlorio, M., Costabile, A., Klinder, A., Gibson, G. (2011). *In vitro* bioaccessibility and gut biotransformation of polyphenols present in the water-insoluble cocoa fraction. **Molecular Nutrition Food Research**, 55, 1-12.

González-Aguilar, G. A., Villegas-Ochoa, M. A., Martínez-Téllez, M. A., Gardea, A. A., Ayala-Zavala, J. F. (2007). Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. **Journal of Food Science**, 72(3): s197–s202.

Hachibamba, T., Dykes, L., Awika, J., Minnaar, A., Duodu, K. G. (2013). Effect of simulated gastrointestinal digestion on phenolic composition and antioxidant capacity of cooked cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties. **International Journal of Food Science Technology**, 48(12), 2638–2649.

Hilbe, J. M. & Robinson, A. P. (2013). **Methods of Statistical Model Estimation**. Chapman & Hall/CRC Press, Boca Raton. 255 p.

Khan, F. A., Maalik, A., Murtaza, G. (2016). Inhibitory mechanism against oxidative stress of caffeic acid. **Journal of Food and Drug Analysis**, 24(4), 695-702.

Kumar, N. & Pruthi, V. (2014). Potential applications of ferulic acid from natural sources. **Biotechnology Reports**, 16(4), 86–93

Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J. A., Fernández-López, J. (2018). *In vitro* digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. **Food Research International**, 107, 423–436.

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Balance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S., Weitschies, W., Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus. **Food & Function**, 5, 1113-1124.

Moreira-Araújo, R. S. R., Moreira-Araújo, R. S. R., Sampaio, G. R., Soares, R. A. M., Silva, C. P., Araújo, M. A. M., Arêas, J. A. G. (2017). Identification and quantification of antioxidant compounds in cowpea. **Revista Ciência Agronômica**, 48(5), 799-805.

Moreira-Araújo, R. S. R., Moreira-Araújo, R. S. R., Sampaio, G. R., Soares, R. A. M., Silva, C. P., Araújo, M. A. M., Arêas, J. A. G. (2018). Identification and quantification of phenolic compounds and antioxidant activity in cowpeas of BRS Xiquexique cultivar. **Revista Caatinga**, 31(1), 209-216.

Mtolo, M., Gerrano, A., Mellem, J. (2017). Effect of simulated gastrointestinal digestion on the phenolic compound content and *in vitro* antioxidant capacity of processed Cowpea (*V. unguiculata*) cultivars. **CYTA - Journal of Food**. 15(3), 391–399.

Nderitu, A. M., Dykes, L., Awika, J. M., Minnaar, A., Duodu, K. G. (2013). Phenolic composition and inhibitory effect against oxidative DNA damage of cooked cowpeas as affected by simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, 141(3), 1763–1771.

Oliveira, L., Thomé, G. R., Lopes, T. F., Reichert K. P., de Oliveira, J. S., da Silva Pereira, A., Baldissareli, J., da Costa Krewer, C., Morsch, V. M., Chitolina Schetinger, M. R., Spanevello, R. M. (2016). Effects of gallic acid on delta aminolevulinic dehydratase activity in biochemical, histological and oxidative stress parameters in the liver and kidney of diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 84, 1201-99.

Ortega, N., Macià, A., Romero, M. P., Reguant, J., Motilva, M. J. (2011). Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an *in vitro* digestion model. **Food Chemistry**, 124, 65-71.

Pereira, C. A., Yariwake, J. H., Lanças, F. M., Wauters, J. N., Tits, M., Angenot, L. (2004). A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis**, 15(4), 241-8.

Perez Hernandez, L., Morgan, M., Bosch, C., Orfila, C. (2016). Polyphenol release in Borlotti beans (*Phaseolus vulgaris*) during cooking, soaking, simulated digestion and acid hydrolysis. **Proceedings of The Nutrition Society**, 75: E53.

Price, M. L., Scoyoc, S. V., Butler, L. G. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 26(5), 1214-1218.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABST radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, 26(9-10), 1231-1237.

Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., Mancini Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, 121(4), 996–1002.

Sancho, R. A. S., Pavan, V., Pastore, G. M. (2015). Effect of *in vitro* digestion on bioactive compounds and antioxidant activity of common bean seed coats. **Food Research International**, 76, 74–78.

Singleton, V. I. & Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid agents. **American Journal of Enology and Viticulture**, 16(3), 144-158.

Sombié, P. A. E. D., Compaoré, M., Coulibaly, A. Y., Ouédraogo, J. T., Tignégré, J. B. D. L. S., Kiendrébéogo, M. (2018). Antioxidant and Phytochemical Studies of 31 Cowpeas (*Vigna unguiculata* (L. Walp.)) Genotypes from Burkina Faso. **Foods**, 7(143), 1-9.

Tenore, G. C. Campiglia, P., Giannetti, D., Novellino, E. (2015). Simulated gastrointestinal digestion, intestinal permeation and plasma protein interaction of white, green, and black tea polyphenols. **Food Chemistry**, 169(15), 320-326.

Tiberti, L. A., Yariwake, J. H., Ndjoko, K., Hostettmann, K. (2007). Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 846(1-2), 378-384.

Verma, S., Singh, A., Mishra, A. (2013). Gallic acid: Molecular rival of cancer. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 35(3), 473-85.

Xu, B. & Chang, S. K. C. (2009). Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of Pinto and Black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57(11), 4754-4764.

Yadav, N., Kaur, D., Malaviya, R., Singh, M., Fatima, M., Singh, L. (2018). Effect of thermal and non-thermal processing on antioxidant potential of cowpea seeds **International Journal of Food Properties**, 21(1), 437-451.

5 DISCUSSÃO GERAL

Diversas pesquisas realizadas anteriormente, como os estudos de Barros et al. (2017), Cavalcante et al. (2017), Mtolu, Gerrano e Mellem, (2017) e Yadav et al. (2018), demonstraram que a cocção reduz significativamente os níveis de compostos fenólicos e atividade antioxidante em cultivares de feijão-caupi, fato este confirmado no presente estudo. Para as três cultivares analisadas, houve uma redução no teor de compostos com propriedades antioxidantes, que pode ser justificada por diversas transformações químicas, tais como a decomposição dos compostos fenólicos, conversão destes em outros produtos ou a formação de complexos fenólico-proteína insolúveis, bem como a polimerização e/ou decomposição das suas estruturas aromáticas.

Os compostos fenólicos podem aumentar ou diminuir sua concentração de acordo com a etapa do processo digestivo. Em relação à bioacessibilidade destes compostos, observou-se comportamentos diferenciados para os grãos crus e cozidos das três cultivares avaliadas. Para os grãos crus, observou-se que a digestão aumentou os teores dos compostos fenólicos totais, com destaque para maior acessibilidade destes compostos na fase duodenal (cultivares BRS Aracê e BRS Tumucumaque), e na fase gástrica (cultivar BRS Aracê). Entretanto, para os grãos cozidos, houve uma redução nos teores de compostos fenólicos totais após a digestão *in vitro* para as três cultivares.

Para os flavonoides totais, houve um aumento na acessibilidade destes compostos, para os grãos crus e cozidos, destacando-se a fase gástrica do processo digestivo. Esse aumento no teor destes compostos na fase gástrica já foi relatado na literatura, e é atribuído à ruptura das membranas celulares do alimento, devido à acidez do meio e do tempo de contato do fluido gástrico com o substrato. Essa ação propicia a liberação dos metabólitos secundários, elevando a sua bioacessibilidade no lúmen intestinal.

Para as proantocianidinas, nos grãos crus, a ação da pepsina no meio ácido foi mais eficaz, liberando maior quantidade desses compostos para a cultivar BRS Aracê. Para as demais cultivares cruas, a maior acessibilidade foi verificada na fase duodenal. Entretanto, para as três cultivares nos grãos cozidos, o índice de bioacessibilidade foi maior na fase gástrica. Estas diferenças observadas podem ser

devidas as inúmeras interações que ocorrem na matriz alimentar, por causa da interação química e enzimática durante o processo digestivo.

