



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS

Tuany Camila Honaiser

Comparação de perfil proteico de grãos de quatro cultivares de Feijão-Caupi (*Vigna unguiculata*) e avaliação de sinergismo e bioacessibilidade fenólica durante codigestão *in vitro* com suco de laranja (*Citrus sinensis*)

FLORIANÓPOLIS

2022

Tuany Camila Honaiser

Comparação de perfil proteico de grãos de quatro cultivares de Feijão-Caupi e avaliação de sinergismo e bioacessibilidade fenólica durante codigestão *in vitro* com suco de laranja

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutora em Ciências dos Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi

FLORIANÓPOLIS

2022

Ficha de identificação da obra

Honaiser, Tuany Camila

Comparação de perfil proteico de grãos de quatro cultivares de Feijão-Caupi (*Vigna unguiculata*) e avaliação de sinergismo e bioacessibilidade fenólica durante codigestão in vitro com suco de laranja (*Citrus sinensis*) / Tuany Camila Honaiser ; orientador, Ana Carolina Maisonnave Arisi, 2022.

96 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Proteínas. 3. Feijão caupi. 4. Compostos bioativos. 5. Bioacessibilidade. I. Arisi, Ana Carolina Maisonnave . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Tuany Camila Honaiser

Comparação de perfil proteico de grãos de quatro cultivares de Feijão-Caupi (*Vigna unguiculata*) e avaliação de sinergismo e bioacessibilidade fenólica durante codigestão *in vitro* com suco de laranja (*Citrus sinensis*)

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Thais de Souza Rocha, Dra.

Universidade Estadual de Londrina

Profa. Rosete Pescador, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Renata Dias de Mello Castanho Amboni, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Ciência dos alimentos.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profa. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi

Orientadora

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Haide e Osmar Honaiser, pela vida, pelo amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, pelas oportunidades e por nunca me desamparar.

Ao meu pai Osmar e minha mãe Haide, pela vida, por todo amor, dedicação, esforços e incentivo. Sou grata e honrada pela nossa família.

À minha irmã, Natani, que me ampara e incentiva. Por todo o amor e parceria.

À minha orientadora, Prof^a Dra Ana Carolina Maisonnave Arisi pela oportunidade de aprendizado e por me orientar. Agradeço a confiança em meu trabalho e aos ensinamentos.

À Prof^a Dra Isabela Maia Toaldo Fedrigo pela parceria, ensinamentos e orientações. Sempre disponível e amorosa.

Ao grupo do laboratório de Biologia Molecular, Gabriela, Franciele, Ana Marina, Mirella, Lorena, Lúcia, Elisandra pela amizade, alegrias e angústias compartilhadas.

À querida e dedicada Gabriela Barbosa Rossi, por me ensinar tanto com tamanho amor e dedicação.

Ao Mike, pelo amor e carinho. Por me ouvir, me acalmar, me incentivar.

À Dinda Adelaide e Tia Zenaide, que sempre me incentivam e inspiram.

Às minhas amigas do IFSC, Roberta, Keli, Fernanda, minhas inspirações, profissionais incríveis, grandes incentivadoras e leitoras da tese.

À minha colega Stefany, também do IFSC, sempre muito gentil e disponível. Sua ajuda foi fundamental nos últimos meses. Mais uma das minhas inspirações.

Às minhas primas e amigas Veri, Bruna, Suelen, Ruty, Karine, Amanda e Maira por despertarem o meu melhor sempre.

Às amigas da graduação para a vida, Gabrielle, Natália, Júlia, Suelen, Bárbara, Talita, Luana, Karolina, mesmo longe sempre presentes. Vibrando pelas vitórias, compartilhando as angústias e incentivando sempre.

A todos os professores da Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pelos ensinamentos transmitidos.

A todos os funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos por todo o auxílio prestado.

Ao Dr. Maurisrael de Moura Rocha pela disponibilidade e atenção, além da doação dos feijões-caupi.

À Profa. Dra. Thais de Souza Rocha por ter aceito o convite para ser a Relatora da Tese e pelas importantes contribuições feitas.

Aos membros da banca pela disponibilidade e todas as valiosas contribuições realizadas.

Ao Instituto Federal de Santa Catarina.

À Universidade Federal de Santa Catarina.

RESUMO

Desafios, como a promoção da biodiversidade e o aumento da oferta de alimentos para diversidade dietética, tornam o feijão-caupi uma alternativa relevante à área das ciências agrárias e ciência dos alimentos. O feijão-caupi é uma leguminosa de destaque no continente Africano e regiões Norte e Nordeste do Brasil, principalmente pelo alto teor de proteína presente no grão, bem como baixo custo e resiliência ao estresse hídrico. O nosso principal objetivo foi estabelecer uma metodologia de extração de proteínas, comparar o perfil proteico de grãos de quatro cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), BRS Aracê, BRS Itaim, BRS Pajeú e BRS Xiquexique por meio da técnica de eletroforese bidimensional (2-DE), bem como identificar atividade antioxidante sinérgica deste ao ser consumido com suco de laranja pera (*Citrus sinensis*). Para isso, a eletroforese bidimensional foi utilizada para separação e comparação das proteínas. Para avaliação de sinergia, 20 compostos fenólicos foram identificados em amostras por CLAE-DAD antes e após a digestão *in vitro*, além da determinação de compostos fenólicos totais, e atividade antioxidante pelos métodos ABTS e FRAP. A eletroforese bidimensional foi eficiente na separação das proteínas, os perfis de proteoma de grãos de quatro cultivares de feijão-caupi foram comparados, em que foi observada alta correlação entre a mesma espécie. Além disso, a análise de componentes principais indicou que há diferença na abundância de proteínas entre as cultivares, as cultivares BRS Aracê e BRS Xiquexique, ambas biofortificadas com ferro e zinco foram agrupadas, separadas das cultivares BRS Itaim e BRS Pajeú. Na codigestão de feijão-caupi cozido e suco de laranja, ácido gálico, (-)-epicatequina e ácido clorogênico foram os polifenóis mais bioacessíveis. O cozimento do feijão-caupi e a extração dos compostos com solvente afetaram as concentrações de polifenóis. Após a digestão, os índices de bioacessibilidade foram maiores para o feijão-caupi (136,11%) e feijão-caupi cozido (744,74%) quando comparados ao suco de laranja (31,87%), indicando que o tratamento térmico melhorou a bioacessibilidade dos fenólicos do feijão-caupi. A capacidade antioxidante variou bastante, mas foi maior na fase intestinal para o feijão-caupi cozido e amostra de codigestão, e interações sinérgicas polifenol-polifenol ou polifenol-proteína podem ter contribuído para esse efeito, particularmente, nessas amostras. A combinação de suco de laranja com feijão-caupi cozido digerido simultaneamente promoveu maior teor de alguns fenólicos bioacessíveis do que essas amostras isoladas. Este estudo demonstra como melhorar a qualidade de géis de 2-DE de grãos de feijão-caupi, e que perfis 2-DE podem ser usados para discriminar variedades de feijão-caupi. Além disso, este foi o primeiro estudo referente a codigestão de feijão-caupi e suco de laranja, e demonstrou o aumento de fenólicos com propriedades antioxidantes provenientes de interações entre polifenóis bioacessíveis de um suco de frutas e feijão na fase final da simulação gastrointestinal, fornecendo base científica para aplicação de codigestão em estudos futuros relacionados à saúde.

Palavras-chave: Eletroforese bidimensional. Compostos fenólicos. Capacidade antioxidante. Proteínas. Leguminosas.

ABSTRACT

Challenges, such as promoting biodiversity and increasing the food supply for dietary diversity, become cowpea a relevant alternative in the field of agricultural science and food science. Cowpea is a prominent legume in the African continent and in the North and Northeast regions of Brazil, mainly due to the high protein content present in the grain, as well as its low cost and resilience to water stress. We aimed to establish a protein extraction methodology, to compare the protein profile of four cowpea (*Vigna unguiculata*) cultivars, BRS Aracê, BRS Itaim, BRS Pajeú and BRS Xiquexique by two-dimensional electrophoresis (2-DE), as well as identifying its synergistic antioxidant activity when consumed with orange juice (*Citrus sinensis*). For this, two-dimensional electrophoresis was used to separate and compare the proteins. For synergy evaluation, 20 phenolic compounds were identified in samples by HPLC-DAD before and after *in vitro* digestion, in addition to the determination of total phenolic compounds, and antioxidant activity by ABTS and FRAP methods. Two-dimensional electrophoresis was efficient in separating the proteins, the proteome profiles of four cowpea cultivars were compared, in which a high correlation was observed between the same species, even with different cultivars. In addition, the principal component analysis indicated that there is a difference in protein abundance between the cultivars, the BRS Aracê and BRS Xiquexique cultivars, both biofortified in iron and zinc, were grouped, separated from the BRS Itaim and BRS Pajeú cultivars. In co-digestion of cooked cowpea and orange juice, gallic acid, (-)-epicatechin and chlorogenic acid were the most bioaccessible polyphenols. Cooking and solvent extraction of cowpea affected their polyphenolic concentration. After digestion, the bioaccessibility indexes (BI) were increasing for cowpea (136.11%) and cooked cowpea (744.74%) when compared to orange juice (31.87%), indicating that heat treatment improved the bioaccessibility of cowpea phenolics. Antioxidant capacity varied widely but was higher in the intestinal phase for the cooked cowpea and co-digestion sample, and synergistic polyphenol-polyphenol or polyphenol-protein interactions may have contributed to this effect, particularly in these samples. The combination of orange juice with cooked cowpea simultaneously digested promoted higher content of some bioaccessible phenolics than these isolated samples. This study demonstrates how to improve the quality of 2-DE gels from cowpea beans, and that 2-DE profiles can be used to discriminate cowpea varieties. Furthermore, this was the first study concerning the co-digestion of cowpea and orange juice. The increase of phenolics with antioxidant properties coming from interactions between bioaccessible polyphenols from a fruit juice and beans at the end-phase of gastrointestinal simulation provided scientific basis for co-digestion application in health-related future studies.

Keywords: Two-dimensional electrophoresis. Phenolic compounds. Antioxidant capacity. Protein. Legumes.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1 – Revisão bibliográfica

- Figura 1 - Planta de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), cultivar BRS Aracê. Planta com 65 dias, 07 dias antes da colheita. Coordenadas geográficas 27°34'54.8"S 48°30'15.6"O.....23
- Figura 2 - Grãos de quatro cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) classificadas pela Embrapa Meio-Norte.....25
- Figura 3 - Representação gráfica de eletroforese bidimensional (2-DE)30

Capítulo 2 – Comparação de perfil proteico de grãos de cultivares brasileiras de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) por meio de análise de componentes principais

- Figura 1 – Resumo dos protocolos de extração de proteínas.....41
- Figura 2 - Mapas comparativos do perfil proteico de grãos de duas cultivares brasileiras de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*)43
- Figura 3 - Destaques dos efeitos de limpeza em mapas comparativos do perfil proteico de grãos de duas cultivares brasileiras de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*)44
- Figura 4 - Mapas representativos do perfil proteico de grãos de quatro cultivares brasileiras de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*)45
- Figura 5 - Gráfico de PCA de 297 spots correspondentes em 12 géis 2DE de grãos de 04 cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*): (A) Aracê, (P) Pajeú, (X) Xiquexique e (I) Itaim. Números 1, 2 e 3 referem-se as triplicatas dos géis de cada cultivar48

Capítulo 3 – Sinergismo e bioacessibilidade fenólica durante a codigestão *in vitro* de feijão-caupi cozido com suco de laranja

- Figura 1 - Cromatograma CLAE-DAD representativo de suco de laranja não digerido (A), feijão-caupi cozido não digerido (B), amostra de codigestão não digerida (FZ+SL) (C) e amostra de codigestão no final da fase intestinal (D).....63

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 – Revisão bibliográfica

Tabela 1 - Classificação de feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i>) quanto a cor do tegumento.....	24
Tabela 2 – Composição nutricional de cultivares de feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i>).	26
Tabela 3 - Compostos fenólicos e atividade antioxidante de diferentes cultivares de feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i>).....	32

Capítulo 2 – Comparação de perfil proteico de grãos de cultivares brasileiras de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) por meio de análise de componentes principais

Tabela 1 - Dados de número de spots detectados e correspondência de spots em géis de 2-DE de quatro cultivares de feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i>). Em negrito, os géis referência (com maior número de spots) em cada categoria de correspondência	47
--	----

Capítulo 3 – Sinergismo e bioacessibilidade fenólica durante codigestão *in vitro* de feijão-caupi cozido com suco de laranja.

Tabela 1 - Caracterização físico-química de suco de laranja.	58
Tabela 2 - Teor fenólico total (mg GAE/100mL ou g) e capacidade antioxidante de suco de laranja, feijão-caupi cru, feijão-caupi cozido e feijão-caupi cozido + suco de laranja antes e após cada fase da digestão <i>in vitro</i>	60
Tabela 3 - Composição fenólica do feijão-caupi antes e após o cozimento extraído por solventes aquosos e metanólicos acidificados.	65
Tabela 4 - Composição fenólica de suco de laranja, feijão-caupi cozido e combinação feijão-caupi + suco de laranja antes e após diferentes fases da digestão <i>in vitro</i>	68
Tabela 5 - Sinergismo calculado pela diferença e pela porcentagem dos valores médios de atividade antioxidante, conteúdo fenólico total (CFT) e compostos fenólicos individuais para avaliar sinergismo da codigestão de feijão-caupi cozido e suco de laranja em diferentes fases da digestão <i>in vitro</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
ATT	Acidez total titulável
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês, <i>Bovine serum albumin</i>)
CA	Capacidade antioxidante
CFT	Compostos fenólicos totais
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilamônio]-propano- sulfonato (do inglês, 3-[(3- <i>Cholamidopropyl</i>) <i>dimethylammonio</i>]-1- <i>Propanesulfo-nate</i>)
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CV	Coefficiente de variação
2-DE	Eletofórese Bidimensional (do inglês, <i>Two-dimensional gel electrophoresis</i>)
DAD	Detector com arranjo de diodo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético (do inglês, <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESI	Ionização por eletrospray (do inglês, <i>Electrospray ionisation</i>)
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (do inglês, <i>Food and agriculture organization of the United Nations</i>)
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América (do inglês, <i>Food and drug administration</i>)
FG	Fase gástrica
FI	Fase intestinal
FO	Fase oral
FRAP	Poder de redução do íon férrico (do inglês, <i>Ferric reducing antioxidant power</i>)
GAE	Equivalente de ácido gálico (do inglês, <i>Gallic acid equivalent</i>)
GM	Geneticamente modificado
IB	Índice de bioacessibilidade
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEF	Focalização Isoelétrica (do inglês, <i>Isoelectric focusing</i>)

IPG	Gel de pH imobilizado (do inglês, <i>Immobilized pH gradient gels</i>)
LSPA	Levantamento Sistemático da Produção Agrícola
PCA	Análise de componentes principais (do inglês, <i>Principal component analysis</i>)
pI	Ponto isoelétrico
PMSF	Fluoreto de fenil metil sulfonil (do inglês, <i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</i>)
r	Coefficiente de correlação de Pearson
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>Dodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (do inglês, <i>Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SST	Sólidos solúveis totais
TCA	Ácido tricloroacético (do inglês, <i>Trichloroacetic acid</i>)
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.2 OBJETIVOS	18
1.2.1 Objetivo geral	18
1.2.2 Objetivos específicos	18
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1 DIVERSIDADE ALIMENTAR E PROTEÍNAS ALTERNATIVAS	21
2 FEIJÃO-CAUPI	21
2.1 PRODUÇÃO NO BRASIL E NO MUNDO	22
2.2 CLASSIFICAÇÃO	22
2.3 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	25
3 PROTEÍNAS	27
3.1 ANÁLISE PROTEÔMICA	28
3.2 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL	29
3.2.1 Extração de proteínas	30
4 COMPOSTOS BIOATIVOS	31
4.1 COMPOSTOS BIOATIVOS DO FEIJÃO-CAUPI	32
5 BIOACESSIBILIDADE e DIGESTÃO <i>IN VITRO</i>	33
5.1 SINERGISMO ENTRE ALIMENTOS	34
CAPÍTULO 2	37
Comparação do perfil proteico de grãos de cultivares brasileiras de feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i>) por PCA	37
1 INTRODUÇÃO	38
2 MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1 MATERIAL VEGETAL	39
2.2 PRIMEIRO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	40
2.3 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA MODIFICADO	40
2.4 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2-DE).....	41
2.5 ANÁLISE DE IMAGEM E DADOS	42
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1 COMPARAÇÃO DO PERFIL PROTEICO	44
4 CONCLUSÕES	49
CAPÍTULO 3	50

Sinergismo e bioacessibilidade fenólica durante a codigestão <i>in vitro</i> de feijão-caupi cozido com suco de laranja	50
Resumo	51
1 INTRODUÇÃO	51
2 MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1 REAGENTES	53
2.2 AMOSTRAS	53
2.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	53
2.4 CARACTERIZAÇÃO DO SUCO DE LARANJA.....	54
2.5 DIGESTÃO <i>IN VITRO</i>	54
2.6 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL	55
2.7 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	55
2.8 ÍNDICE DE BIOACESSIBILIDADE.....	56
2.9 AVALIAÇÃO DE SINERGISMO.....	56
2.10 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLAE.....	56
2.11 ESTATÍSTICA.....	57
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUCO DE LARANJA.....	57
3.2 CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	58
3.3 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS INDIVIDUAIS	62
3.3.1 Efeitos da extração e cozimento na composição fenólica	65
3.3.2 Efeitos da digestão <i>in vitro</i> na composição fenólica	66
3.4 SINERGISMO.....	70
4 CONCLUSÕES.....	73
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
REFERÊNCIAS	75
ANEXO 1 – Artigo publicado.....	92
ANEXO 2 – Artigo publicado.....	93
ANEXO 3 – Certificado de apresentação oral em evento (V Congresso Nacional do Feijão-Caupi).	94
ANEXO 4 – Certificado de apresentação em evento (III Workshop de Compostos Bioativos e Qualidade de Alimentos).	95
ANEXO 5 – Certificado de apresentação em evento (I Simpósio do Campo a Mesa).	96

1 INTRODUÇÃO

Um dos desafios para a tríade indústria, academia e governo, em função do crescimento populacional, bem como pelo incremento de dietas específicas ou restritivas, é o fornecimento de alimentos de qualidade nutricional e sensorial, saudáveis, atraentes tanto na aparência quanto por sua composição, disponíveis e diversificados, e que causem o mínimo de impactos ambientais durante sua produção e consumo.

Estimativas da FAO (2017) sobre o aumento populacional até o ano de 2050, e a consequente ampliação da demanda por alimentos, refletem a necessidade de incrementar a produção e oferta de alimentos em até 70%. Entretanto a produção de alimentos, inclusive a pecuária promove grandes impactos ambientais, como a emissão de gases de efeito estufa (NIJDAM; ROOD; WESTHOEK, 2012). Dados estes discutidos no Relatório Especial do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC) (IPCC, 2018) que destaca a necessidade de limitar o aquecimento global. Assim, como forma de reduzir os impactos ao ambiente, ocasionados pela produção de alimentos, e ampliar a diversidade dietética como recomendam os Guias Alimentares sugere-se a substituição de proteínas animais por proteínas vegetais (RÖÖS *et al.*, 2017).

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) compõe a cesta básica da população Africana, bem como das populações rurais e urbanas das regiões Norte e Nordeste do Brasil. É uma leguminosa rica em proteínas (23% a 30%), fibras (19% a 35%) e em outros nutrientes essenciais, como vitaminas do complexo B, que pode ser consumido em diferentes formas, vagens verdes e grãos secos e na forma de farinha é a base de alimentos populares, como o acarajé (FILHO *et al.*, 2011).

Tendo em vista o alto teor de proteínas presente no feijão-caupi, o incentivo de seu consumo pode ser associado à fonte proteica de baixo custo, quando relacionado com o custo de proteína animal ou outras fontes vegetais como o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), por exemplo; fonte proteica alternativa para populações vegetarianas e/ou veganas; além de ampliar as opções de alimentos para contribuir com a diversidade dietética.

As proteínas, compostos presentes em alimentos de origem vegetal e animal, fornecem os aminoácidos, importantes em inúmeras funções bioquímicas e fisiológicas do organismo humano (BRASIL, 2008; INSTITUTE OF MEDICINE, 2006). As plantas podem expressar diferentes proteínas em diferentes proporções como respostas a fatores bióticos e abióticos (calor ou frio excessivo, presença de metais ou salinidade no solo, ataque de insetos ou patógenos). No que se refere às plantas destinadas a alimentação, as proteínas são relevantes

quanto à segurança do alimento, pois podem estar envolvidas ou resultarem na síntese de toxinas, antinutrientes ou alérgenos (D'ALESSANDRO; ZOLLA, 2012).

A análise proteômica visa a determinação da estrutura e função das proteínas, além da quantificação de sua abundância, o estudo de suas modificações, as interações entre elas bem como sua localização na matriz avaliada (ORTEA; O'CONNOR; MAQUET, 2016). Avaliações proteômicas em grãos de leguminosas têm contribuído para aprimoramentos tanto no campo agrônomo quanto para qualidade alimentar (KRISHNAN *et al.*, 2017; LABUSCHAGNE, 2018; ROSSI *et al.*, 2017), entretanto o conjunto de proteínas (proteoma) dos grãos de feijão-caupi foi avaliado em poucos estudos (GUPTA *et al.*, 2010; ZANGH e LI, 2015), e poucos métodos foram otimizados para extração de suas proteínas para análise por eletroforese bidimensional (VASCONCELOS *et al.*, 2005).

A preparação da amostra e a extração de proteínas são passos importantes para garantir a eficiência e robustez da técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) amplamente utilizada para separação proteica (JORRIN-NOVO *et al.*, 2019; RABILLOUD; LELONG, 2011). Amostras de plantas apresentam alguns compostos interferentes, como fenólicos, pigmentos, sais, lipídios, polissacarídeos, ácidos nucleicos e outros, que podem interferir nas etapas subsequentes de identificação e quantificação de proteínas. Além de remover esses interferentes, a etapa de extração deve favorecer a interrupção das interações moleculares, promovendo a desnaturação, redução e solubilização das proteínas, garantindo a separação precisa dos polipeptídeos (GÖRG; WEISS; DUNN, 2004; VÂLCU; SCHLINK, 2006; WU; GONG; WANG, 2014).

Além das proteínas, o feijão-caupi também é composto por metabólitos secundários como os compostos fenólicos, que desempenham papéis fisiológicos e metabólicos importantes como a atividade antioxidante e prevenção de doenças (SINGH *et al.*, 2017b). Contudo, tão importante quanto estudar os efeitos destas substâncias é a compreensão do comportamento destas no organismo após a digestão. Assim, o estudo da bioacessibilidade nos permite avaliar a fração dos nutrientes que permanece disponível do intestino após a digestão, podendo tornar-se biodisponível.

A ingestão de alimentos e bebidas conjuntamente durante as refeições é hábito corriqueiro para parcela da população (CARMO; DANTAS; RIBEIRO, 2014), e estudos referentes à ação sinérgica entre esses alimentos são comuns (BROWN *et al.*, 2004; NAIR *et al.*, 2013; NAIR; AUGUSTINE, 2018), haja visto que a ação conjunta pode influenciar de forma positiva a bioacessibilidade e a biodisponibilidade de nutrientes e compostos bioativos. De acordo com a Pesquisa de orçamentos familiares (IBGE, 2011), a laranja é uma das frutas

mais consumidas no Brasil, tanto *in natura* quanto em forma de suco, além disso, é reconhecida pela alta atividade antioxidante (QUAN *et al.*, 2018).

Contudo, inexitem estudos referentes à ação sinérgica dos compostos fenólicos relacionados com a atividade antioxidante e o consumo de suco de laranja juntamente com feijão-caupi, especialmente durante e após a digestão gastrointestinal, o que torna uma lacuna relevante aos possíveis efeitos benéficos para a saúde.

Assim, o presente trabalho teve como objetivos: comparar o perfil proteico de grãos de quatro cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) por meio da técnica de eletroforese bidimensional e identificar ação sinérgica entre os compostos fenólicos relacionados à atividade antioxidante deste ao ser consumido com suco de laranja.

No Capítulo I, é exposto o referencial teórico com os principais temas utilizados para a realização desse estudo. O Capítulo II contempla o artigo intitulado: Comparação de perfil proteico de grãos de cultivares brasileiras de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) por meio de análise de componentes principais, publicado na revista *Food Production, Processing and Nutrition*. E no Capítulo III apresenta o artigo intitulado: Sinergismo e bioacessibilidade fenólica durante a codigestão *in vitro* de feijão-caupi cozido com suco de laranja, publicado na revista *International Journal of Food Science and Technology*. Posteriormente, são apresentadas as considerações finais sobre os resultados obtidos nos capítulos II e III e possíveis perspectivas para estudos futuros.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Caracterizar uma opção proteica vegetal, feijão-caupi, quanto ao perfil proteico e a bioacessibilidade de compostos fenólicos.

1.2.2 Objetivos específicos

- Otimizar um protocolo para extração de proteínas de grãos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*).
- Comparar o perfil proteico de grãos de quatro cultivares de feijão-caupi, BRS Aracê, BRS Itaim, BRS Pajeú e BRS Xiquexique por meio da técnica de eletroforese bidimensional.

- Avaliar a influência do cozimento na bioacessibilidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante do feijão-caupi cozido.

- Identificar ação sinérgica entre os compostos fenólicos relacionados à atividade antioxidante de feijão-caupi consumido com suco de laranja durante a digestão *in vitro*.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 DIVERSIDADE ALIMENTAR E PROTEÍNAS ALTERNATIVAS

As plantas constituem a alimentação humana há milhares de anos, e esse consumo sofre efeito cultural, haja visto que o uso das plantas na alimentação é orientado pelas necessidades práticas e preferências da população (SANTOS JR, 2013).

Alimentar populações em crescimento com demandas crescentes por alimentos de qualidade, saudáveis e atraentes é um grande desafio para a humanidade. O Guia Alimentar da População Brasileira ressalta a importância da diversidade dietética como um dos preceitos base para uma alimentação saudável, e pressupõe que nenhum alimento específico ou grupo deles, isoladamente, é suficiente para fornecer todos os nutrientes necessários a uma nutrição adequada e consequente manutenção da saúde (BRASIL, 2008, 2014).

Arimond e Ruel (2004) observaram que existe uma associação entre a diversidade alimentar da criança e seu estado nutricional independente de fatores socioeconômicos, e sugerem que a diversidade alimentar pode refletir a qualidade da dieta. Desta forma, o incentivo do consumo de proteínas vegetais na alimentação pode contribuir com o aumento da diversidade do aporte de nutrientes. Além de contribuir com o alcance de um dos objetivos para o desenvolvimento sustentável até 2030 proposto pela ONU, de acabar com a fome, promover nutrição e segurança alimentar com agricultura sustentável (ONU, 2015).

Nesse contexto de incentivo a pesquisa e ao consumo de proteínas alternativas, o Plano nacional para o desenvolvimento da cadeia produtiva do feijão e outras leguminosas elaborado pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) apresenta dentre seus objetivos incrementar as pesquisas e estudos para utilização da farinha de feijão-caupi e derivados na elaboração de pães, biscoitos, bolos etc., bem como em formulações para a alimentação animal (MAPA, 2018).

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) é componente alimentar básico das populações rurais e urbanas das regiões Norte e Nordeste do Brasil (FILHO *et al.*, 2011). E de acordo com Rocha (2009), a comercialização é realizada principalmente na forma de grãos secos a granel ou na forma de pacote, grãos verdes ou em forma de farinha para acarajé.

2 FEIJÃO-CAUPI

Feijão-caupi, da espécie *Vigna unguiculata*, também é conhecido como feijão de corda, macassar, feijão de praia, feijão fradinho ou ainda feijão miúdo nas diversas regiões do Brasil,

principalmente na região Nordeste, onde se apresenta como um dos principais componentes da dieta. Além disso, pode ser encontrado como *Cowpea* ou *Blackeyedpea* em outros países (FREIRE FILHO; CARDOSO; ARAÚJO, 1983).

De acordo com Freire Filho (1988) o feijão-caupi é de origem africana, sendo introduzido no Brasil pelos colonizadores portugueses, em meados do século XVI, inicialmente na Bahia.

2.1 PRODUÇÃO NO BRASIL E NO MUNDO

O principal produtor mundial de feijão-caupi é o continente africano, com produção de 6,9 milhões de toneladas no ano de 2020, correspondendo a 96% da produção mundial. Segundo a FAO, os cinco maiores produtores de feijão-caupi são Nigéria (3,6 milhões de toneladas), Níger (2,6 milhões de toneladas), Burkina Faso (666 mil toneladas), Quênia (264 mil toneladas) e Senegal (253 mil toneladas) (FAOSTAT, 2020). O Brasil não consta nas estimativas de produção de feijão-caupi da FAO. Como já descrito, os dados são publicados juntos aos do feijão comum. Portanto, considerando dados da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) de 2022, o Brasil situa-se como terceiro maior produtor mundial com 669 mil toneladas produzidas na safra 2021/22. Comparando estes dados com a produção brasileira de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), que foi de 3.136 mil toneladas na safra 2021/22, a produção de caupi corresponde a 21% do total de feijão produzido no país (CONAB, 2022).

No Brasil, a região Nordeste é a maior produtora e consumidora de feijão-caupi, com destaque para os estados Ceará (113 mil toneladas produzidas), Bahia (116 mil toneladas) e Piauí (84 mil toneladas), a região Centro-oeste apresenta-se em expansão na produção do caupi com 132 mil toneladas na safra 2021/22 (CONAB, 2022). No Brasil são realizadas três safras ao ano, sendo que a maior produção ocorre na segunda safra (CONAB, 2019).

2.2 CLASSIFICAÇÃO

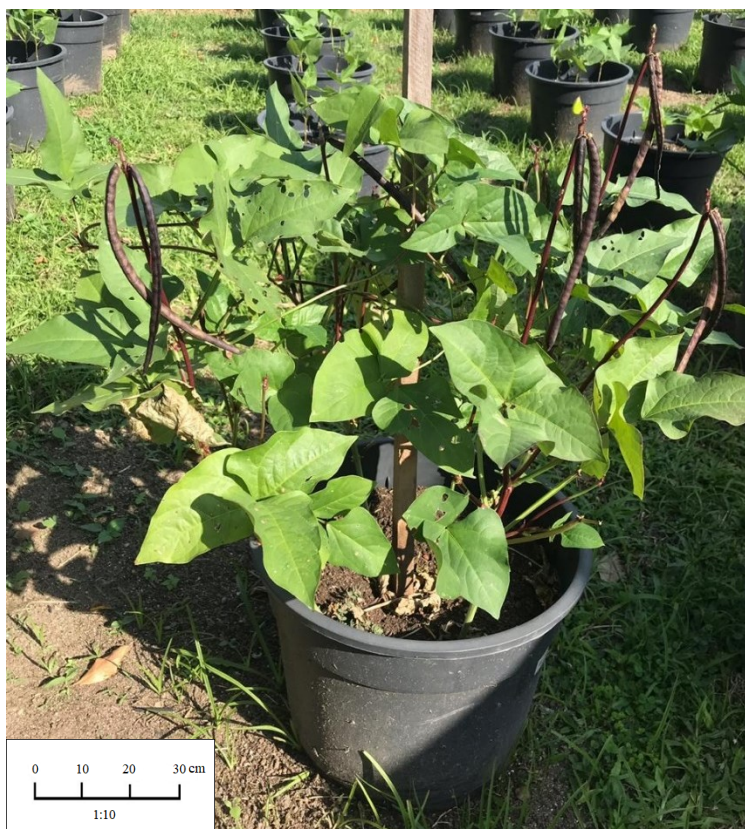
De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento através da Instrução Normativa nº 12/2008 somente as espécies *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata*, feijão-comum e feijão-caupi, respectivamente, são consideradas como feijão (MAPA, 2008).