É importante destacar que houve redução significativa ($p \leq 0,05$) dos compostos bioativos na fase colônica, indicando baixa extração da matriz alimentar ou reduzida metabolização. Apesar desta redução, é importante considerar que no intestino grosso ocorre metabolização de compostos fenólicos ligados à parede celular, devido à ação de enzimas bacterianas que promovem a hidrólise de carboidratos liberando estes compostos fenólicos.

Após a digestão *in vitro*, observou-se uma queda da bioacessibilidade para todos os ácidos fenólicos identificados, com exceção do ácido *p*-cumárico. Alminger et al. (2014) e Chen et al. (2016) referiram que a redução dos ácidos fenólicos após a digestão *in vitro* pode ser atribuída às interações existentes na matriz alimentar ou a forma química ao qual estes compostos foram convertidos. Outro ponto que merece ser destacado é que o processo de digestão pode liberar mais compostos fenólicos, contudo, estes não puderam ser identificados e quantificados com o método utilizado ou devido à indisponibilidade de padrões analíticos no laboratório.

Apesar da queda da bioacessibilidade para a maioria dos ácidos fenólicos identificados, os grãos das três cultivares de feijão-caupi biofortificadas avaliadas mantiveram compostos com relevante atividade antioxidante (grãos crus – ácidos gálico, cafeico e *p*-cumárico; grãos cozidos – ácidos gálico e cafeico), pois os índices de bioacessibilidade para estes ácidos foram superiores a 50%. Contudo, o ácido ferúlico foi o que apresentou menor fração bioacessível, pois segundo Faller, Fialho e Liu (2012) e Kumar e Pruthi (2014), este ácido está conjugado à parede celular dos vegetais com outros polissacarídeos, sendo bastante resistente à digestão gástrica.

Em relação à atividade antioxidante, ao longo do processo de digestão *in vitro*, sabe-se que possíveis alterações estruturais em compostos antioxidantes podem gerar metabólitos com diferentes reações frente a diferentes ensaios da atividade antioxidante. Assim, Wootton-Beard, Moran e Ryan (2011) mostraram que é importante que os experimentos com medição da atividade antioxidante devam ser realizados com mais de um método.

A digestão *in vitro* promoveu um aumento da atividade antioxidante avaliada pelos métodos de captura do radical livre ABTS, bem como na redução do íon férrico (Fe^{3+}) em ferroso (Fe^{2+}) pelo ensaio FRAP. A maior acessibilidade dos compostos ocorreu na fase duodenal, devido à liberação de compostos bioativos da forma

glicosídica para a forma aglicona. É importante frisar que o processo digestivo também pode ter favorecido maior liberação de compostos de origem não-fenólica, tais como peptídeos bioativos e poliaminas, que são compostos químicos presentes no feijão-caupi, que podem contribuir para a elevada atividade antioxidante verificada.

De uma forma geral, observou-se que a cocção promoveu uma redução no teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, e a digestão gastrointestinal *in vitro* aumentou a bioacessibilidade destes compostos tornando-os potencialmente disponíveis para absorção e utilização pelos tecidos. Os grãos crus e cozidos da cultivar BRS Aracê apresentaram melhor retenção de compostos bioativos após a cocção, e maior bioacessibilidade dos compostos fenólicos totais na fase duodenal do processo digestivo. Para os ácidos fenólicos, esta cultivar apresentou índices de bioacessibilidade mais elevados para os ácidos gálico, clorogênico e p-cumárico no grão cru, e ácido cafeico para o grão cozido.

Observaram-se comportamentos diferenciados para os teores de compostos bioativos de acordo com cada etapa do processo digestivo, que foram justificados pelas características próprias da matriz alimentar, possíveis interações entre compostos fenólicos, mas também com aminoácidos, peptídeos, proteínas e outros, bem como enzimas e demais constituintes do alimento.

Apesar dos ácidos fenólicos terem sofrido degradação sob condições gastrointestinais, resultando em diminuição da sua bioacessibilidade, os grãos das cultivares biofortificadas de feijão-caupi avaliadas mantiveram compostos com relevante acessibilidade e atividade antioxidante, que podem auxiliar na proteção contra doenças crônicas não transmissíveis, comprovando que o feijão-caupi é um alimento fonte de compostos antioxidantes.

6 CONCLUSÕES

- O teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e proantocianidinas das três cultivares biofortificadas reduziu com a cocção.
- A atividade antioxidante dos grãos das cultivares antes da cocção foi maior do que dos grãos após a cocção, com os maiores teores na avaliação pelo método ABTS.
- Recomenda-se o consumo do feijão-caupi com o caldo de cocção para retenção de compostos com propriedades antioxidantes.
- Após a digestão *in vitro*, houve redução da bioacessibilidade dos ácidos fenólicos identificados, com exceção do ácido p-cumárico.
- A digestão *in vitro* tornou alguns compostos fenólicos menos extraíveis (ácidos clorogênico e ferúlico), ou mais extraíveis (grãos crus: ácidos gálico, cafeico e p-cumárico; grãos cozidos: ácidos gálico e cafeico).
- A bioacessibilidade dos compostos fenólicos e atividade antioxidante aumentou com a digestão *in vitro* para os grãos crus e cozidos das três cultivares biofortificadas.
- A cultivar de feijão-caupi BRS Aracê apresentou melhor retenção dos compostos bioativos totais após a cocção e maior bioacessibilidade dos ácidos gálico, clorogênico e p-cumárico no grão cru, e ácido cafeico para o grão cozido.
- Os produtos da digestão *in vitro* apresentaram elevada bioacessibilidade, e têm potencial para auxiliar na eliminação de espécies reativas de oxigênio que causam doenças crônicas não transmissíveis.

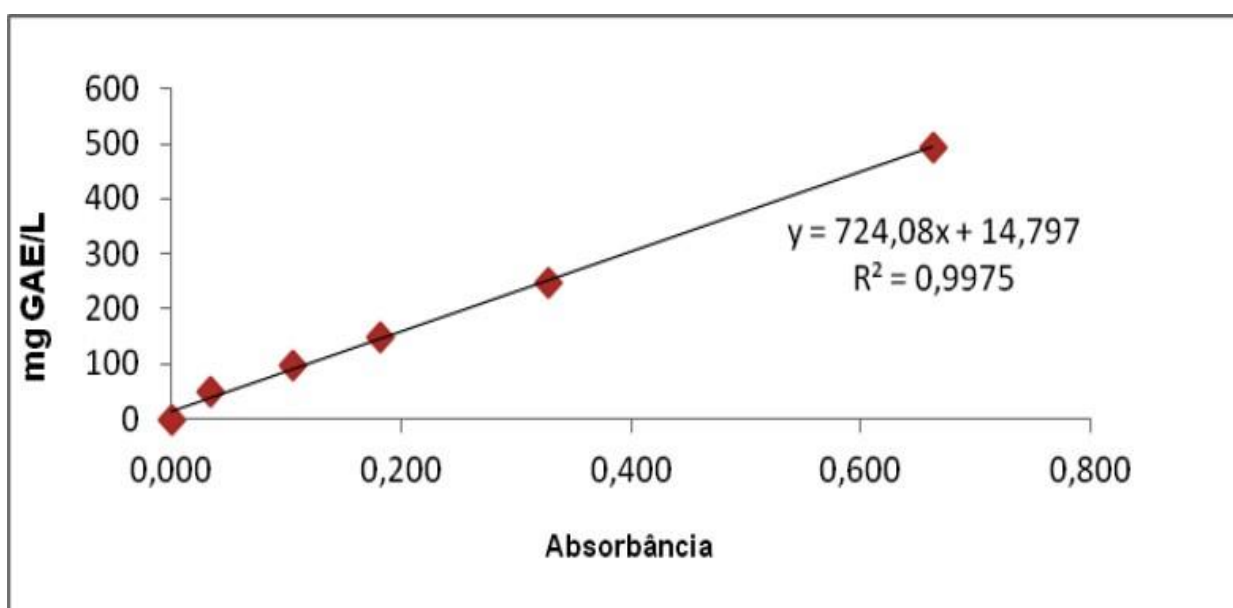
APÊNDICES



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO – PRPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO – PPGAN

APÊNDICE A

CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO PARA DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.