O feijão-caupi é uma planta Dicotyledonea, da ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolineae, gênero *Vigna*, subgênero *Vigna*, secção *Catyang*, espécie (L.) Walp. e subespécie *unguiculata*, subdividida em quatro

cultigrupos Unguiculata, Sesquipedalis, Biflora e Textilis (PADULOSI; NG, 1997). No Brasil são cultivados os cultigrupos Unguiculata, para produção de grão seco e feijão-verde, e Sesquipedalis, comumente chamado de feijão-de-metro, para produção de vagem (FILHO *et al.*, 2011).

É uma leguminosa de estação quente que exibe uma ampla gama de hábitos de crescimento. As vagens contendo as sementes apresentam de 8 a 15 cm de comprimento (Figura 1), contendo aproximadamente 6–13 sementes por vagem (SHEAHAN, 2012). Daí o nome feijão-de-corda.

Figura 1 - Planta de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), cultivar BRS Aracê. Planta com 65 dias, 07 dias antes da colheita. Coordenadas geográficas 27°34'54.8"S 48°30'15.6"O.



Fonte: acervo pessoal (2019).

Os grãos podem ser classificados quanto a cor conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) quanto a cor do tegumento.

CLASSE	SUB-CLASSE	CARACTERÍSTICA DOS GRÃOS
BRANCO	Liso	Tegumento branco e liso
	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	Fosco	Tegumento preto, liso e fosco
	Brilhoso	Tegumento preto, liso e brilhoso
CORES	Mulato liso	Tegumento marrom e liso
	Mulato rugoso	Tegumento marrom e rugoso
	Canapu	Tegumento marrom-claro, liso, comprimidos nas extremidades
	Sempre verde	Tegumento esverdeado-claro e liso
	Verde	Tegumento e/ou cotilédones verdes
	Manteiga	Tegumento creme-amarelado, liso ou levemente enrugado
	Vinagre	Tegumento vermelho e liso
	Azulão	Tegumento azulado e liso
	Corjinha	Tegumento mosqueado cinza ou azulado e liso
	Rajado	Tegumento de cor marrom, liso, com rajas longitudinais mais escuras
MISTURADO		Produto com grãos de diferentes classes e subclasses

Fonte: Adaptado de Filho *et al.* (2011); MAPA (2008).

As variedades estudadas neste trabalho foram:

BRS Aracê: da classe cores, sub-classe verde (Figura 2), 18 g é a massa média de 100 sementes. Destaca-se pelo apelo visual (cor, preferência do consumidor), tempo de cozimento rápido (18'20") e propriedades nutricionais com alto teor de proteína (25%), além de ser rica em ferro (61,7 mg.kg⁻¹) e zinco (48,6 mg.kg⁻¹) (FILHO *et al.*, 2011; VILARINHO *et al.*, 2010a).

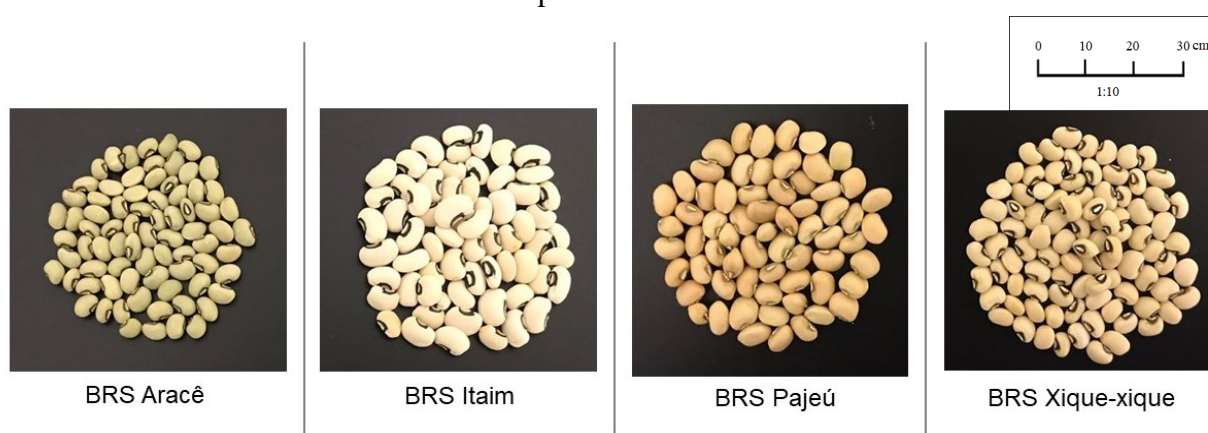
BRS Itaim: da classe branco, sub-classe fradinho (Figura 2), 23 g é a massa média de 100 sementes. Apresenta como características apelo visual e tempo de cozimento rápido (20'55") (VILARINHO *et al.*, 2010b).

BRS Pajeú: da classe cores, sub-classe mulato (Figura 2), 21 g é a massa média de 100 sementes. Destaca-se pelo apelo visual (cor marrom, preferência do consumidor), tempo de

cozimento rápido (17'51'') e propriedades nutricionais com alto teor de proteína (22%), além de ser rica em ferro (57,9 mg.kg⁻¹) e zinco (37,7 mg.kg⁻¹) (EMBRAPA, 2009).

BRS Xiquexique: da classe branco, sub-classe branco liso (Figura 2), 16,5 g é a massa média de 100 sementes. Destaca-se por ser a primeira cultivar biofortificada com ferro (77,4 mg.kg⁻¹) e zinco (53,66 mg.kg⁻¹), tempo de cozimento rápido (22'), além de alto teor de proteína (23%) (FREIRE FILHO *et al.*, 2008).

Figura 2 - Grãos de quatro cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) classificadas pela Embrapa Meio-Norte.



Fonte: acervo pessoal (2019).

O feijão-caupi apresenta ampla relevância, tanto como alimento quanto como gerador de emprego e renda, tanto no continente africano quanto na região nordeste do Brasil. Exibe grandes teores de proteína, minerais e fibras (FROTA; SOARES; ARÊAS, 2008).

2.3 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Os grãos de plantas são compostos por metabólitos primários como proteínas, lipídios, carboidratos, e por metabólitos secundários como compostos fenólicos, alcaloides e terpenos. A composição dos grãos é influenciada por aspectos como gênero, espécie, cultivar, época de cultivo, solo e clima (HUSSEIN; EL-ANSSARY, 2019), conforme observado para diferentes cultivares de feijão-caupi de diferentes localidades (Tabela 2).

Tabela 2 – Composição nutricional de grãos de cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*).

FEIJÃO-CAUPI	PARÂMETROS AVALIADOS	REFERÊNCIA		
Cultivar BRS Milênio (Brasil)	Umidade 6%	(FROTA; SOARES; ARÊAS, 2008).		
	Cinzas 2,6%			
	Proteína 24,5%			
	Lipídios 2,2%			
	Fibras 19,4%			
	Carboidrato 51,4%			
	Ferro 6,8 mg.100g ⁻¹ Zinco 4,1 mg.100g ⁻¹			
30 genótipos EMBRAPA (Brasil)	Cinzas 3,3 - 4,6%	(CARVALHO <i>et al.</i> , 2012).		
	Proteína 17,4 - 28,3%			
	Lipídios 1,0 - 1,6%			
	Fibras 19,5 - 35,6%			
	Carboidrato 35,7 - 57,8%			
	Ferro 6,1 - 8,1 mg. 100g ⁻¹ Zinco 2,7 - 4,4 mg. 100g ⁻¹			
	04 cultivares (Nigéria)		Proteína 20,1 - 25,8%	(GIAMI, 2005).
Polifenóis 0,99 - 1,96 mg				
Ácido Fítico 1,15 - 2,10 mg. g ⁻¹				
04 cultivares (Paquistão)	Umidade 11,5 - 14,5%	(OTITOJU <i>et al.</i> , 2015).		
	Proteína 20,0 – 26,9%			
	Lipídios 2,9 – 3,2%, Fibras 3,8 – 7,0%			
	Carboidrato 45,7 – 55,7%			
	Ferro 2,1 – 13,6 mg. 100g ⁻¹ Zinco 2,6 - 4,2 mg. 100g ⁻¹			
	43 genótipos (Colômbia)		Proteína 22,06 - 26,90%	(DENISE; DE-PAULA; JARMA-ARROYO, 2018).
			Ácido Fítico 9,6 - 12,7 mg. g ⁻¹	

Proteínas são macronutrientes presentes em alimentos de origem vegetal e animal que fornecem aminoácidos, compostos importantes envolvidos em praticamente todas as funções bioquímicas e fisiológicas do organismo humano (INSTITUTE OF MEDICINE, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). Embora as proteínas animais sejam consideradas completas por serem compostas por todos os aminoácidos essenciais, combinações de alimentos vegetais

como, por exemplo, cereais e leguminosas são complementares entre si e podem fornecer todos os aminoácidos essenciais, além de apresentarem menor custo e maior abundância se comparadas as de fontes animais (BRASIL, 2008). Alimentação à base de plantas e, mais especificamente, proteínas vegetais, têm sido objeto de crescente interesse de pesquisadores e consumidores em função de seus potenciais benefícios à saúde e de seu impacto ambiental positivo (AHNEN; JONNALAGADDA; SLAVIN, 2019).

3 PROTEÍNAS

Nas plantas, as proteínas apresentam relação direta com o estado fisiológico, processos específicos, bem como, com as respostas a fatores bióticos e abióticos. Para plantas destinadas a alimentação, as proteínas são especialmente interessantes no que se refere a inocuidade do alimento, pois podem estar envolvidas ou resultarem na síntese de toxinas, antinutrientes ou alérgenos (CLERENS; PLOWMAN; DYER, 2012; D’ALESSANDRO; ZOLLA, 2012).

Durante o desenvolvimento das sementes, ocorre o acúmulo de diferentes grupos de proteínas. Sabe-se que essas proteínas, denominadas proteínas de armazenamento, atuam como fonte de carbono e nitrogênio para germinação das sementes, além de marcadores da fase de maturação (DODEMAN; DUCREUX; KREIS, 1997). E são classificadas como: Albuminas [(1.6S – 2S) (solúvel em água)]; Globulinas [(7S-13S) (solúvel em soluções salinas diluídas)]; Glutelinas (solúveis em ácido diluído ou meio alcalino) e Prolaminas (solúveis em misturas de água / álcool) (OSBORNE; CAMPBELL, 1898). O feijão-caupi é composto principalmente por globulinas (45 – 58,8%), seguido de albuminas e glutelinas (ALGHAMDI *et al.*, 2019; GUPTA *et al.*, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2010).

As globulinas são as principais proteínas encontradas em sementes de leguminosas, e de acordo com seu coeficiente de sedimentação podem ser classificadas em 7S e 11S (DURANTI, 2006). O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) é constituído principalmente por faseolinas 7S e leguminas 11S (BESSADA; BARREIRA; OLIVEIRA, 2019; LUNA-VITAL *et al.*, 2015), já o feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) apresenta maior teor de vicilinas 7S (RANGEL *et al.*, 2003).

A qualidade de uma proteína pode ser determinada através da quantidade de nitrogênio total (N), da composição de aminoácidos essenciais e digestibilidade (BOYE; WIJESINHA-BETTONI; BURLINGAME, 2012). Quanto à composição aminoacídica, o feijão-caupi apresenta glutamina e asparagina como os aminoácidos não essenciais mais abundantes, seguido dos essenciais leucina, lisina, fenilalanina e tirosina. Entretanto, é comum a deficiência

de aminoácidos contendo enxofre (metionina e cisteína) (CARVALHO *et al.*, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2016; TEKA *et al.*, 2020; VASCONCELOS *et al.*, 2010). Essa deficiência pode ser complementada com a ingestão de cereais, que apresentam lisina como aminoácido limitante e excesso de metionina, essa combinação forneceria uma proteína completa em todos os aminoácidos essenciais, por exemplo (FROTA *et al.*, 2017; WOOLF; FU; BASU, 2011).

Na alimentação humana, as proteínas de armazenamento, desempenham papel fundamental tanto no fornecimento de aminoácidos essenciais quanto liberando peptídeos bioativos pela ação de enzimas hidrolíticas após a digestão gastrointestinal, que podem apresentar funções fisiológicas importantes como atividades antivirais e antitumorais, imunomoduladoras além de redução do colesterol e da pressão sanguínea (KUMAR *et al.*, 2019, 2017).

3.1 ANÁLISE PROTEÔMICA

A análise proteômica contribui para a análise detalhada da composição de proteínas dos grãos (CARRERA *et al.*, 2016), promove o conhecimento estrutural e funcional das proteínas, além da quantificação de sua abundância, o estudo de suas modificações, as interações entre elas e o estudo de sua localização na matriz avaliada (ORTEA; O'CONNOR; MAQUET, 2016).

Nesse sentido, Ortea, O'Connor e Maquet (2016) sugerem que a análise proteômica pode ser dividida em três abordagens dependendo do objetivo da avaliação:

1. Qualitativa

Cujo objetivo é identificar e caracterizar um conjunto de proteínas presentes em uma amostra, que pode ser o proteoma completo de uma matriz, ou de um subconjunto de proteínas presentes nesta matriz (proteína do glúten, por exemplo).

2. Diferencial ou quantitativa

Tem por finalidade analisar informações quantitativas de proteínas, como a abundância relativa de uma proteína específica entre diferentes amostras, ou a quantidade absoluta da proteína, que podem ser muito úteis ao procurar diferenças entre distintas condições (por exemplo, tratamentos tecnológicos diferentes de produtos alimentícios ou alimento geneticamente modificado (GM) versus alimentos não-GM), haja visto que o conjunto de proteínas de um alimento pode sofrer alterações devido principalmente à composição, ao processamento tecnológico e à variabilidade biológica dos componentes destes alimentos.

3. Funcional

Estuda a interação funcional entre proteínas, ou entre uma proteína e outras moléculas e as consequências dessas interações em uma matriz. A compreensão das interações proteína-proteína, é de grande relevância para que melhorias adicionais na qualidade dos alimentos sejam concretizadas.

A proteômica têm sido aplicada principalmente como ferramenta relacionada a qualidade e segurança de alimentos, como por exemplo: para caracterização de proteínas de armazenamento em semente de soja não cultivadas (*Glycine soy*) e cultivadas (*Glycine max*) (NATARAJAN *et al.*, 2006); comparação de proteoma de feijão GM e não GM (VALENTIMNETO *et al.*, 2016); efeitos da infecção por fungos nas proteínas da uva e a relação com a qualidade da uva e do vinho (LORENZINI *et al.*, 2016); identificação de perfil proteico de diferentes cultivares de feijão comum (ROSSI *et al.*, 2017); caracterização de proteoma de carne de búfalo e relação com a maciez (KIRAN *et al.*, 2015); detecção de alterações em leite (EL-SALAM, 2014); e também para identificação de alergênicos em alimentos (GIROLAMO *et al.*, 2015).

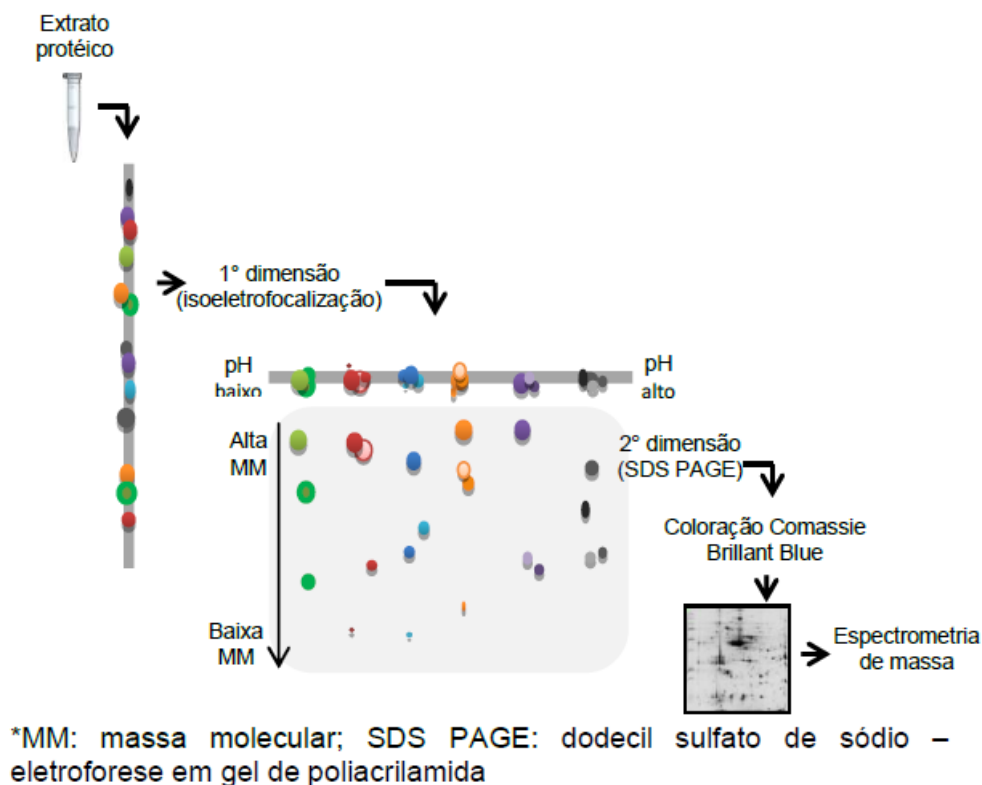
3.2 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

Dentre inúmeras técnicas para separação de proteínas, uma das mais comuns para análise proteômica é a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2-DE PAGE) (NING; WU; WANG, 2016). De acordo com Jorin-Novo *et al.* (2019) a eletroforese em gel, em geral, e a 2-DE, em particular, têm sido, são e continuarão sendo uma técnica fundamental na pesquisa de proteômica e biologia vegetal, principalmente para rastreabilidade de alimentos, monitoramento de alergênicos e análise de ambiente.

A técnica consiste basicamente em duas etapas de separação, também chamadas de duas dimensões (Figura 3). Na primeira dimensão ou focalização isoelétrica (IEF), as proteínas são separadas de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI). Nesta etapa são utilizadas tiras contendo anfóteros que promovem um gradiente de pH em intervalos que variam de 3-10, 3-5,6; 4-7 ou 7-11, e com a passagem de corrente elétrica, as proteínas migram até atingir um estado de equilíbrio onde sua carga líquida é igual a zero (pH no qual a carga líquida é nula, equivale ao pI). A segunda dimensão promove a separação das proteínas em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS), este último é um detergente que ocasiona a desnaturação das proteínas até a estrutura linear, além disso, ao ligar-se com as proteínas torna a carga intrínseca da molécula insignificante, permitindo a separação quase exclusivamente por

massa molecular (GÖRG; WEISS; DUNN, 2004; MAGDELDIN *et al.*, 2014; NELSON; COX, 2011).

Figura 3 - Representação gráfica de eletroforese bidimensional (2-DE).



Fonte: Bálsamo, 2016.

Considerando que é improvável que diferentes moléculas de proteína possam ter as mesmas propriedades físico-químicas (pI e massa molecular), a separação de proteínas por 2-DE é mais eficiente que a eletroforese unidimensional (MAGDELDIN *et al.*, 2014). A fim de aproveitar a alta resolução da eletroforese bidimensional, a etapa de extração de proteínas é primordial, pois deve interromper completamente as interações moleculares e assegurar que cada ponto represente um polipeptídeo individual (GÖRG; WEISS; DUNN, 2004).

3.2.1 Extração de proteínas

Durante a etapa de extração, as proteínas devem ser desnaturadas, desagregadas, reduzidas e solubilizadas. Ainda alguns componentes da amostra como lipídios, ácidos nucleicos, compostos fenólicos, sais entre outros interferem na extração e identificação das proteínas e devem ser removidos. Para atingir estes objetivos, diversas substâncias químicas,

como detergentes, agentes redutores, inibidores de proteases e agentes caotrópicos são utilizados (GÖRG; WEISS; DUNN, 2004; HERBERT; RYDE, 1999; RABILLOUD; LELONG, 2011). É necessário cautela na escolha dos agentes químicos utilizados na extração, haja visto que a primeira dimensão consiste na focalização isoelétrica, desse modo a carga das proteínas não pode ser alterada (efeito de surfactantes como SDS, por exemplo) (RABILLOUD; LELONG, 2011). Amostras vegetais são complexas, apresentam diferentes interações e requerem protocolos personalizados ou adaptados para cada espécie ou conformação (HAYAMA; OHYAMA, 2018). Nesse sentido, são escassos os estudos que comparam e otimizam protocolos de extração de proteína para feijão-caupi (NASCIMENTO *et al.*, 2019; VASCONCELOS *et al.*, 2005).

4 COMPOSTOS BIOATIVOS

Além das proteínas, outros componentes presentes nas matrizes vegetais apresentam relevantes funções fisiológicas. Compostos bioativos são considerados compostos secundários de plantas, que estão presentes naturalmente em pequenas quantidades em alimentos, e apresentam ação metabólica ou fisiológica específica (BRASIL, 2002; KITTS, 1994; RUBIÓ; MOTILVA; ROMERO, 2013). Podem ser encontrados de forma bastante diversificada, em que podemos destacar os compostos fenólicos, carotenoides, fitoesteróis, tocoferóis e ácidos orgânicos. Estes estão relacionados diretamente com a prevenção de doenças como, câncer, diabetes e doenças cardiovasculares, além de apresentarem atividades anti-hipertensivas, imuno-estimulante, antioxidante, inibição ou estimulação enzimática entre outras (KITTS, 1994; KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002; SARRIÁ *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2017a).

Esses compostos são bastante sensíveis a fatores como pH, calor, luz e oxigênio, durante o processamento e armazenamento (GLEESON; RYAN; BRAYDEN, 2016). Além disso, condições ambientais e climáticas como ataque de insetos, tipo e composição de solo, temperatura, seca ou excesso de umidade induzem respostas fisiológicas e bioquímicas que influenciam no teor de compostos bioativos presentes em plantas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; NEUGART *et al.*, 2018; NEUGART; KRUMBEIN; ZRENNER, 2016).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas, considerados os antioxidantes mais abundantes da natureza, são caracterizados estruturalmente pela presença de grupamentos hidroxilas ligados ao anel aromático (fenol), e com base na estrutura são classificados em: fenóis simples, ácidos fenólicos, flavonóides, xantonas, estilbenos e lignanas (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007; VUOLO; LIMA; MARÓSTICA JUNIOR,

2019). O mecanismo de ação antioxidante ocorre principalmente pela eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs), nitrogênio e cloro ou ainda atuam como agentes quelantes de íons metálicos, operando dessa forma, tanto no estágio de iniciação quanto na propagação do processo oxidativo (LI *et al.*, 2014; MARTINS; BARROS; FERREIRA, 2016; VUOLO; LIMA; MARÓSTICA JUNIOR, 2019). Além disso, a depender da estrutura química, concentração, matriz alimentar e interações de íons metálicos estes compostos ainda podem apresentar ação pró-oxidante (AKYÜZ *et al.*, 2017; SAMRA *et al.*, 2011). Tanto frutas quanto leguminosas são consideradas amplas fontes de compostos bioativos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

4.1 COMPOSTOS BIOATIVOS DO FEIJÃO-CAUPI

Grãos de leguminosas como feijão, lentilha, feijão-caupi, grão de bico e ervilha além de se destacarem como fontes de proteína e aminoácidos, são compostos por substâncias bioativas, que desempenham papéis fisiológicos e metabólicos importantes. Estes compostos variam em concentração entre diferentes espécies e variedades de leguminosas (KHANG *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2017a).

Cai, Hettiarachchy e Jalaluddin (2003) avaliaram 17 cultivares de feijão-caupi provenientes do estado do Arkansas/EUA, nos quais verificaram que o conteúdo de compostos fenólicos varia conforme a cultivar. A Tabela 3 ratifica dados para compostos fenólicos e atividade antioxidante para diferentes cultivares de feijão-caupi.

Tabela 3 - Compostos fenólicos e atividade antioxidante de diferentes cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*).

Feijão-caupi	Compostos fenólicos	Atividade antioxidante	Referência
BRS Xiquexique (Brasil)	Catequina, epicatequina, ácido gálico, ácido ferúlico e ácido clorogênico.	575,4 ± 2,98 µmol TEAC/g (DPPH) 608,5 ± 2,09 µmol TEAC/g (ABTS)	(MOREIRA-ARAÚJO <i>et al.</i> , 2018)
BRS Aracê BRS Tumucumaque (Brasil)	Ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido p-cumárico e	490,55 ± 22,05 µmol TEAC/100g (DPPH) 837,73 ± 15,39 µmol TEAC/100g (ABTS)	(ANJOS BARROS <i>et al.</i> , 2020)

	ácido ferúlico.	453,10 ± 6,79 µmol TEAC/100g (FRAP)	
Cultivar cor preta (México)	Ácido gálico, protocatecúico e <i>p</i> -hidroxibenzóico	12,96 ± 0,55 µmol TEAC/g (ORAC) 4,00 ± 0,57 µmol TEAC/g (ABTS)	(GUTIÉRREZ-URIBE; ROMO-LOPEZ; SERNA- SALDÍVAR, 2011)
17 cultivares (Estados Unidos)	ácido protocatecúico, ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico, ácido cafeico, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido ferúlico e ácido 2,4- dimetoxibenzóico	-	(CAI; HETTIARACHCHY; JALALUDDIN, 2003)
02 cultivares (África do Sul)	Catequina, miricetina e quercetina-3, O-diglicosídeo	-	(NDERITU <i>et al.</i> , 2013)
02 cultivares (África do Sul)	Catequina-3, O-glicosídeo, ácido <i>p</i> -cumaroilaldarico e quercetina	38 – 109 µmol TEAC/g (ABTS) 86 – 139 µmol TEAC/g (ORAC).	(HACHIBAMBA <i>et al.</i> , 2013)

*TEAC: Atividade antioxidante equivalente em trolox.

A maioria dos compostos fenólicos presentes em grãos são encontrados na casca/tegumento (ATTREE; DU; XU, 2015; GUTIÉRREZ-URIBE; ROMO-LOPEZ; SERNA-SALDÍVAR, 2011; LUO *et al.*, 2016) e além das funções fisiológicas já destacadas, são determinantes para cor, sabor e aroma desses alimentos (SWANSON, 2003).

5 BIOACESSIBILIDADE e DIGESTÃO *IN VITRO*

O esquema de classificação da biodisponibilidade nutracêutica (do inglês NuBAC) conceitua bioacessibilidade como a fração do composto bioativo liberada da matriz alimentar, disponível numa forma adequada para absorção no local de absorção adequado (MCCLEMENTS; LI; XIAO, 2015). Em função desta fração disponível, define-se o termo biodisponibilidade que, do ponto de vista nutricional, segundo Benito e Miller (1998), é a fração de um determinado nutriente ou componente do alimento que o corpo pode utilizar, e de acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA, 2003) do ponto de vista farmacêutico, é a taxa em

que uma substância ou componente terapêutico é absorvido e se torna disponível no local da ação da substância.

Avaliar o comportamento dos alimentos e nutrientes através de métodos de digestão *in vivo*, utilizando humanos e animais, apresentam resultados precisos, entretanto, geralmente são mais demorados e onerosos, além de demandarem protocolos éticos (BOISEN; EGGUM, 1991). Como alternativa para estimar estes resultados, os métodos de digestão *in vitro* apresentam-se como ferramentas mais rápidas e baratas, apesar da dificuldade de simular com precisão todos os eventos que ocorrem no corpo humano (HUR *et al.*, 2011).

Inúmeros métodos simulando a digestão *in vitro* são utilizados, o que dificulta a comparação entre os trabalhos (LUCAS-GONZÁLEZ *et al.*, 2018). Em função disso, Minekus *et al.* (2014) estabeleceram um protocolo consensual, com recomendações para um método de digestão padronizado. O método contempla as três fases da digestão: (1) fase oral, contemplando a primeira fase da digestão com ação da enzima amilase na boca; (2) fase gástrica, consiste na ação da enzima pepsina e simula o ocorrido no estômago; e finalmente (3) fase entérica ou intestinal, com enzima pancreatina, que como o próprio nome sugere, mimetiza a etapa que ocorre no intestino.

Todas as etapas da digestão apresentam relevância, em função principalmente das enzimas ativas e dos compostos a serem digeridos, liberados e absorvidos na fase em questão (DUPONT *et al.*, 2018). Inúmeros fatores influenciam a estabilidade e distribuição dos compostos bioativos no organismo, como pH, presença de enzimas, camada de muco e epitélio (CHAI *et al.*, 2018). Portanto, tão importante quanto conhecer os benefícios dos compostos bioativos no organismo humano é compreender o quanto destes compostos permanece disponível durante e após a digestão. Dessa forma, os estudos tanto da bioacessibilidade quanto da biodisponibilidade dos compostos fenólicos são essenciais para efetiva relação entre a presença destes nos alimentos e as funções fisiológicas e biológicas já apresentadas.

5.1 SINERGISMO ENTRE ALIMENTOS

De acordo com Eid, El-Readi e Wink (2012) sinergia provém do grego “*synergos*” e significa trabalhar juntos. Ainda, pode ser definida como efeito verificado com a combinação de mais de uma substância, efeito este positivo, se comparado com a atividade individual destas (HEINRICH *et al.*, 2012). O sinergismo entre alimentos pode influenciar de forma positiva a bioacessibilidade e biodisponibilidade de nutrientes e compostos bioativos (NAIR; AUGUSTINE, 2018), como é o caso do consumo de lipídios que pode proporcionar uma

melhor absorção de vitamina A (BROWN *et al.*, 2004), ou a maior biodisponibilidade de ferro se ingerido concomitante a alimentos ricos em ácido ascórbico (DIAZ *et al.*, 2003; NAIR *et al.*, 2013). Frutas cítricas e sucos são importantes aliados no fornecimento de nutrientes e compostos bioativos, como vitamina C e polifenóis, que podem atuar em conjunto (de forma aditiva ou sinérgica) exercendo atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena (DE ANCOS *et al.*, 2017; KHAN; ZILL-E-HUMA; DANGLES, 2014; LEE, 2013; LIU; HEYING; TANUMIHARDJO, 2012). A relevante atividade antioxidante é apresentada principalmente em função de inúmeros compostos bioativos presentes, como: vitamina C, compostos fenólicos, terpenoides e pectina (ZOU *et al.*, 2016). O teor dessas substâncias pode oscilar em função da variedade e estágio de maturação (MENNAH-GOVELA; BORNHORST, 2017).