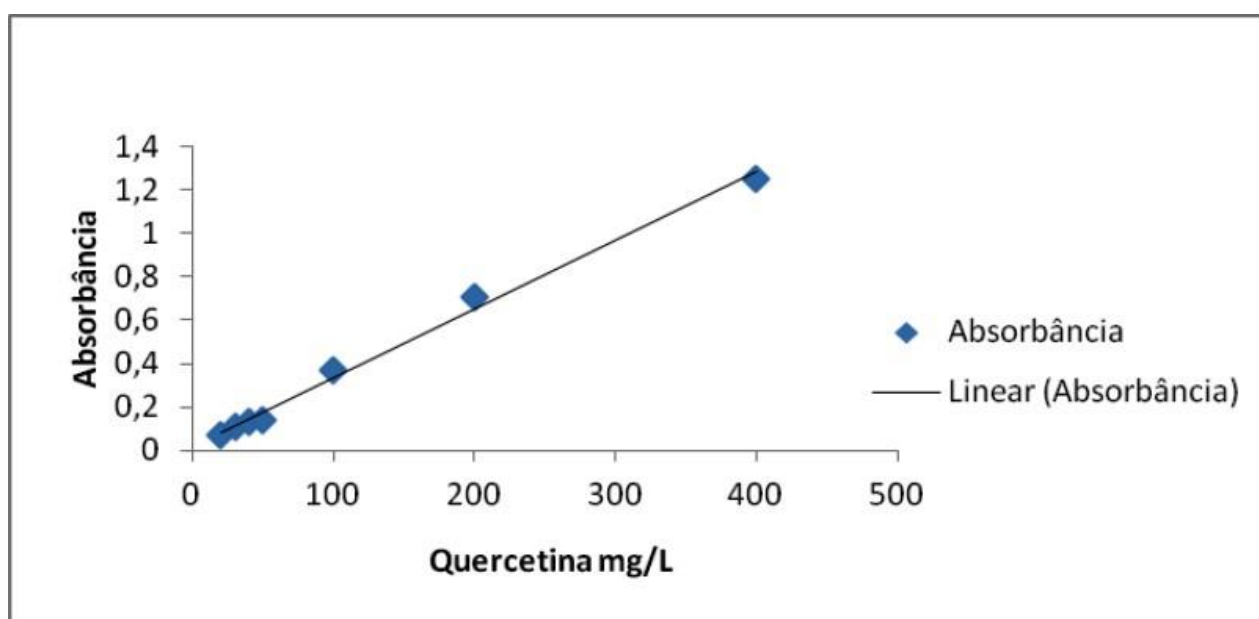




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO – PRPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO – PPGAN

APÊNDICE B

CURVA PADRÃO DE QUERCETINA PARA DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS.

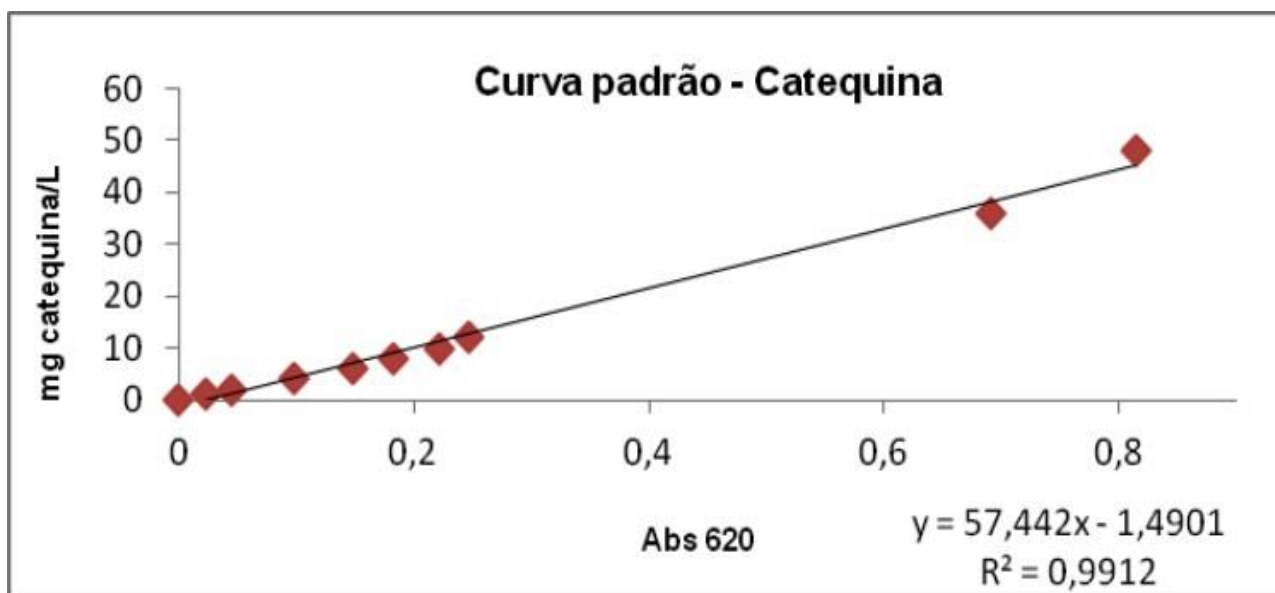




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO – PRPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO – PPGAN

APÊNDICE C

CURVA PADRÃO DE CATEQUINA PARA DETERMINAÇÃO DE PROANTOCIANIDINAS.

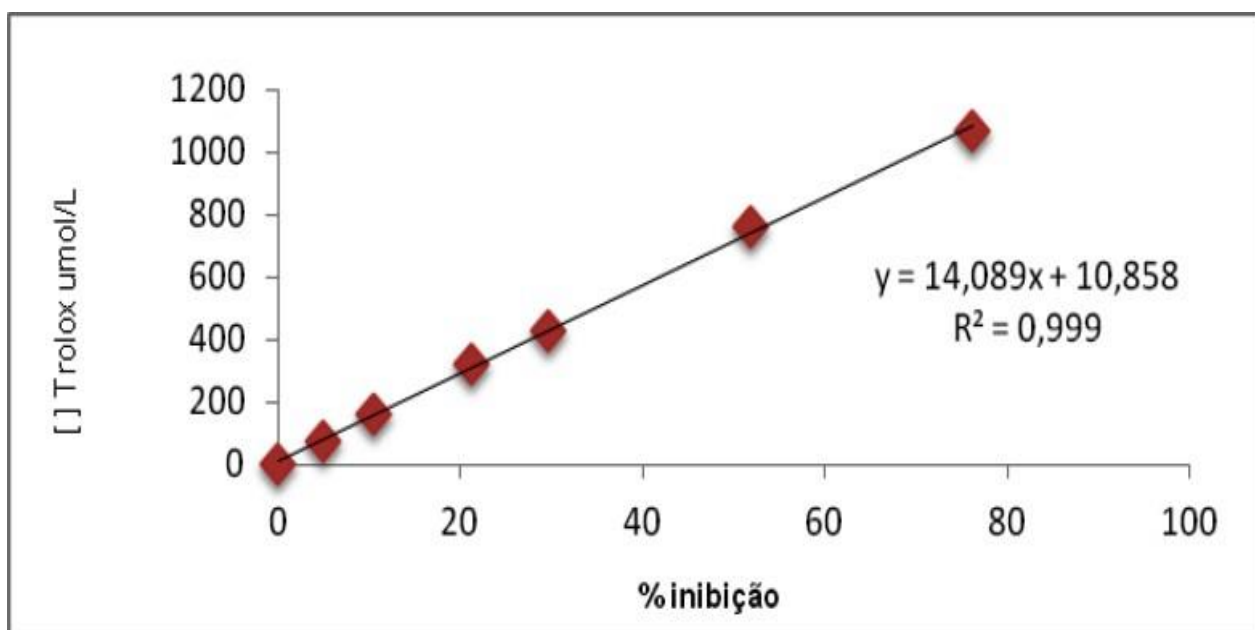




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO – PRPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO – PPGAN

APÊNDICE D

CURVA PADRÃO DE TROLOX UTILIZADA NA ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH.

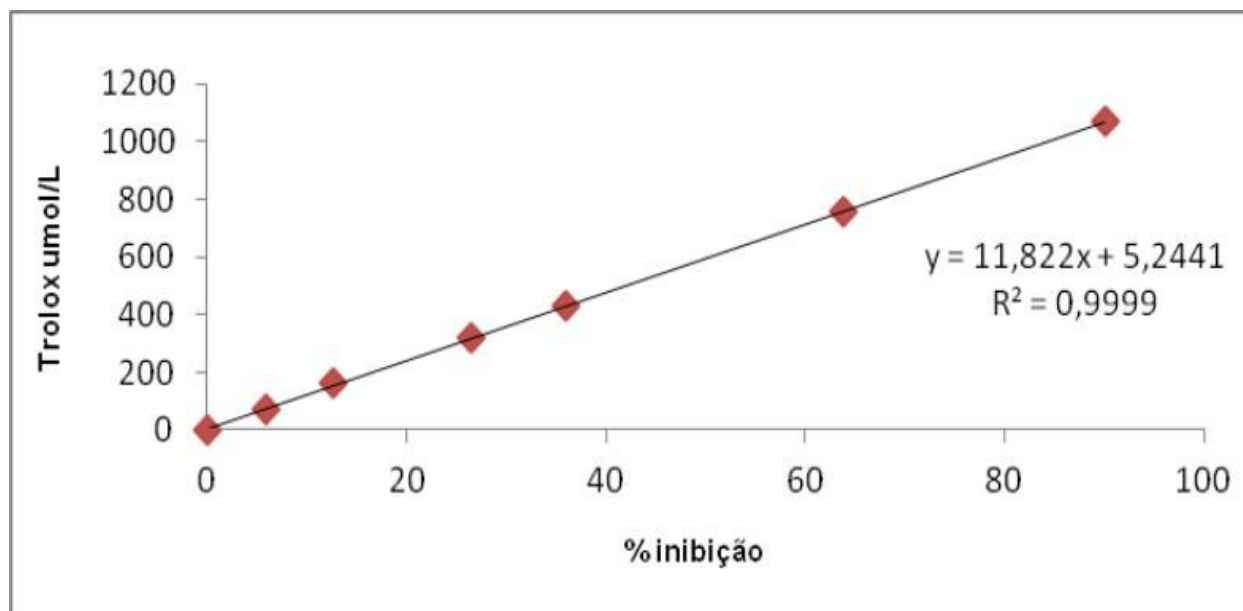




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO – PRPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO – PPGAN

APÊNDICE E

CURVA PADRÃO DE TROLOX UTILIZADA NA ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS.

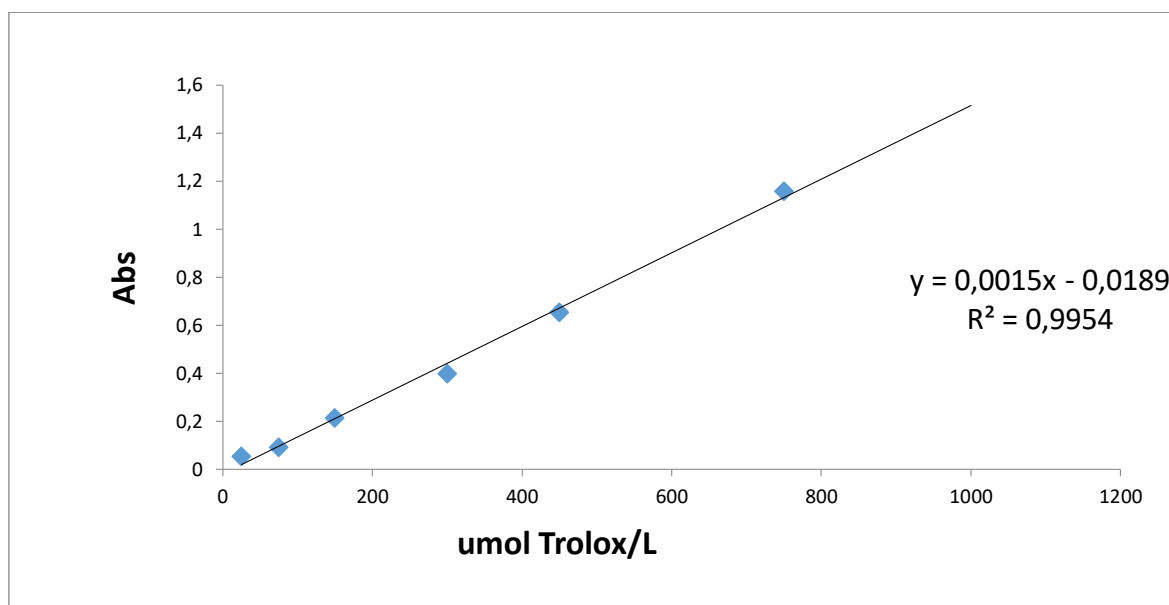




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO – PRPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO – PPGAN

APÊNDICE F

CURVA PADRÃO DE TROLOX UTILIZADA NA ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP.





MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
 PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO – PRPG
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO – PPGAN

APÊNDICE G – OUTRAS PRODUÇÕES PUBLICADAS

EFEITOS DO PROCESSAMENTO NO TEOR DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI.

EFFECTS OF PROCESSING ON THE CONTENT OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN CULTIVARS OF FEIJÃO-CAUPI.

Nara Vanessa dos Anjos Barros

Nutricionista (Universidade Federal do Piauí – UFPI). Professora do Curso de Nutrição (UFPI/CSHNB). Mestre e Doutoranda em Alimentos e Nutrição (PPGAN/UFPI). Pós-graduada em Nutrição Clínica e Funcional (UNIFSA).

Maurisrael de Moura Rocha

Engenheiro Agrônomo (UFPI). Mestre e Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Universidade de São Paulo - USP). Pesquisador A da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA.

Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo

Nutricionista (UFPI). Mestrado em Tecnologia de Alimentos (Universidade Federal do Ceará). Doutora em Ciência de Alimentos (USP). Professora Titular do Departamento de Nutrição da UFPI e do PPGAN/UFPI.

Autor correspondente: Nara Vanessa dos Anjos Barros

Endereço: Quadra 05, Casa 01, Setor – E, Bairro Mocambinho 3, CEP: 64010-380.

Telefone para contato: (86) 9818-04057

e-mail: nara.vanessa@hotmail.com

RESUMO

O feijão-caupi é uma das mais importantes culturas de leguminosas produzidas em regiões tropicais e subtropicais mundiais, que fornece quantidades significativas de energia, nutrientes essenciais e não essenciais. Este pode ser considerado alimento funcional, pois quando consumido regularmente na dieta atua na redução do risco de doenças crônicas ou efeitos de promoção da saúde. O presente artigo realizou uma revisão integrativa da literatura sobre o efeito de diferentes técnicas de processamento no teor de compostos bioativos em cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*). Realizou-se uma busca nas bases de dados *Scopus*, *PubMed*, *Science Direct*, utilizando-se as palavras-chave: polyphenols, cowpea, cooking, germination, fermentation, *Vigna unguiculata*. Os estudos demonstraram que extratos de feijão-caupi têm

quantidades significativas de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante contra radicais livres *in vitro* e *in vivo*, bem como as formas de processamento deste, que incluem a decorticação, cozimento, fermentação e germinação influenciam nos teores e disponibilidade destes compostos.