Dentre os compostos fenólicos, as flavanonas são comumente encontradas em frutas cítricas, especialmente naringina, hesperidina e a narirutina em laranjas (KARASAWA; MOHAN, 2018). Laranjas da variedade pera, convencionais e orgânicas, do mercado brasileiro apresentaram teores de fenólicos de 17,29 e 37,15 mg GAE.100mL⁻¹ respectivamente (DOLINSKY *et al.*, 2018). O teor de compostos fenólicos foi avaliado em laranjas cultivadas no Brasil por Stafussa *et al.* (2018), que verificaram principalmente flavanonas sendo estas narirutina, hesperidina e hesperetina, além de derivados do ácido hidroxicinâmico como ácido ferúlico, cafeico, p-cumárico e sinápico. Ainda, foi observado atividade antioxidante 1193,34 µmol TEAC.100g⁻¹ (ABTS). Estes mesmos fenólicos foram encontrados em Laranjas Navel da Espanha (semelhante a laranja-da-Bahia brasileira) que apresentaram um total de 839 mg.L⁻¹ de compostos fenólicos (GIL-IZQUIERDO *et al.*, 2001). Quatro variedades de laranja provenientes da China demonstraram teor de fenólicos totais variando entre 1173,28 e 1499,71 mg GAE.L⁻¹, destes, foram identificados ácido cafeico, ácido p-cumárico, ferulico e ainda ácido sinápico (XU *et al.*, 2008).

O Brasil é o maior produtor mundial de laranjas, responsável por 33,8% (16,5 milhões de toneladas) de toda a produção, com destaque para o estado de São Paulo produtor de 75% da produção brasileira (12,1 milhões de toneladas) (IBGE, 2021; USDA, 2021). De acordo com a Associação Nacional de exportadores de sucos cítricos (CITRUSBR, 2020) existem mais de 100 variedades de laranjas cultivadas pelo mundo. No Brasil, as mais comuns são as laranjas Bahia, Pera, Natal, Valência, Hamlin, Westin e Rubi. As laranjas doce (*Citrus sinensis*) das variedades Pera e Valência são as mais importantes no mercado brasileiro, principalmente em função da boa qualidade dos frutos e do suco, sendo a laranja Pera a mais cultivada no País (FUNDECITRUS, 2019). O suco de laranja pera possui compostos fenólicos, principalmente as flavanonas como hesperidina, narirutina e eriocitrina (MESQUITA; MONTEIRO, 2018),

que vem sendo amplamente estudadas por apresentar potencial atividade antioxidante e por auxiliar o organismo na prevenção de doenças cardiovasculares, arterosclerose e câncer (BARRECA *et al.*, 2017; KHAN; ZILL-E-HUMA; DANGLES, 2014). Presente em 33,7% dos lares brasileiros, segundo a Pesquisa de orçamentos familiares, a laranja doce (*Citrus sinensis*) é uma das frutas mais consumidas no Brasil (IBGE, 2011). O País aparece entre os 40 países que mais consomem sucos de frutas e apresenta uma média de consumo anual de 1,5 L. habitante⁻¹ (BARROS; BARROS; CYPRIANO, 2016).

O feijão-caupi apresenta grande potencial de mercado, haja visto seu consumo ainda ser restrito às regiões Norte e Nordeste do Brasil. E como já destacado anteriormente, pulses como o feijão-caupi também são fontes de compostos fenólicos e apresentam atividade antioxidante. Estudos referentes à atividade antioxidante sinérgica do consumo de suco de laranja juntamente com feijão-caupi são inexistentes, especialmente durante e após a digestão gastrointestinal e apresentam-se como uma lacuna relevante aos possíveis efeitos benéficos a saúde.

CAPÍTULO 2

*Informações contidas neste capítulo estão publicadas no artigo:

Comparação do perfil proteico de grãos de cultivares brasileiras de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) por PCA.

Autores: Tuany Camila Honaiser; Gabriela Barbosa Rossi; Maurisrael de Moura Rocha; Ana Carolina Maisonnave Arisi

Revista: *Food Production, Processing and Nutrition*

Resumo

Este estudo teve como objetivo comparar o perfil proteico de grãos de quatro cultivares brasileiras de feijão-caupi (BRS Aracê, BRS Itaim, BRS Pajeú e BRS Xiquexique) por eletroforese bidimensional (2-DE) e análise de componentes principais (PCA). A 2-DE separou eficientemente os perfis proteicos de feijão-caupi, demonstrando alta homogeneidade entre as quatro cultivares. Além disso, a análise de componentes principais indicou que houve diferença na abundância de proteínas entre as cultivares. As cultivares BRS Aracê e BRS Xiquexique, ambas biofortificadas em ferro e zinco, foram separadas das cultivares BRS Itaim e BRS Pajeú. Esses resultados demonstraram que perfis proteicos podem ser usados para discriminar variedades de feijão-caupi.

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) é um importante componente da cesta básica na África e nas regiões norte e nordeste do Brasil. Essa leguminosa é rica em proteínas (23% a 30%), fibras (16% a 19%) e outros nutrientes essenciais, como vitaminas do complexo B (AIDA *et al.*, 2021; BAPTISTA *et al.*, 2017; FILHO *et al.*, 2011; FROTA *et al.*, 2008). Dentre as proteínas, a vicilina 7S é a principal proteína de armazenamento do feijão-caupi e, dependendo da variedade, pode ser glicosilada ou não, interferindo em suas propriedades funcionais (KIMURA *et al.*, 2008). Quatro cultivares brasileiras desenvolvidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) são analisadas aqui, BRS Aracê, BRS Itaim, BRS Pajeú e BRS Xiquexique. Possuem diferentes cores de tegumento, grãos de diferentes tamanhos, sendo que duas delas são biofortificadas em ferro e zinco (BRS Aracê e BRS Xiquexique) (EMBRAPA, 2009; FILHO *et al.*, 2011; VILARINHO *et al.*, 2010a; VILARINHO *et al.*, 2010b).

Devido ao alto teor proteico do feijão-caupi, o incentivo ao seu consumo pode estar associado a uma fonte proteica de baixo custo, quando comparado ao custo da proteína animal ou de outras fontes vegetais. Além disso, o feijão-caupi pode ser uma fonte alternativa de proteína para populações vegetarianas e/ou veganas; e ainda ampliar as opções alimentares para contribuir com a diversidade alimentar. Além da importância nutricional, as proteínas têm relação direta com o estado fisiológico das plantas, processos específicos, bem como com as respostas a fatores bióticos e abióticos. Durante o desenvolvimento das sementes, diferentes grupos de proteínas se acumulam, como as chamadas proteínas de armazenamento, que atuam como marcadores da fase de maturação (CLERENS; PLOWMAN; DYER, 2012; D’ALESSANDRO; ZOLLA, 2012; RASHEED *et al.*, 2020).

A análise de proteínas por eletroforese em gel bidimensional (2-DE) promove a separação de proteínas em duas etapas (ponto isoelétrico e massa molecular) com grande eficiência e robustez (JORRIN-NOVO *et al.*, 2019; RABILLOUD & LELONG, 2011; ZHAN *et al.*, 2019). A técnica tem sido amplamente aplicada como ferramenta relacionada à qualidade e segurança alimentar (ALIKORD *et al.*, 2018; LORENZINI *et al.*, 2016; ROSSI *et al.*, 2017; VALENTIM-NETO *et al.*, 2016). No entanto, a 2-DE gera centenas de spots por gel, o que pode tornar a análise desses grandes conjuntos de dados uma etapa demorada e difícil, quando realizada por ferramentas de análise univariada (JACOBSEN *et al.*, 2007; LUALDI & FASANO, 2019), tornando as abordagens estatísticas multivariadas como a análise de componentes principais (PCA) mais eficazes. A PCA é usada para concentrar as informações contidas em várias variáveis originais em um conjunto menor de variáveis estatísticas (componentes) com uma perda mínima de informações, permitindo assim uma visão geral do conjunto de dados, destacando possíveis relações entre elas (ENGGILDE *et al.*, 2007). É um dos métodos de análise multivariada mais utilizados na análise de dados proteômicos (BALSAMO *et al.*, 2015; MELLO *et al.*, 2016; LUALDI & FASANO, 2019; VALENTIM-NETO *et al.*, 2016). A Análise de Componentes Principais é uma ferramenta útil para comparar perfis de proteínas de variedades de plantas sem a necessidade de identificação de proteínas.

Neste trabalho, foi realizado o primeiro estudo comparativo do perfil proteico de quatro cultivares brasileiras de feijão-caupi (BRS Aracê, BRS Itaim, BRS Pajeú e BRS Xiquexique) desenvolvido pela EMBRAPA usando 2-DE e análise de componentes principais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Quatro cultivares de feijão-caupi denominadas BRS Aracê, BRS Itaim, BRS Pajeú e BRS Xiquexique foram fornecidas pela Embrapa Meio-Norte. Estas foram cultivadas de maio a julho de 2018, em condições irrigadas, no campo experimental da Embrapa Meio-Norte, Teresina (Latitude: 5° 5' 21" Sul, Longitude: 42° 48' 6" Oeste, Altitude: 87 metros), Piauí, Brasil.

2.2 PRIMEIRO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

O primeiro método aplicado às quatro cultivares de grãos de feijão-caupi foi previamente estabelecido para feijão comum (ROSSI *et al.*, 2017) e consistiu em aproximadamente 30 g de grãos de cada cultivar, em triplicata, moídos em moinho analítico (IKA, Staufen, Alemanha) com nitrogênio líquido e posteriormente armazenados a -80 °C até o momento da extração.

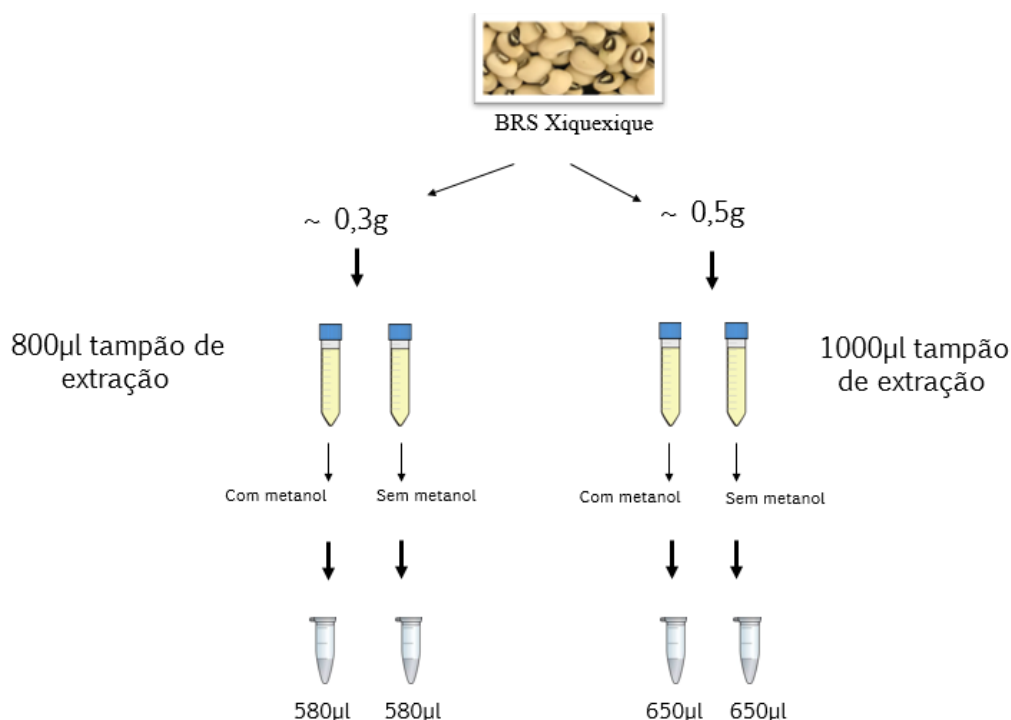
Os extratos proteicos para cada cultivar foram obtidos a partir de 300 mg de cada amostra moída suspensa em 0,8 mL de tampão de extração [0,5 M Tris-HCl, pH 8; sacarose 0,7 M; EDTA 100 mM; 1 mM de PMSF; 1% (p/v) CHAPS; 14mM DTT; inibidor de protease Roche (Mannheim, Alemanha)], a mistura foi agitada em vórtex por 30 s. As amostras foram centrifugadas a $20.000 \times g$ por 20 min a 4°C, o sobrenadante foi dividido igualmente em dois microtubos por causa do volume total, então 0,8 mL de solução contendo acetona pura, 12,5% (p/v) TCA e 0,125% (p/v) DTT foi adicionado e mantido durante a noite a 4°C, após, submetido a outra centrifugação a $20.000 \times g$ por 20 min a 4°C. O precipitado foi lavado três vezes com 1 mL de metanol frio, duas vezes com 1 mL de acetona pura e, finalmente, com acetona contendo 0,1% (p/v) de DTT. Após centrifugação a $10.000 \times g$ por 30 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e os precipitados foram suspensos em 300 µL de tampão de reidratação contendo 7 M de ureia, 2 M de tiouréia, 2% (p/v) CHAPS, 0,28% (p/v) DTT e 1% (p/v) PMSF, mantidos a 21 °C por 2 h, depois submetidos a outra centrifugação a $10.000 \times g$ por 30 min a 15 °C, os sobrenadantes dos dois microtubos foram combinados em um, e armazenado a -80 °C para posterior quantificação. Os extratos de proteína foram quantificados usando o 2-D Quant Kit (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

2.3 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA MODIFICADO

Com base nos resultados obtidos na primeira extração, o protocolo foi modificado (Figura 1), para verificar a melhor condição para extração da proteína do feijão-caupi.

A cultivar BRS Xiquexique foi escolhida para a extração proteica do grão, pois o menor teor de proteína foi obtido com a extração proteica anterior. Todo o procedimento foi realizado em tubos cônicos de 15 mL, evitando-se a divisão da amostra durante o protocolo. A influência da massa inicial da amostra também foi avaliada, além de 300 mg, uma segunda amostra de 500 mg foi utilizada neste teste. Por fim, na terceira variável estudada, optou-se por excluir as etapas de lavagem com metanol, observando se isso reduziria a perda de proteína no processo.

Figura 1 – Resumo dos protocolos de extração de proteínas.



Após a quantificação, a condição que resultou em maior extração foi aplicada aos grãos das demais cultivares. Em seguida, os extratos de proteína foram limpos usando o 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

2.4 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2-DE)

De cada cultivar foram preparados três extratos proteicos (com e sem kit 2-D Clean-Up) e de cada extrato proteico um gel 2-DE, obtendo-se três perfis proteicos para cada cultivar. O 2-DE foi realizado conforme descrito por Valentim-Neto *et al.* (2016).

A focalização isoeétrica (IEF) foi realizada utilizando *Immobiline Drystrip Gels* (tiras IPG, gradiente de pH 4-7, 13 cm) (GE Healthcare), de acordo com Nogueira *et al.* (2007) e Vasconcelos *et al.* (2005) as proteínas do feijão-caupi possuem pI entre pH 4 e 7, portanto, o uso de tiras nessa faixa permite melhor separação e visualização. Aproximadamente 250 µg de proteína total foram diluídos em 250 µL de tampão de reidratação contendo 0,2 mL L⁻¹ de tampão IPG pH 4-7 (GE Healthcare) e azul de bromofenol foi usado como corante de rastreamento. As tiras foram focadas nas seguintes condições: etapa um de 50 V a 25 Vh, etapa dois de 500 V a 500 Vh, etapa três de 1000 V a 750 Vh, etapa quatro de 4000 V a 2500 Vh,

etapa cinco de 8000 V a 15.000 Vh, e uma etapa final de 6.000 V a 6.000 Vh, até um total de 25.000 Vh, no limite de 50 mA por tira. Após a focagem, as tiras foram mantidas a -80°C .