Palavras-Chave: *Vigna unguiculata*. Efeito antioxidante. Processamento de Alimentos.

ABSTRACT

Cowpea is one of the most important leguminous crops produced in tropical and subtropical regions worldwide, which supplies significant amounts of energy, essential and non-essential nutrients. This can be considered as functional food, because when consumed regularly in the diet acts in reducing the risk of chronic diseases or health promotion effects. The present article carried out an integrative review of the literature on the effect of different processing techniques on the content of bioactive compounds in cowpea (*Vigna unguiculata*) cultivars. We searched the databases Scopus, PubMed, Science Direct, using the following keywords: polyphenols, cowpea, cooking, germination, fermentation, *Vigna unguiculata*. Studies have demonstrated that extracts of cowpea have significant amounts of phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity against free radicals *in vitro* and *in vivo*, as well as the forms of processing of this extract, which include decortication, cooking, fermentation and germination influence the contents and availability of these compounds.

Key words: *Vigna unguiculata*. Antioxidant effect. Food Processing.

INTRODUÇÃO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma das mais importantes leguminosas alimentares e forrageiras nas regiões dos trópicos do semi-árido, que inclui partes da Ásia, África, sul da Europa e dos Estados Unidos, América Central e América do Sul. É considerada verdadeiramente uma cultura multifuncional, tolerante à seca e ao calor, fornecendo alimento para o homem e animais e servindo como uma mercadoria de geração de receita para os agricultores e comerciantes de grãos (LANGYINTUO et al. 2003; TIMKO; SINGH, 2008).

Esta leguminosa também é conhecida por feijão-de-corda, feijão fradinho, feijão-macassar, feijão-de-praia ou feijão-miúdo. Devido a sua rusticidade, exibe reconhecida capacidade de adaptação frente a estresses hídrico, térmico e salino, sendo bastante cultivada por pequenos e médios produtores das regiões Nordeste e Norte do Brasil, representando uma das principais fontes de renda e emprego para a região (FREIRE FILHO et al., 2005; FROTA; SOARES; ARÊAS, 2008).

Dentre as leguminosas, o feijão caracteriza-se por ser um alimento com um bom valor nutritivo e elevados teores de compostos bioativos com significativa atividade antioxidante (SILVA; ROCHA; CANNIATTI BRAZACA, 2009). O feijão contém uma grande diversidade de compostos bioativos como os flavonoides, antocianinas, proantocianidinas e isoflavonas, bem como alguns ácidos fenólicos (CHOUNG et al., 2003).

Os diferentes métodos de processamento das leguminosas levam a alterações na composição de nutrientes, bem como o conteúdo de compostos bioativos. O cozimento do feijão, por exemplo, leva a perda da integridade da estrutura celular, com migração de componentes por lixiviação ocasionando a redução dos constituintes fitoquímicos. Além disso, o tratamento térmico pode promover a degradação térmica, pode haver perdas de nutrientes por ação enzimática ou por fatores não enzimáticos, como luz e oxigênio (VOLDEN et al., 2008; 2009). Os efeitos variam dependendo da cultivar e do tratamento, pois, os estudos têm mostrado

que o cozimento afeta de forma significativa o conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante (determinada por ensaios *in vitro*), com sua respectiva redução (XU; CHANG, 2011).

Em função do exposto, devido à importância do feijão-caupi no hábito alimentar brasileiro, principalmente, nordestino, suas características nutritivas e funcionais, particularmente com relação aos compostos bioativos, e a escassez de dados referentes aos teores desses compostos no feijão-caupi cultivado no Brasil e ao processamento deste, este estudo busca realizar uma revisão integrativa da literatura disponível sobre o efeito de diferentes técnicas de processamento no teor de compostos bioativos em cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*).

METODOLOGIA

Este estudo de abordagem qualitativa revisou a literatura para identificar a produção científica relacionada ao tema entre os anos de 2001 e 2016. A revisão integrativa partiu da seguinte pergunta: Diferentes formas de processamento do feijão-caupi interferem no teor de compostos bioativos?. Para o levantamento dos artigos na literatura, realizou-se uma busca nas seguintes bases de dados: *Scopus*, *PubMed*, *Science Direct*. Foram utilizados, para busca dos artigos, os seguintes descritores e suas combinações com o operador booleano 'AND': polyphenols, cowpea, cooking, germination, fermentation, *Vigna unguiculata*. A busca nas bases de dados ocorreu nos meses de maio e junho de 2016, com uma amostra inicial composta por um total de 729 artigos. Após aplicação dos critérios de inclusão, obtiveram-se 20 artigos científicos.

Os critérios de inclusão definidos para a seleção dos artigos foram: artigos publicados em português, inglês e espanhol; artigos na íntegra que retratassem a temática referente à revisão integrativa e artigos publicados e indexados nos referidos bancos de dados no período de 2001 a 2016. Tomou-se o cuidado em excluir os artigos que se repetiam entre as bases.

Os resumos foram avaliados, e as produções que atenderam os critérios previamente estabelecidos, foram selecionadas para este estudo, e lidas na íntegra. Após a leitura crítica, procedeu-se a análise quanto a síntese dos dados extraídos dos artigos de forma descritiva, possibilitando observar, contar, descrever e classificar os dados, com o intuito de reunir o conhecimento produzido sobre o tema explorado na revisão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De uma forma geral, a maioria dos estudos que avaliam o conteúdo de fenólicos e flavonoides totais tem como foco o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). Apesar da literatura escassa, a presença destes compostos em variedades de feijão-caupi está dependente dos fenótipos revestimento de semente, ou seja, a cor de seus tegumentos (NZARAMBA et al., 2005).

Alguns estudos têm sido realizados para determinar a composição de compostos fenólicos de cultivares de feijão-caupi (CAI; HETTIARACHCHY; JALALUDDIN, 2003; ROCHEFORT; PANOZZO, 2007; GUTIÉRREZ-URIBE; ROMO-LOPEZ; SERNASALDÍVAR, 2011; OJWANG; DIQUES; AWIKA, 2012), que demonstraram que esta leguminosa contém quantidades significativas de compostos fenólicos, incluindo os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos.

Sreerama et al., (2012) afirmam que o uso do feijão-caupi na alimentação ou de sua farinha na composição de alimentos funcionais é limitado devido à presença de certos fitoquímicos com efeitos antinutricionais, que limitam o valor nutritivo desta leguminosa. Assim, diversos métodos de processamento têm sido propostos para melhorar o sabor e

Nutrição em Pauta, v. 27, p. 38-42, 2019.

palatabilidade dos vegetais e também para eliminar e/ou diminuir estes componentes indesejáveis e aumentar a sua qualidade nutricional.

Dentre os métodos de pré-processamento, têm-se a imersão em água (ou maceração) e descasque (decorticação), ao passo que dentre as técnicas de processamento, destacam-se a germinação, fermentação e cozimento, que tendem a modificar a composição e disponibilidade de nutrientes do grão (ADEBOOYE; SINGH, 2007).

De maneira geral, os estudos mostraram que os métodos de processamento de feijões, tais como a maceração e cozimento afetaram de forma significativa o conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante (determinada por ensaios *in vitro*) (XU; CHANG, 2011). A maceração e o cozimento reduzem os fatores antinutricionais, mas também ocorrem perdas no conteúdo nutritivo do alimento como, principalmente vitaminas e minerais (RAMÍREZ-CÁRDENAS; LEONEL; COSTA, 2008), ao passo que os processos de germinação e fermentação tem sido responsáveis pelo aumento do valor sensorial e nutricional de legumes (EGOUNLETY; AWORH, 2003).

Em estudo sobre os efeitos de diferentes técnicas de processamento, como a imersão, descasque, cozimento comum, cozimento em panela de pressão e germinação nos teores de polifenóis do feijão-caupi, relatou que houve reduções significativas nos teores desses compostos, no qual a imersão durante 18 horas resultou em 17,6% por cento de redução. A medida que se aumentava o período de imersão, a extensão da remoção foi maior. O cozimento utilizando panela de pressão teve um efeito maior na perda destes compostos, além do que a germinação dos grãos durante 72 horas, levou a uma redução de 32,5 por cento no conteúdo de polifenóis, maior do que o observado com 24, 48 ou 60 horas (SINHA; KAWATRA, 2003).

Towo e Svanberg (2003) analisaram os efeitos de diferentes formas de processamento (maceração em água a diferentes pHs, decorticação, cozimento e germinação) no conteúdo de compostos fenólicos totais extraíveis de grãos de leguminosas comumente consumidas na Tanzânia, dentre elas o feijão-caupi. Como principais resultados, a imersão em água (maceração) com pH alcalino e ácido reduziu significativamente ($p < 0,05$) o conteúdo de polifenóis totais, bem como a decorticação dos grãos ($p < 0,01$). Contrariamente aos estudos incluídos nessa revisão, a germinação dos grãos reduziu o conteúdo destes compostos para todas as amostras analisadas, com exceção do feijão mungo.

Em estudo para avaliar o perfil de fenólicos de grãos de cultivares de feijão-caupi integrais, descorticados, antes e após a cocção, Adebooye e Singh, (2007) observaram que a decorticação promoveu uma redução significativa ($p < 0,05$) no conteúdo de fenóis totais, bem como o cozimento resultou em perdas destes compostos que variaram de 19 a 37%.

Kalpanadevi e Mohan (2013) avaliaram os efeitos da hidratação, cocção, autoclavagem, germinação e sua combinação na redução / eliminação de compostos bioativos, como os fenólicos em cultivar de feijão-caupi [*Vigna unguiculata*] subsp. *Unguiculata*]. Dentre os processos avaliados, a cocção e autoclavagem dos grãos reduziu drasticamente o teor de fenólicos totais livres e outros fatores antinutricionais, da mesma forma que o processo de germinação por 96 horas também reduziu o conteúdo de tais compostos. A combinação dos processos de germinação seguida pela autoclavagem dos grãos eliminou completamente os fenólicos totais livres, taninos, ácido cianídrico, ácido fítico, inibidores de tripsina e oligossacarídeos.

Ainda segundo estes autores, a redução dos compostos fenólicos obtida em condições de altas temperaturas e pressão pode ser devida às transformações químicas, decomposição dos fenólicos, conversão destes em outros produtos ou a formação de complexos fenólico-proteína insolúveis. As elevadas temperaturas podem promover polimerização e/ou decomposição das estruturas aromáticas, o que dificulta a sua quantificação com o reagente *Folin Ciocalteu*. Além disso, durante a imersão em água, a enzima polifenoloxidase pode ser ativada, resultando na degradação e consequentes perdas destes compostos

Gan et al. (2016) avaliaram o efeito da fermentação por bactérias naturais e lácticas sobre a capacidade antioxidante e o teor de polifenóis em ambos os extratos solúveis e ligados de oito leguminosas comestíveis, incluindo uma variedade de feijão-caupi rajado. Como resultados, os autores observaram que a fermentação promoveu um aumento no conteúdo de compostos fenólicos totais em todas as leguminosas avaliadas, destacando-se na cultivar de feijão-caupi elevados teores de catequinas, o que refletiu-se no aumento da capacidade antioxidante total destas. Este fato poderia estar associado com a biotransformação entre fenólicos solúveis e a liberação de compostos fenólicos ligados induzidas por microrganismos envolvidos no processo de fermentação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da análise dos estudos que compuseram esta revisão, concluiu-se que nas cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) uma maior concentração de compostos fenólicos, dentre eles os flavonoides. A disposição destes compostos é influenciada pelos genótipos dos grãos, no qual observou-se que estes concentram-se nos tegumentos. Além disso, as diferentes formas de processamento influenciam de maneira diferenciada no teor dos compostos bioativos, no qual podem ser observados diminuição ou incremento nos conteúdos destes compostos. Ressalta-se a necessidade de mais estudos que avaliem a biodisponibilidade dos compostos bioativos do feijão-caupi *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ADEBOOYE, O. C.; SINGH, V. Effect of cooking on the profile of phenolics, tannins, phytate, amino acid, fatty acid and mineral nutrients of whole-grains and decorticated vegetable cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *J. Food Quality*, v. 30, n. 6, p. 1101-1120, 2007.
- CAI, R.; HETTIARACHCHY, N. S.; JALALUDDIN, M. High-performance liquid chromatography determination of phenolic constituents in 17 varieties of cowpeas. *J. Agr. Food Chem.* v. 51, n. 6, p. 1623-1627, 2003.
- CHOUNG, M. G. et al. Anthocyanin profile of Korean cultivated kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agr. Food Chem.*, v. 51, n. 24, p. 7040-7043, 2003.
- EGOUNLETY, M.; AWORH, O. C. Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms). *J. Food Eng.*, v. 56, n. 2-3, p. 249-254, 2003.
- FREIRE FILHO, F. R. et al. Melhoramento genético. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). *Feijão-caupi: avanços tecnológicos*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 29-92
- FROTA, K. M. G.; SOARES, R. A. M.; ARÊAS, J. A. G. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS Milênio. *Ciencia Tecnol. Alime*. Campinas, v. 28, n. 2, p. 470-476, 2008.
- GAN, R-Y. Fermentation alters antioxidant capacity and polyphenol distribution in selected edible legumes. *Int. J. Food Sci. Technol.*, v. 51, n. 4, p: 875-884, 2016.
- Nutrição em Pauta*, v. 27, p. 38-42, 2019.

GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; ROMO-LOPEZ, I.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Phenolic composition and mammary cancer cell inhibition of extracts of whole cowpeas (*Vigna unguiculata*) and its anatomical parts. *J. Funct. Foods*, v. 3, p: 290-297, 2001.

KALPANADEV, V.; MOHAN, V. R. Effect of processing on antinutrients and in vitro protein digestibility of the underutilized legume, *Vigna unguiculata* (L.) Walp subsp. *Unguiculata*. *LWT - Food Science and Technology*, v. 51, n. 2, p. 455-461, 2013.

LANGYINTUO, A. S. et al. Cowpea supply and demand in west and central Africa. *Field Crop Res.*, v. 82, n. 2-3, p. 215-231, 2003.

NZARAMBA, M. N., et al. Inheritance of antioxidant activity and its association with seedcoat color in cowpea. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, v. 130, p: 386-391, 2005.

OJWANG, L. O.; DYKES, L.; AWIKA, J. M. Ultra performance liquid chromatography – tandem quadrupole mass spectrometry profiling of anthocyanins and flavonols in cowpea (*Vigna unguiculata*) of varying genotypes. *J. Agr. Food Chem.*, v. 60, n. 4, p. 3735-3744, 2012.

RAMÍREZ-CÁRDENAS, L.; LEONEL, A. J.; COSTA, N. M. B. Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. *Ciencia Tecnol. Alime.*, Campinas, v. 28, n. 1, p. 200-213, 2008.

ROCHFORT, S.; PANOZZO, J. Phytochemicals for health, the role of pulses. *J. Agric. Food Chem.*, v. 55, p: 7981-7994, 2007.