Antes do SDS-PAGE, as proteínas contidas nas tiras foram incubadas por 15 min com 10 g L^{-1} de DTT em 5 mL de tampão contendo 50 mmol L^{-1} de Tris-HCl, pH 8,8; 6 mol L^{-1} de ureia; $0,2\text{ g L}^{-1}$ SDS; 3 ml L^{-1} de glicerol; $2,5\text{ mg L}^{-1}$ de azul de bromofenol. Seguiu-se a alquilação por 15 min com 25 g L^{-1} de iodoacetamida em 5 ml do mesmo tampão. O SDS-PAGE foi realizado em gel de poliacrilamida a 12,5% usando SE 600 Ruby System (GE Healthcare). A corrente elétrica aplicada foi de 15 mA por gel por 30 min e 30 mA por gel até o final da corrida. A temperatura foi mantida a 10°C usando um circulador termostático MultiTempIII (GE Healthcare). Os géis de proteína foram corados por Coomassie Brilliant Blue G-250 Stain (Bio-Rad).

2.5 ANÁLISE DE IMAGEM E DADOS

Os géis foram digitalizados em um *Image Scanner System II* e analisados com *ImageMaster 2-D Platinum Software Versão 7.0* (ambos da GE Healthcare). A correspondência automática foi complementada manualmente. O número total de *spots* foi detectado de acordo com os seguintes parâmetros: liso ≥ 4 , saliência ≥ 100 e área ≥ 11 . Os géis triplos de cada cultivar foram comparados entre si e, posteriormente, entre todas as cultivares. Para a identificação das proteínas acumuladas diferencialmente, o volume relativo dos *spots* (% Vol) foi comparado entre as cultivares com análise de variância pelo software *ImageMaster*. Considera-se que os volumes dos *spots* apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o valor médio de cada triplicata de cultivar em relação a outras cultivares.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

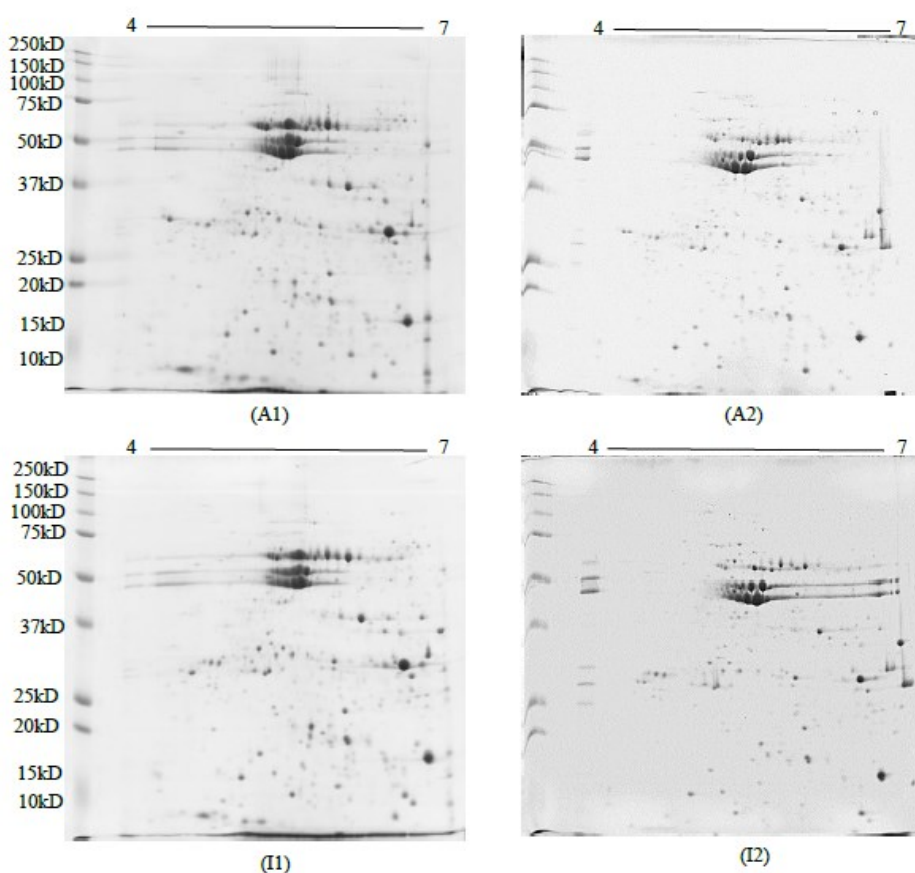
Os teores de proteína foram expressos como média \pm desvio padrão das três repetições. Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os resultados foram determinadas por análise de variância (ANOVA), teste de Tukey e teste t de Student. O software utilizado foi o STATISTICA versão 7.0.

Para a análise de componentes principais (PCA), os géis das quatro cultivares foram comparados entre si; os *spots* correspondentes nos doze géis foram selecionados. Esses dados selecionados foram transformados em \log_2 e cada amostra centrada na mediana. O PCA foi executado utilizando o Software R Language, pacote 'stats', função 'prcomp'.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

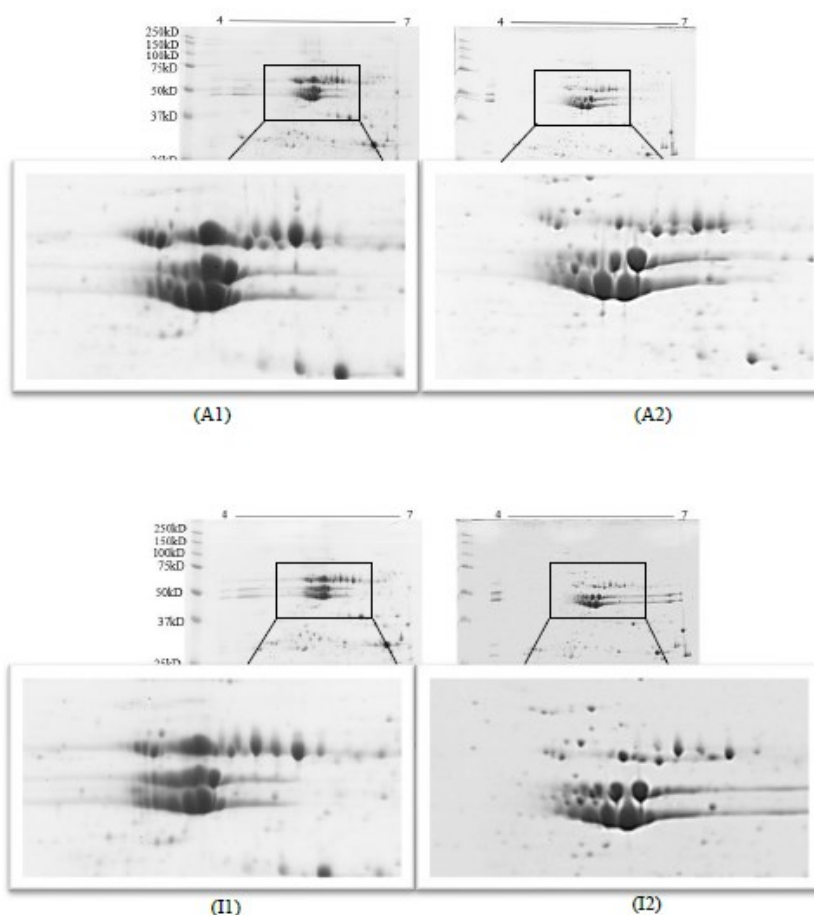
Amostras de plantas contêm diferentes níveis de metabólitos secundários e nutrientes, que variam mesmo dentro da mesma espécie, dependendo do estágio de maturação, parte da planta ou mesmo influências ambientais (HUSSEIN & EL-ANSSARY, 2019). Na 2-DE, esses compostos interferem na qualidade do gel, bem como na separação e identificação de proteínas (VÂLCU & SCHLINK, 2006; WU *et al.*, 2010). Uma etapa adicional de purificação por kit de limpeza é sugerida para posterior remoção de contaminantes como sais, lipídios, ácidos nucleicos e detergentes, a fim de melhorar a separação de spots após a limpeza (Figuras 2 e 3). O kit de limpeza 2-DE foi eficaz na remoção de substâncias interferentes, melhorando a qualidade dos géis do feijão-caupi, assim como em outras amostras (KUMAR *et al.*, 2017).

Figura 2 - Mapas comparativos do perfil proteico de grãos de duas cultivares brasileiras de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*).



(A) BRS Aracê e (I) BRS Itaim. (A1) e (I1) sem Limpeza; (A2) e (I2) com Limpeza. 250 μ g de proteínas foram separados usando tiras de IEF linear de 13 cm, pH 4-7 IPG para a primeira dimensão e géis de SDS-PAGE de 125 g L⁻¹ para a segunda dimensão. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250.

Figura 3 - Destaques dos efeitos de limpeza em mapas comparativos do perfil proteico de grãos de duas cultivares brasileiras de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*).



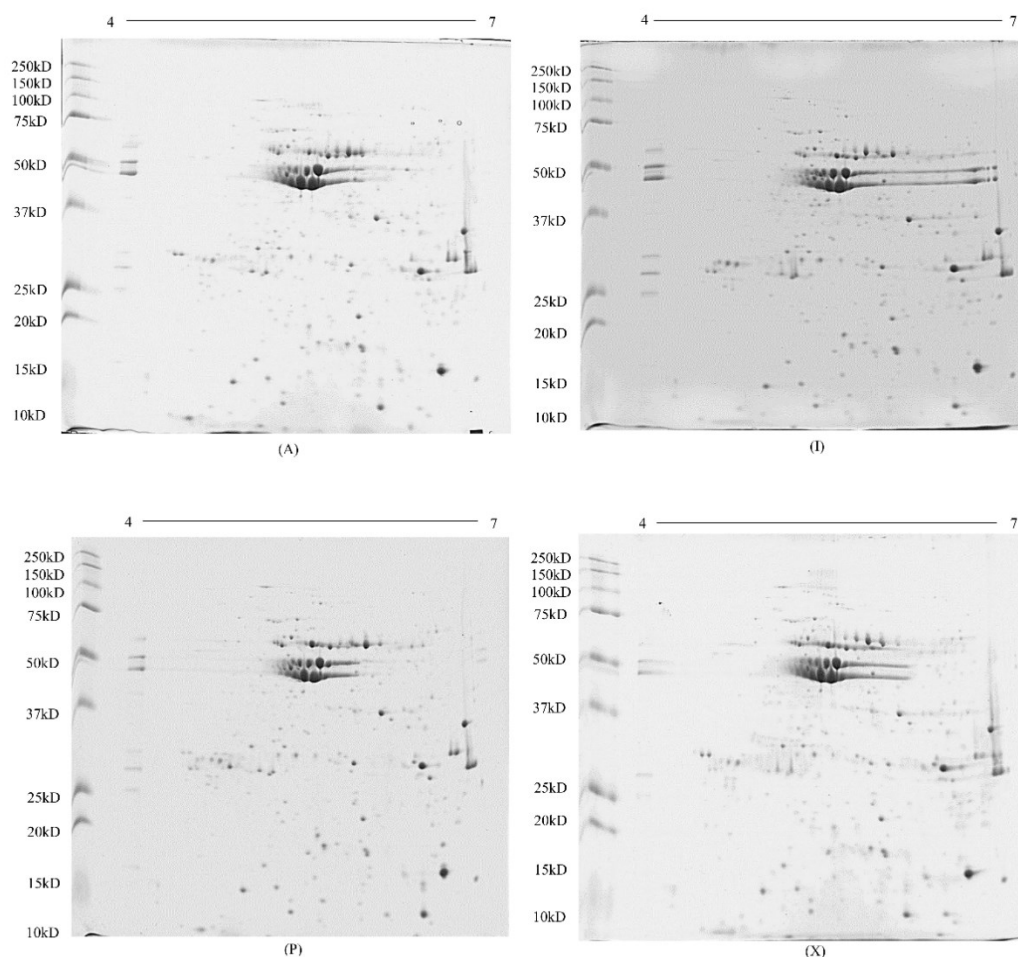
(A) BRS Aracê e (I) BRS Itaim. (A1) e (I1) sem Limpeza; (A2) e (I2) com Limpeza. 250 μg de proteínas foram separados usando tiras de IEF linear de 13 cm, pH 4-7 IPG para a primeira dimensão e géis de SDS-PAGE de 125 g L^{-1} para a segunda dimensão. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250.

3.1 COMPARAÇÃO DO PERFIL PROTEICO

Três géis de cada cultivar foram obtidos para comparação proteômica entre cultivares e amostras, nas mesmas condições do 2-DE já descrito anteriormente. A abordagem proteômica, incluindo 2-DE, tem sido usada para analisar e separar proteínas de alimentos, bem como para comparar diferentes cultivares (ABREU *et al.*, 2014; JAGADEESH; KANNEGUNDLA; REDDY, 2017; JORRIN-NOVO *et al.*, 2019; MOURA *et al.*, 2014; RABILLOUD; LELONG, 2011; ZHAN *et al.*, 2019). O grande número de *spots* individuais, bem como a baixa presença de estrias no gel (Figura 4), demonstraram uma extração eficiente de proteínas com ausência ou baixa concentração de interferentes como sais, carboidratos e lipídios (GÖRG; WEISS; DUNN, 2004). Um mapa representativo de cada cultivar é mostrado na Figura 4. BRS Aracê apresentou o maior número de *spots* 501 ± 13 (média \pm desvio padrão), sendo utilizado como

gel de referência para análise de correspondência, BRS Xiquexique apresentou 496 ± 6 spots, BRS Itaim, 488 ± 16 , e BRS Pajeú teve o menor número de spots, 451 ± 5 .

Figura 4 - Mapas representativos do perfil proteico de grãos de quatro cultivares brasileiras de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*).



(A) BRS Aracê, (I) BRS Itaim, (P) BRS Pajeú e (X) BRS Xiquexique. 250 μ g de proteínas foram separados usando tiras de IEF linear de 13 cm, pH 4-7 IPG para a primeira dimensão e géis de SDS-PAGE de 125 g L^{-1} para a segunda dimensão. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250.

Foram realizadas duas análises de correspondência (Tabela 1), o gel com maior número de spots, para cada categoria de correspondência, foi utilizado como gel de referência. A primeira avaliação, por cultivar (realizado entre três géis da mesma cultivar) apresentou % de spots detectados superiores a 95%, representando semelhanças entre as repetições, da mesma forma, o coeficiente de correlação de Pearson (r) variou entre 0,95 e 0,99 e os coeficientes de variação inferior a 3,28%. No segundo pareamento, comparando todas as doze amostras, a % de spots detectados superiores a 95%, também representou similaridade entre os perfis de

proteína de grãos de quatro cultivares, assim como o coeficiente de correlação de Pearson (r) variou entre 0,95 e 0,98.

Dados como % de spots detectados e coeficiente de correlação de Pearson observados na Tabela 1 mostram fortes semelhanças entre os perfis de proteínas, entre as mesmas cultivares e entre todas as amostras, e o gel de referência. Dessa forma, essas réplicas apresentaram alta homogeneidade e repetibilidade admissível na análise 2-DE, bem como observado entre as cultivares de feijão por Rossi *et al.* (2017).

Embora tenha sido observada uma forte correspondência entre os géis na Tabela 1 (acima de 90% de correspondência entre os spots detectados) ao analisar a porcentagem de volume de cada spot por meio do PCA, verifica-se que há diferença entre as cultivares.

O PCA foi usado para reduzir as dimensões de quase 300 spots (variáveis originais) com perda mínima de informação. Essa transformação realizada nos dados os organizou de forma que o primeiro componente seja responsável pela maior variação possível, pois o segundo componente apresenta a segunda maior variabilidade (HONGYU; SANDANIELO; OLIVEIRA JUNIOR, 2015; JACOBSEN *et al.*, 2007). A redução da complexidade dos dados promove uma melhor observação das possíveis conexões entre as variáveis. Estudos anteriores também mostraram que pode haver variações nas frações proteicas entre diferentes cultivares (OLIVEIRA *et al.*, 2004; TEKA *et al.*, 2020; VASCONCELOS *et al.*, 2010).