SILVA, A. G.; ROCHA, L. C.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Caracterização físico-química, digestibilidade protéica e atividade antioxidante de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). *Alim. Nutr.*. Araraquara, v. 20, n. 4, p. 591-598, 2009.

SREERAMA, Y. N.; SASHIKALA, V. B.; PRATAPE, V. M. Phenolic compounds in cowpea and horse gram flours in comparison to chickpea flour: Evaluation of their antioxidant and enzyme inhibitory properties associated with hyperglycemia and hypertension. *Food Chem.*, v. 133, n. 1, p. 156-162, 2012.

SINHA R.; KAWATRA, A. Effect of processing on phytic acid and polyphenol contents of cowpeas [*Vigna unguiculata* (L) Walp]. *Plant Foods Hum. Nutr.*, v. 58, n. 3, p. 1-8, 2003.

TIMKO, M.P.; SINGH, B.B. Cowpea, a multifunctional legume. In: MOORE, P.H.; MING, R. (Ed.). *Genomics of tropical crop plants*. New York: Springer, 2008. p.227-258.

TOWO, E. E.; SVANBERG, U.; NDOSSI, G. D. Effect of grain pre-treatment on different extractable phenolic groups in cereals and legumes commonly consumed in Tanzania. *J. Sci. Food Agr.* v. 83, n. 9, p: 980-986, 2003.

VOLDEN, J. et al. Effect of thermal treatment on glucosinolates and antioxidant-related parameters in red cabbage (*Brassica oleracea* L. ssp. *capitata* f. *rubra*). *Food Chem.*, v. 109, n. 3, p. 595-605, 2008.

VOLDEN, J. et al. Processing (blanching, boiling, steaming) effects on the content of glucosinolates and antioxidant-related parameters in cauliflower (*Brassica oleracea* L. ssp. botrytis). *LWT - Food Science and Technology*, v. 42, n. 1, p. 63-73, 2009.

XU, B.; CHANG, S. K. C. Reduction of antiproliferative capacities, cell-based antioxidant capacities and phytochemical contents of common beans and soybeans upon thermal processing. *Food Chem.*, v. 129, n. 3, p. 974-981, 2011.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA – MEC
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
 PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO – PRPG
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO – PPGAN

APÊNDICE H – OUTRAS PRODUÇÕES PUBLICADAS

CONTEÚDO DE BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM CULTIVARES DE FEIJÃO-CAUPI ANTES E APÓS O COZIMENTO

Nara Vanessa dos Anjos Barros, Bruna Barbosa de Abreu, Marcos Antônio da Mota Araújo, Maurisrael de Moura Rocha, Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo

RESUMO

O presente estudo avaliou o teor de compostos bioativos e atividade antioxidante antes e após o cozimento. Foram analisadas duas cultivares melhoradas geneticamente de feijão-caupi: BRS Aracê e BRS Tumucumaque. As análises foram realizadas em triplicata nas cultivares cruas e após o cozimento a vapor em panela de pressão doméstica. Determinaram-se os compostos bioativos, como os compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas e taninos condensados, e a atividade antioxidante. Realizou-se a Análise de Variância e as médias foram comparadas pelos testes *t* de *Student* e *Tukey* ($p < 0,05$). Para os compostos bioativos, a cultivar BRS Tumucumaque apresentou os maiores conteúdos de compostos fenólicos totais antes ($297,23 \text{ mg}/100 \text{ g} \pm 4,24$) e após ($147,15 \text{ mg}/100 \text{ g} \pm 6,94$) o cozimento ($p < 0,05$). Não foi detectada a presença de antocianinas nas cultivares. Para os teores de taninos condensados, verificou-se uma redução significativa nos grãos com o cozimento de 20-81%. Para a atividade antioxidante, após o processamento, observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$). Para ambos os métodos avaliados, destacou-se a cultivar BRS Tumucumaque com os maiores teores para os grãos crus e cozidos. Concluiu-se que após o cozimento, as cultivares mantiveram o conteúdo de compostos fenólicos relevante.

PALAVRAS-CHAVE: *Vigna unguiculata*. Compostos fenólicos. Processamento térmico.

ABSTRACT

The present study evaluated the content of bioactive compounds and antioxidant activity before and after cooking. Two cultivars improved genetically of cowpea were analyzed: BRS Aracê and BRS Tumucumaque. The analyzes were performed in triplicate in the raw cultivars and after steam cooking in a domestic pressure cooker. Bioactive compounds, such as phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins and condensed tannins, and antioxidant activity were determined. The Variance Analysis was performed and the means were compared by the Student *t* and Tukey tests ($p < 0.05$). For the bioactive compounds, the cultivar BRS Tumucumaque presented the highest contents of total phenolic compounds before ($297.23 \text{ mg} / 100 \text{ g} \pm 4.24$) and after ($147.15 \text{ mg} / 100 \text{ g} \pm 6.94$) the cooking ($p < 0.05$). The presence of anthocyanins in the cultivars was not detected. For condensed tannins contents, a significant reduction in the beans with cooking of 20-81% was observed. For the antioxidant activity, after

Ciência dos alimentos. Belo Horizonte - MG: Poisson – 2019.

the processing, a significant reduction ($p < 0.05$) was observed. For both evaluated methods, the cultivar BRS Tumucumaque with the highest levels for the raw and cooked grains was highlighted. It was concluded that after cooking, the cultivars maintained relevant phenolic compounds.

KEY WORDS: *Vigna unguiculata*. Phenolic compounds. Thermal processing.

INTRODUÇÃO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é um dos alimentos e planta forrageira mais importante da região dos trópicos semi-áridos que incluem partes da Ásia, África, sul da Europa e dos Estados Unidos, América Central e do Sul. Os grãos de feijão-caupi possuem compostos bioativos com efeitos benéficos à saúde humana (SOMBIÉ et al., 2018). Dentre estes compostos, destacam-se os polifenóis, que apresentam elevada atividade antioxidante (BARROS et al., 2017; NDERITU et al., 2013).

No feijão-caupi, os compostos fenólicos concentram-se no tegumento dos grãos, conferindo a maior parte da coloração das sementes desta leguminosa. Os principais tipos de polifenóis presentes nas sementes de leguminosas, particularmente no caupi, são os ácidos fenólicos e flavonoides. Além disso, a quantidade de compostos fenólicos e as propriedades funcionais do feijão-caupi variam de acordo com a cultivar em estudo, e o processamento térmico aplicado. Diversos estudos mostraram que o cozimento reduz significativamente os níveis de compostos fenólicos e a atividade antioxidante (avaliada por ensaios *in vitro*) (BARROS et al., 2017; CAVALCANTE et al., 2017; SOMBIÉ et al., 2018).

Assim, o presente estudo visou avaliar o teor de compostos bioativos e atividade antioxidante antes e após o cozimento em cultivares biofortificadas de feijão-caupi.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas duas cultivares melhoradas geneticamente de feijão-caupi: BRS Aracê e BRS Tumucumaque, fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Meio-Norte, localizada em Teresina-Piauí. As amostras dos grãos crus foram trituradas em moinho de facas e peneiradas (30 *mesh*). O feijão-caupi foi cozido em uma proporção feijão: água de 1:3 (p/v) em panela de pressão doméstica de 2 L, durante 13 minutos. Os grãos foram macerados e armazenados em sacos de polietileno ($\pm 8^{\circ}\text{C}$) até o momento das análises.