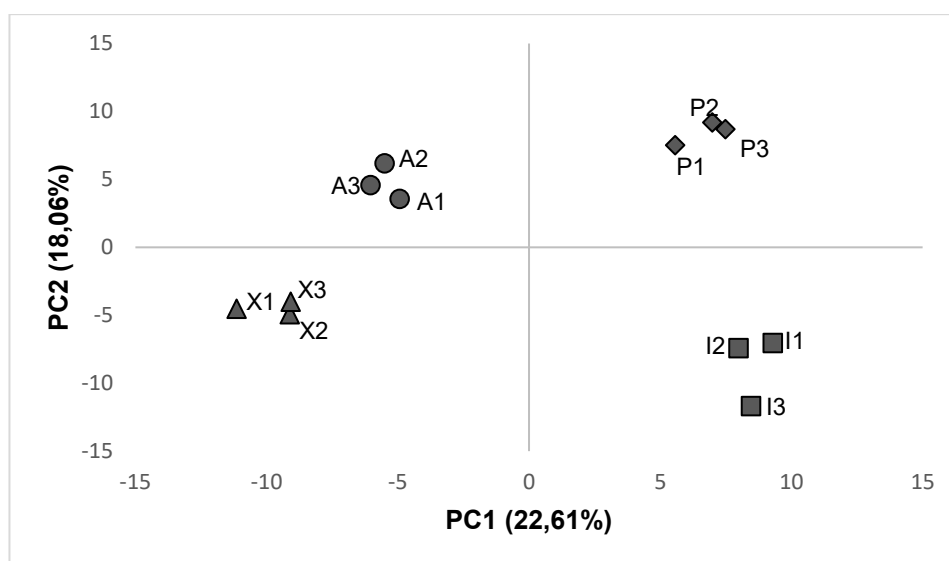
Tabela 1 - Dados de número de spots detectados e correspondência de spots em géis de 2-DE de quatro cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*). Em negrito, os géis referência (com maior número de spots) em cada categoria de correspondência.

Cultivar	Amostra	Spots detectados	Média ± DP	Correspondência por cultivar			Correspondência com gel referência		
				Spots correspondentes (% detectado)	Inclinação	r	Spots correspondentes (% detectado)	Inclinação	r
Aracê	A1	488	501 ± 13	474 (97%)	0,882	0,979	475 (97%)	0,882	0,979
	A2	503		478 (95%)	0,99	0,988	478 (95%)	0,99	0,988
	A3	513		495 (96%)	Gel Referência		499 (97%)	Gel Referência	
Pajeú	P1	446	451 ± 5	438 (98%)	0,992	0,993	438 (98%)	0,924	0,969
	P2	456		437 (96%)	Gel Referência		437 (96%)	0,932	0,964
	P3	452		440 (97%)	1,09	0,983	444 (98%)	1,03	0,95
Itaim	I1	500	488 ± 16	488 (98%)	Gel Referência		490 (98%)	0,937	0,959
	I2	470		452 (96%)	1,04	0,958	453 (96%)	0,997	0,957
	I3	495		487 (98%)	0,985	0,983	489 (99%)	0,92	0,964
Xiquexique	X1	491	496 ± 6	478 (97%)	1,03	0,984	481 (98%)	1,08	0,979
	X2	495		481 (97%)	0,93	0,989	483 (98%)	0,965	0,982
	X3	502		493 (98%)	Gel Referência		496 (99%)	1,05	0,973

DP: Desvio padrão; r: Coeficiente de correlação.

Para PCA, foram considerados apenas os spots presentes em todos os 12 géis, assim, 297 spots foram analisados quanto à porcentagem de volume (% vol). Dos 12 componentes principais (CP) gerados, os 5 primeiros respondem por 72,73% da variação total dos dados, e os dois primeiros componentes mostrados na Figura 5 representaram 40,67% destes, 22,61% estão alocados em CP1 e 18,06%, em PC2, percentuais estes semelhantes aos encontrados em comparações proteômicas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) por Balsamo *et al.*, (2015) onde PC1 + PC2 corresponderam a 43,37% da variação total dos dados e Valentim-Neto *et al.*, (2016) onde os dois primeiros componentes principais corresponderam a 46,8% da variação total dos dados. Há um agrupamento claro por cultivares (Figura 5). As cultivares BRS Aracê e BRS Xiquexique foram separadas por PC1 das cultivares BRS Itaim e BRS Pajeú, além disso, há uma clara separação entre BRS Pajeú e BRS Itaim em PC2. As quatro cultivares de feijão-caupi foram plantadas lado a lado para análise de proteínas dos grãos, então essas diferenças entre os perfis de proteína de grãos dessas cultivares de feijão-caupi ocorrem devido a fatores genéticos (PULLAIAHGARI *et al.*, 2019; THIELLEMENT; ZIVY; PLOMION, 2002). Além disso, a sequência primária de proteínas também interfere em sua posição em géis 2D, assim, alguns spots em géis 2D podem ser considerados marcadores genéticos ou fisiológicos (HE *et al.*, 2015; PULLAIAHGARI *et al.*, 2019).

Figura 5 - Gráfico de PCA de 297 spots correspondentes em 12 géis 2DE de grãos de 04 cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*): (A) Aracê, (P) Pajeú, (X) Xiquexique e (I) Itaim. Números 1, 2 e 3 referem-se as triplicatas dos géis de cada cultivar.



4 CONCLUSÕES

Foi demonstrado que o 2-DE foi eficiente para separar as proteínas do feijão-caupi, permitindo visualizar alta homogeneidade entre os perfis proteicos dos grãos dessas quatro cultivares brasileiras avaliadas. A PCA indicou que há diferença entre a abundância de proteína entre as cultivares, o que permite que essa técnica seja utilizada como marcador genético. Tendo em vista o significativo teor proteico presente em grãos de feijão-caupi e a ascensão de fontes proteicas diversificadas, estudos como este fornecem informações relevantes para programas de melhoramento relacionados ao acúmulo de proteínas em *Vigna unguiculata*, bem como para a segurança alimentar.

CAPÍTULO 3

*Informações contidas neste capítulo estão publicadas no artigo:

Sinergismo e bioacessibilidade fenólica durante a codigestão *in vitro* de feijão-caupi cozido com suco de laranja

Autores: Tuany Camila HONAISSER; Stefany Grutzmann ARCARI; Keli Cristina FABIANE; Maurisrael de Moura ROCHA; Isabela Maia Toaldo FEDRIGO; Ana Carolina Maisonnave ARISI.

Revista: *International Journal of Food Science & Technology*

Resumo

Feijão e sucos de frutas formam uma combinação de refeições muito comum em todo o mundo e devem ser acessíveis a todas as populações no âmbito das metas de desenvolvimento sustentável da OMS. Como os polifenóis podem contribuir para a saúde, a bioacessibilidade dos compostos fenólicos do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) e do suco de laranja (*Citrus sinensis*) foi determinada por meio de simulação gastrointestinal. Teve-se por objetivo avaliar a bioacessibilidade de polifenóis e possíveis sinergismos durante a codigestão *in vitro* desses dois alimentos, mimetizando uma refeição comum em uma abordagem mais representativa na pesquisa de polifenóis-nutrição. Um total de 20 compostos fenólicos foram identificados em amostras por CLAE-DAD antes e após a digestão *in vitro*. Ácido gálico, (-)-epicatequina e ácido clorogênico foram os polifenóis mais bioacessíveis. O cozimento e a extração com solvente do feijão-caupi afetaram suas concentrações de polifenóis. Após a digestão, os índices de bioacessibilidade (IB) foram cada vez maiores para o feijão-caupi (136,11%) e feijão-caupi cozido (744,74%) quando comparados ao suco de laranja (31,87%), indicando que o tratamento térmico melhorou a bioacessibilidade dos fenólicos do feijão-caupi. A capacidade antioxidante variou bastante, mas foi maior na fase intestinal para o feijão-caupi cozido e amostra de codigestão, e interações sinérgicas polifenol-polifenol ou polifenol-proteína podem ter contribuído para esse efeito, particularmente, nessas amostras. A combinação de suco de laranja com feijão-caupi cozido digerido simultaneamente promoveu maior teor de alguns fenólicos bioacessíveis do que essas amostras isoladas. O aumento de fenólicos com propriedades antioxidantes provenientes de interações entre polifenóis bioacessíveis de um suco de frutas e feijão-caupi na fase final da simulação gastrointestinal fornece base científica para aplicação de codigestão em estudos futuros relacionados à saúde.

1 INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados em plantas. Eles são caracterizados pelos grupos hidroxila nos anéis aromáticos e categorizados em diferentes classes de acordo com sua diversidade estrutural como fenóis simples, ácidos fenólicos, flavonóides, xantonas, estilbenos e lignanas (VUOLO; LIMA; MARÓSTICA JUNIOR, 2019). O conteúdo fenólico dos alimentos vegetais pode variar de acordo com fatores como gênero, espécie, cultivares, estágio de desenvolvimento, além de elementos ambientais e agrônômicos como temperatura, solo, umidade, radiação UV e insetos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; NEUGART *et al.*, 2018). Nas plantas, eles estão envolvidos em várias atividades biológicas, como germinação de sementes, em mecanismos de defesa sob condições de estresse como seca, infecção patogênica ou salinidade e contribuem para a estabilidade oxidativa, cor e sabor dos alimentos vegetais (ALBERGARIA; OLIVEIRA; ALBUQUERQUE, 2020; CHEYNIER, 2012; KOLTON *et al.*, 2022; TANASE; BUJOR; POPA, 2019).

Em humanos, a ingestão de compostos fenólicos está relacionada a benefícios à saúde, como efeitos protetores contra câncer e doenças cardiovasculares, propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-hipertensivas (MARTINS; BARROS; FERREIRA, 2016; SHAHIDI;

AMBIGAIPALAN, 2015; SINGH *et al.*, 2017a, 2017b). No entanto, os benefícios para a saúde derivados dos polifenóis dietéticos dependem de sua bioacessibilidade, ou seja, a extensão em que o composto ingerido é liberado de sua matriz alimentar e fica disponível para absorção no intestino (MCCLEMENTS; LI; XIAO, 2015). Sendo afetado pela ação enzimática durante as fases de digestão, processamento térmico e interações da matriz alimentar (BARBA *et al.*, 2017; LAFARGA *et al.*, 2019, LINDEMANN *et al.*, 2021; NAIR; AUGUSTINE, 2018; NDERITU *et al.*, 2013). Geralmente, uma pequena porção dos compostos fenólicos está disponível para absorção no intestino, apesar da alta quantidade desses constituintes na matéria-prima, reforçando a importância dos estudos de digestão e bioacessibilidade (LINDEMANN *et al.*, 2021).

O suco de laranja é comumente consumido em todo o mundo, principalmente durante as refeições (LIU; HEYING; TANUMIHARDJO, 2012). Além do bom sabor e aroma cítrico, o suco de laranja tem sido reconhecido como fonte de energia e nutrientes promovendo benefícios à saúde por conter compostos bioativos como flavonóides (GIL-IZQUIERDO *et al.*, 2001; KELEBEK; CANBAS; SELLI, 2008; KHAN; ZILL-E-HUMA; DANGLES, 2014). Outro constituinte comum nas refeições são as leguminosas como o feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) amplamente consumido na África, América Latina e Ásia (GONÇALVES *et al.*, 2016; PHILLIPS *et al.*, 2003). Este grão é rico em proteínas, amido e fibras, sendo uma boa fonte de ácidos fenólicos, flavonóides, antocianinas e proantocianidinas (CAI; HETTIARACHCHY; JALALUDDIN, 2003; MOREIRA-ARAÚJO *et al.*, 2018; NDERITU *et al.*, 2013; TEKA *et al.*, 2020).

Em todo o mundo, considera-se que uma refeição saudável é composta por um alimento fonte de proteína, grãos e vegetais, e muitas vezes é acompanhada de uma bebida de frutas. Sabe-se que as interações entre nutrientes e outros constituintes dos alimentos podem melhorar os potenciais benefícios à saúde quando comparados apenas às suas ações individuais devido à sinergia alimentar (JACOBS; GROSS; TAPSELL, 2009). Isso é bem conhecido pela absorção de ferro na presença de vitamina C, por exemplo. As interações complexas da matriz alimentar ocorrem normalmente durante a digestão gastrointestinal, *in vivo* e *in vitro*, afetando a bioacessibilidade e, portanto, a biodisponibilidade dos compostos alimentares. Essas interações podem atuar em polifenóis que podem ter suas estruturas químicas, ligantes ionizáveis e estado de polimerização afetados por variações nas condições ácido-básicas, atividade enzimática e sinergismo fenólico (ZEHFUS *et al.*, 2021), como ocorre durante a estimulação gastrointestinal. O modelo de digestão *in vitro* tem se mostrado útil para acessar a bioacessibilidade de polifenóis alimentares, como feijão-comum, por exemplo (ROSSI *et al.*, 2022), embora existam poucas

informações publicadas sobre o conteúdo de compostos fenólicos no caso de codigestão, particularmente de uma bebida de frutas com um alimento à base de proteínas. Neste trabalho, fornecemos dados sobre sinergismo polifenólico e propriedades antioxidantes de polifenóis de suco de laranja e feijão-caupi nos eventos que precedem a absorção intestinal usando o modelo *in vitro* de codigestão. Para melhor estudar a codigestão *in vitro* dessas duas matrizes alimentares complexas, também foram avaliados os efeitos do cozimento e da extração por solvente em feijão-caupi.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES

Enzimas α -amilase de *Aspergillus oryzae*, pepsina de mucosa gástrica suína, pancreatina de pâncreas suíno, ABTS [2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolína-6- ácido sulfônico)], Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetra-metilcroman-2-carboxílico), Folin-Ciocalteu e compostos fenólicos padrão foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Todos os solventes cromatográficos usados para análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) eram de grau CLAE.

2.2 AMOSTRAS

A cultivar de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), denominada BRS Aracê, foi fornecida pela Embrapa Meio-Norte. Foi cultivada sob condições irrigadas, no campo experimental da Embrapa Meio-Norte, Teresina (Latitude: 5° 5 ' 21 " Sul, Longitude: 42° 48 ' 6 " Oeste, Altitude: 87 metros), Piauí, Brasil. Frutos de laranja (*Citrus sinensis*), variedade Pera, foram obtidos no mercado local de São Miguel do Oeste, Santa Catarina, Brasil.

2.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

O suco de laranja (SL) foi extraído usando uma máquina extratora automática (Skymesen, Santa Catarina, Brasil). O feijão-caupi cru (FC) foi moído em moinho analítico (IKA, Staufen, Alemanha). Amostras de feijão-caupi cozido (FZ) foram preparadas pesando 100 g de grãos de feijão-caupi e cozidas em 500 mL de água destilada, sem imersão e pressão, durante 45 min. Em seguida, os grãos cozidos ainda quentes foram moídos com a água do

cozimento em moinho analítico. Todas as amostras foram preservadas em tubos plásticos a -20°C até o momento das análises, onde foram analisados em temperatura ambiente (21°C). Para os experimentos de codigestão, suco de laranja mais feijão-caupi cozido (FZ+SL) foram misturados na proporção 1:1 (p/p) (de modo a representar uma refeição) e submetidos ao procedimento de digestão *in vitro*.

2.4 CARACTERIZAÇÃO DO SUCO DE LARANJA

O pH foi medido com um pHmetro (MS Tecnoyon, São Paulo, Brasil); A acidez titulável (expressa em g de ácido cítrico/100 mL de suco) foi medida por titulação volumétrica com NaOH 0,1 mol/L; Os sólidos solúveis totais ($^{\circ}\text{Brix}$) foram medidos usando um refratômetro digital (Atago, São Paulo, Brasil); O índice de maturidade foi calculado a partir da relação $^{\circ}\text{Brix}$ /acidez segundo Kimball (1999), e o ácido ascórbico foi determinado pela reação de Tillmans (AOAC, 1990). Todas as medições foram realizadas em triplicata.