O conteúdo de fenólicos totais foi determinado de acordo com o método espectrofotométrico, utilizando o reagente *Folin-Ciocalteu* (SINGLETON; ROSSI, 1965), flavonoides totais segundo González-Aguilar et al. (2007) e as antocianinas totais seguindo-se

o método de diferença de pH (GIUSTI; WROLSTAD, 2001). A determinação do teor de taninos condensados baseou-se no método da vanilina, segundo Price; Scoyoc e Butler, (1978). A atividade antioxidante foi determinada pelo método de captura dos radicais ABTS (RE et al., 1999) e FRAP (BENZIE e STRAIN, 1996). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram descritos em tabelas de frequência simples e expressos como média \pm desvio-padrão. Realizou-se a Análise de Variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste *Tukey*, considerando o $p < 0,05$ para todos os testes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de compostos fenólicos, flavonoides e taninos condensados antes e após o cozimento das cultivares de feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L). Walp) analisadas estão demonstrados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Conteúdo de fenólicos totais e flavonoides totais em diferentes cultivares de feijão-caupi biofortificadas, em grãos crus e cozidos.

Cultivares	Fenólicos totais (mg EAG/100 g)		Flavonoides totais (mg EQ/100 g)	
	Grão cru	Grão cozido	Grão cru	Grão cozido
	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP
BRS Aracê	227,98 \pm 4,12 ^a A	126,58 \pm 0,00 ^b A	42,82 \pm 1,01 ^a A	22,45 \pm 1,18 ^b A
BRS Tumucumaque	297,23 \pm 4,24 ^a B	147,15 \pm 6,94 ^b B	49,36 \pm 2,02 ^a B	23,97 \pm 0,67 ^b A

EAG: Equivalentes de Ácido Gálico. EQ: Equivalente de Quercetina. Letras subscritas minúsculas iguais entre os tipos de feijão cru e cozido, não há diferença significativa entre as médias segundo teste t de *Student*. Letras maiúsculas iguais entre os tipos de cultivares, não há diferença significativa entre as médias segundo o teste do one way ANOVA: post Hoc multiple comparisons, utilizou-se o teste de *Tukey* ao nível de 5% $p < 0,05$, IC95%.

Observou-se que a cultivar BRS Tumucumaque apresentou os maiores teores de compostos fenólicos e flavonoides totais, nos grãos crus e cozidos. Resultado diferente do verificado por Barros et al. (2017), o qual ao avaliarem os teores de compostos bioativos das mesmas cultivares, o destaque ficou para a cultivar BRS Aracê.

Não foi identificada a presença de antocianinas totais nas amostras de feijão-caupi antes e depois do cozimento. Observou-se que houve uma redução significativa ($p \leq 0,05$) no conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides totais após o processamento para todas as cultivares avaliadas, conforme estudo similar desenvolvido por Cavalcante et al. (2017), no qual foram avaliadas cinco cultivares da leguminosa utilizando a mesma metodologia do presente estudo.

Tabela 2 - Conteúdo de taninos condensados em diferentes cultivares de feijão-caupi biofortificadas, em grãos crus e cozidos.

Cultivares	Grão cru	Grão cozido	Redução %
	Média ± DP	Média ± DP	
BRS Aracê	4,72 ± 0,00 ^a A	3,75 ± 0,00 ^b A	20,55
BRS Tumucumaque	12,81 ± 0,67 ^a B	2,35 ± 0,00 ^b A	81,66

Resultados expressos em mg/ 100 g. Letras subscritas minúsculas iguais entre os tipos de feijão cru e cozido, não há diferença significativa entre as médias segundo teste t de *Student*. Letras maiúsculas iguais entre os tipos de cultivares, não há diferença significativa entre as médias segundo o teste do one way ANOVA: post Hoc multiple comparisons, utilizou-se o teste de *Tukey* ao nível de 5% $p < 0,05$, IC95%.

Comparando os resultados da presente pesquisa com outros estudos, Sombié et al. (2018) avaliando 31 genótipos de feijão-caupi de Burkina Faso, obtiveram teores menores de compostos fenólicos (63,14 a 190,7 mg EAG/100 g) e flavonoides (7,46 a 23,95 EQ/100 g) que os da presente pesquisa. Para os teores de taninos condensados, verificou-se uma redução significativa nos grãos com o cozimento de 20-81%, conforme tabela 2.

Em relação à atividade antioxidante, para ambos os métodos avaliados, destacou-se a cultivar BRS Tumucumaque para os grãos crus e cozidos (Tabela 3).

Tabela 3 - Atividade antioxidante pelo método ABTS e FRAP em diferentes cultivares de feijão-caupi, em grãos crus e cozidos.

Método	Cultivares	Grão cru	Grão cozido
		Média ± DP	Média ± DP
ABTS	BRS Aracê	799,21 ± 15,71 ^a A	428,88 ± 6,74 ^b A
	BRS Tumucumaque	837,73 ± 15,39 ^a B	528,92 ± 17,83 ^b B
FRAP	BRS Aracê	356,53 ± 7,85 ^a A	162,30 ± 7,85 ^b A
	BRS Tumucumaque	453,10 ± 6,79 ^a B	274,86 ± 2,61 ^b B

Resultados expressos em µmol de Equivalente ao Trolox/100 gramas. Letras subscritas minúsculas iguais entre os tipos de feijão cru e cozido, não há diferença significativa entre as médias segundo teste t de *Student*. Letras maiúsculas iguais entre os tipos de cultivares, não há diferença significativa entre as médias segundo o teste do one way ANOVA: post Hoc multiple comparisons, utilizou-se o teste de *Tukey* ao nível de 5% $p < 0,05$, IC95%.

Após o processamento, observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) na atividade antioxidante. Esta redução pode ter ocorrido devido ao processamento térmico promover a destruição de compostos bioativos levando à redução dos mesmos, e/ou a formação de novos compostos com ação pró-oxidante. Pode-se observar que o método de captura dos radicais ABTS foi o mais eficaz na determinação da atividade antioxidante, pois foram observados os maiores teores tanto no grão cru quanto no cozido, de forma similar ao verificado por Cavalcante et al. (2017).

Considerando os grãos crus, os resultados obtidos no presente estudo para o ensaio FRAP foram maiores que os verificados no estudo de Sombié et al. (2018), que variaram de 25,51 a 311,46 mg EQ/100 g. Além disso, estes resultados foram superiores aos obtidos no estudo de Chaieb et al. (2011), ao analisarem a capacidade antioxidante *in vitro* de treze genótipos de feijão do tipo fava (*Vicia faba* L.).

CONCLUSÕES

Concluiu-se que após o cozimento, as cultivares mantiveram um conteúdo de compostos fenólicos relevante com destaque para a cultivar BRS Tumucumaque para os teores de compostos bioativos e atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS

- BARROS, N. V. A. et al. Effect of cooking on the bioactive compounds and antioxidant activity in grains cowpea cultivars. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 5 (Especial), p. 824-831, 2017.
- BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. A capacidade de redução férrica do plasma (FRAP) como uma medida do poder antioxidante: o ensaio FRAP. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.
- CAVALCANTE, R. B. M. et al. Effect of thermal processing on chemical compositions, bioactive compounds, and antioxidant activities of cowpea cultivars. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 4, p. 1050 – 1058, 2017.
- CHAIEB, et al. Polyphenols content and antioxidant capacity of thirteen faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes cultivated in Tunisia. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 970–977, 2011.
- GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. In: R. E. Wrolstad (Ed.), Anthocyanins: Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York: J. Wiley, & Sons, p.1-13, 2001.
- GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. et al. Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. **Journal of Food Science**, v. 72, s197–s202, 2007.
- NDERITU, A. M. et al. Phenolic composition and inhibitory effect against oxidative DNA damage of cooked cowpeas as affected by simulated in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1763–1771, 2013.

PRICE, M. L.; SCOYOC, S. V.; BUTLER, L. G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 1214-1218, 1978.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABST radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231- 1237, 1999.

SINGLETON, V. I.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid agents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SOMBIÉ, P. A. E. D. et al. Antioxidant and Phytochemical Studies of 31 Cowpeas (*Vigna unguiculata* (L. Walp.)) Genotypes from Burkina Faso. **Foods**, v. 7, n. 143, p. 1-9