2.5 DIGESTÃO *IN VITRO*

A simulação gastrointestinal foi realizada utilizando o protocolo internacional consensual descrito por Minekus *et al.* (2014). Os experimentos de codigestão foram realizados para feijão-caupi mais suco de laranja usando o mesmo protocolo. A digestão do feijão-caupi cru, feijão-caupi cozido e feijão-caupi cozido mais suco de laranja ocorreu em três fases, sendo elas oral, gástrica e intestinal. De acordo com o protocolo internacional, quando uma amostra líquida é submetida à simulação gastrointestinal a fase oral é opcional, portanto, neste estudo as amostras de suco de laranja foram submetidas apenas às fases gástrica e intestinal.

As amostras foram pesadas (2,5 g para amostras individuais e 1,25 g de cada para a amostra de codigestão) em tubos de propileno e colocadas em banho-maria com agitação termostática (Lucadema, São Paulo, Brasil) a 37°C e 100 rpm. As fases de digestão foram realizadas sequencialmente adicionando fluidos de digestão (salivar, gástrico e intestinal) e alterando as condições do meio. Para a fase oral, amostras sólidas foram misturadas com fluido salivar composto pela enzima α -amilase (75 U/mL) em pH 7,0, com proporção final de 50:50 (p/v). A fase oral foi realizada por 2 min. Em seguida, as amostras de digestão foram submetidas à fase gástrica adicionando às misturas orais o fluido gástrico (pH 3,0) composto por pepsina (2000 U/mL) e CaCl_2 (0,075 mol/L). As amostras foram mantidas em banho termostático por 2 h para completar a digestão gástrica. Posteriormente, fluido intestinal contendo CaCl_2 (0,3

mol/L) e pancreatina (800 U/mL) (pH 7,0) foi adicionado às amostras de digestão que foram novamente incubadas por 2 h (37 °C, 100 rpm).

Ao final de cada fase, tubos com amostras foram coletados, centrifugados a 3000g por 10 min e o sobrenadante foi retirado como amostra digerida da respectiva fase de digestão. As amostras digeridas foram congeladas a -80°C.

2.6 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL

O extrato aquoso foi obtido de acordo com Lima *et al.* (2004) com modificações. No procedimento, 1 g de cada amostra moída (FC, FZ e FZ+SL) foi infundida em 5 mL de água destilada por 40 min a 40°C, em seguida as amostras foram centrifugadas a 3000g por 10 min, o sobrenadante foi retirado como um extrato aquoso e o precipitado foi resubmetido à mesma extração inicial, de modo que o segundo sobrenadante foi combinado ao primeiro e armazenado a -80°C, no escuro.

A extração com metanol foi realizada de acordo com Laparra, Glahn e Miller (2008), para comparar o efeito dos solventes de extração, 2 g de cada amostra moída (FC, FZ e FZ+SL) foram extraídas com 5 mL de metanol acidificado (HCl 1,0 M, 85:15, v/v) por 1 h a 21°C. Os tubos contendo a mistura foram centrifugados a 3000g por 10 min. Em seguida, os sobrenadantes foram colocados em frascos de vidro âmbar e armazenados a -80°C.

O conteúdo fenólico total (CFT) em extratos aquosos e metanólicos, amostras digeridas e suco de laranja foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965). O ácido gálico foi usado como padrão e os fenólicos totais foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico em 100 g de amostra (mg GAE/100 mL).

2.7 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante (CA) das amostras foi medida pelo método ABTS de sequestro de radicais livres e pelo método do poder antioxidante redutor férrico (FRAP).

O método ABTS foi determinado de acordo com Rufino *et al.* (2007) e Seraglio *et al.* (2017), Trolox foi usado como padrão e os resultados foram expressos como μM Trolox em 1 g de amostra (μM trolox/g). O método FRAP foi realizado conforme descrito por Rufino *et al.* (2006) e Seraglio *et al.* (2018), os resultados foram expressos em μmol de sulfato ferroso em 1 g de amostra (μM Fe(II)/g), utilizando sulfato ferroso heptahidratado como padrão.

2.8 ÍNDICE DE BIOACESSIBILIDADE

O índice de bioacessibilidade (IB) foi utilizado para avaliar o efeito da digestão *in vitro* na composição fenólica das amostras. O IB foi calculado usando a Eq. 1 (ORTEGA *et al.*, 2011).

$$IB (\%) = \frac{A}{B} * 100 \quad (1)$$

A é o conteúdo fenólico ou capacidade antioxidante no final da fase intestinal e B é o conteúdo fenólico ou capacidade antioxidante antes da digestão *in vitro*, no extrato aquoso.

2.9 AVALIAÇÃO DE SINERGISMO

A avaliação do sinergismo por diferença (ASD) no curso da codigestão *in vitro* de feijão-caupi cozido (FZ) e suco de laranja (SL) foi calculada usando a Eq. 2 (REBER; EGGETT; PARKER, 2011) pela subtração da soma da capacidade antioxidante média ou a concentração média de compostos fenólicos das amostras individuais digeridas sozinhas da capacidade antioxidante média ou da concentração média de compostos fenólicos resultantes da codigestão das amostras (FZ+SL). O sinergismo também foi expresso em porcentagem de sinergismo usando equação 3 (% S).

$$ASD = (\text{Combinação FZ + SL}) - (\text{FZ individual} + \text{SL individual}) \quad (2)$$

$$\% S = (\text{Combinação FZ + SL}) / (\text{FZ individual} + \text{SL individual}) \times 100 \quad (3)$$

2.10 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLAE

A análise cromatográfica foi realizada em um cromatógrafo líquido Agilent (St. Clara, CA, EUA) equipado com um sistema de bomba quaternária (G1311C) e detector de arranjo de diodos (DAD) (G1316A). A separação analítica foi realizada em pré-coluna (4,6 mm x 50 mm x 5 µm) e coluna de fase reversa (4,6 mm x 250 mm x 5 µm) Phenomenex (Torrance, CA, EUA). O sistema foi controlado pelo software Agilent Lab Advisor. As amostras digeridas e o extrato aquoso foram filtrados através de um filtro de membrana hidrofílica de tamanho de poro de 0,2 µm, os extratos metanólicos foram filtrados através de um filtro de membrana hidrofóbica de tamanho de poro de 0,45 µm e 10 µL foram injetados diretamente no sistema cromatográfico. A fase móvel consistiu em água: ácido acético (98:2 v/v) (A) e água:

acetonitrila: ácido acético (58:40:2 v/v/v) (B), a vazão foi de 0,7 mL/ min. As eluições foram realizadas utilizando o gradiente linear: 0–70% B em 55 min, 70–100% B em 15 min, e retornando a 0% B por 10 min, para amostras com feijão-caupi. E para as amostras de suco de laranja, as eluições foram realizadas usando o gradiente linear: 0–60% B em 55 min, 60–100% B em 15 min, e retornando a 0% B por 10 min. A detecção foi realizada a 280 nm para ácido gálico, (+)-catequina, tirosol, ácido 4-hidroxibenzóico, (-)-epicatequina, ácido vanílico, ácido siríngico, taxifolina, naringenina, naringina e hesperidina, 320 nm para ácido clorogênico, cafeico ácido, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e apigenina e 360 nm para rutina, miricetina, quercetina e kaempferol.

Os compostos fenólicos individuais foram identificados e quantificados por comparação dos picos dos analitos com suas respectivas curvas de calibração das soluções padrão.

2.11 ESTATÍSTICA

O software utilizado foi o STATISTICA versão 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de três repetições. O fato da amostra de codigestão conter 50% de suco e 50% de feijão-caupi foi levado em consideração nos cálculos. Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os resultados foram determinadas por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para três ou mais amostras ou teste t de Student para duas amostras.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUCO DE LARANJA

As propriedades físico-químicas do suco de laranja são apresentadas na Tabela 1. Parâmetros como pH, acidez, sólidos solúveis totais (SST) e índice de maturidade são determinantes para o sabor e aceitabilidade dos sucos, bem como estão relacionados com a estabilidade dos compostos bioativos (JANZANTTI; MACHADO; MONTEIRO, 2011; KIM *et al.*, 2013). Além disso, a vitamina C é considerada a principal contribuinte para o potencial antioxidante dos sucos de laranja (SANCHEZ-MORENO *et al.*, 2003). A composição observada na amostra em estudo está de acordo com estudos anteriores (BARROS; FERREIRA; GENOVESE, 2012; MENNAH-GOVELA; BORNHORST, 2017; NIU *et al.*,

2008) e pequenas variações foram ocasionadas por influências de fatores intrínsecos e ambientais (BARRY *et al.*, 2003).

Tabela 1 - Caracterização físico-química de suco de laranja.

	pH	Acidez ^a	Sólidos totais solúveis ^b	Índice de maturidade ^c	Vitamina C ^d
Suco de laranja	3,87 ± 0,01	0,52 ± 0,00	10,23 ± 0,05	19,58 ± 0,05	29,94 ± 2,11

Os valores são a média de três determinações independentes ± desvio padrão. ^aAcidez (g ácido cítrico/100 mL); ^bSST (°Brix); ^cÍndice de maturidade (Brix/Acidez); ^dVitamina C (mg de ácido ascórbico/100 mL).

3.2 CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

O conteúdo fenólico total (CFT) das amostras antes e após cada fase da digestão *in vitro* é mostrado na Tabela 2. A capacidade antioxidante (CA) foi medida pelos métodos ABTS e FRAP e os resultados também são mostrados na Tabela 2. A digestão do suco de laranja sozinho apresentou uma diminuição do conteúdo polifenólico durante o curso da digestão *in vitro*, resultando em um índice de bioacessibilidade de 31,87%. Isso é semelhante aos valores de IB relatados para a digestão de laranja e outras frutas cítricas (DE ANCOS *et al.*, 2017; QUAN *et al.*, 2018). Observamos que o CFT diminuiu nesta amostra ao atingir o final da fase intestinal. Isso é normalmente esperado na digestão de polifenóis, mas a extensão desse decaimento, no entanto, é variável e depende da bioacessibilidade dos compostos polifenólicos em uma determinada matriz alimentar. Outra razão para a diminuição do CFT na fase intestinal está relacionada à sensibilidade dos compostos polifenólicos em condições de pH alcalino (QUAN *et al.*, 2018; RODRÍGUEZ-ROQUE *et al.*, 2013; SAURA-CALIXTO; SERRANO; GOÑI, 2007). A CA medida pelo FRAP também diminuiu, o que é consistente com resultados obtidos por De Ancos *et al.* (2017) e Mennah-Govela & Bornhorst (2017). Segundo Alves *et al.* (2017) e Teka *et al.* (2020) existe uma associação entre CFT, ácido ascórbico e atividade antioxidante, de modo que a diminuição do CFT após a digestão pode influenciar na diminuição da CA.

Leguminosas como feijão-caupi não são comumente consumidas cruas, pois contêm antinutrientes (VASCONCELOS *et al.*, 2010), por isso é importante investigar os efeitos do cozimento sobre o conteúdo fenólico e atividade antioxidante. Os resultados da Tabela 2 mostram que o cozimento promoveu uma diminuição significativa dos valores de CFT, e para ambos os solventes de extração. O mesmo efeito negativo foi observado na atividade antioxidante (Tabela 2). Este efeito observado para o cozimento de amostras de feijão-caupi

está de acordo com relatos anteriores (AVANZA *et al.*, 2013; MTOLO; GERRANO; MELLEM, 2017; YADAV *et al.*, 2018). Espera-se que o processamento térmico possa causar reações físicas e químicas de fenólicos, incluindo lixiviação de fenólicos solúveis em água e degradação, quebra e transformação de compostos fenólicos, como reação de Maillard por exemplo, ou geração de complexos com proteínas e carboidratos (MAGHSOUDLOU; ASGHARI GHAJARI; TAVASOLI, 2019; XU; CHANG, 2008). Além disso, o cozimento promove a gelatinização do amido presente no feijão-caupi, que ao ser analisado frio permitiu a retrogradação desse amido, tornando-o resistente a digestão e ocasionando o aprisionamento de compostos fenólicos. Este fato, aliado a inibição da enzima amilase por fenólicos presentes na matriz alimentar, que também dificulta a digestão do amido e posterior liberação de conjugados amido-fenólicos (LINDEMANN *et al.*, 2021; ALEIXANDRE e ROSELL, 2022) corroboram com a redução de CFT observada. A redução da bioacessibilidade de fenólicos no feijão-caupi cozido, por degradação, quebra e transformação, ou geração de complexos com proteínas e carboidratos ocasionou a diminuições consistentes nos valores de CA medidos, que pode estar relacionado com a associação entre CFT, ácido ascórbico e atividade antioxidante, de modo que a diminuição do CFT após o cozimento ocasionou a diminuição da CA (ALVES *et al.*, 2017; TEKA *et al.*, 2020).

O teor total de fenólicos cítricos foi reduzido em 68,1% durante a passagem para a fase intestinal. O mesmo não foi observado para as amostras de feijão-caupi onde os valores de CFT e atividade antioxidante foram consistentemente aumentados das amostras não digeridas para as amostras orais, gástricas e intestinais, independentemente da codigestão. Estudos anteriores também relataram melhorias nos valores de CFT e CA após simulação gastrointestinal (HACHIBAMBA *et al.*, 2013; MTOLO; GERRANO; MELLEM, 2017). Componentes da matriz alimentar podem proporcionar estabilidade em diferentes condições de pH durante o processo de digestão, e a ação de enzimas e condições de pH podem promover a hidrólise de macromoléculas, permitindo a liberação de compostos fenólicos previamente conjugados a essas macromoléculas, como proteínas e carboidratos, ou ainda liberação de peptídeos bioativos com capacidade antioxidante (DANTAS *et al.*, 2019; DUTRA *et al.*, 2017; HACHIBAMBA *et al.*, 2013; MTOLO; GERRANO; MELLEM, 2017; THAKUR *et al.*, 2020). Esse aumento no CFT também pode ser influenciado pela formação e liberação de outros compostos redutores, durante a digestão, como peptídeos e ácido ascórbico, haja visto que o método de CFT é uma medida de capacidade redutora, e pode sofrer interferências de compostos que não sejam os fenólicos (SÁNCHEZ-RANGEL *et al.*, 2013).

Tabela 2 - Teor fenólico total (mg GAE/100mL ou g) e capacidade antioxidante de suco de laranja, feijão-caupi cru, feijão-caupi cozido e feijão-caupi cozido + suco de laranja antes e após cada fase da digestão *in vitro*.

Amostra	Fase da digestão	CFT		ABTS	FRAP
		(mg GAE/100mL or g)	IB (%)		
Suco de laranja	Antes	100,95 ^{aB} ± 2,47	31,87 ^D	3,41 ^{bC} ± 0,00	7,55 ^{aB} ± 0,71
	Gástrica	46,95 ^{bC} ± 2,44		1,74 ^{cB} ± 0,07	4,00 ^{bC} ± 1,01
	Intestinal	32,17 ^{cC} ± 0,42		4,54 ^{aC} ± 0,12	1,58 ^{cC} ± 0,01
Feijão-caupi cru	Antes (extrato aquoso)	136,76 ^{dA} ± 5,35	136,11 ^C	9,90 ^{aA} ± 0,54	12,88 ^{aA} ± 0,02
	Antes (extrato metanólico)	70,42 ^{cC} ± 6,27		5,82 ^{bB} ± 0,39	5,59 ^{dC} ± 0,99
	Oral	220,06 ^{aA} ± 0,33		6,83 ^{bA} ± 0,28	6,76 ^{cdA} ± 0,06
	Gástrica	200,08 ^{bA} ± 4,88		2,55 ^{cA} ± 0,18	8,08 ^{bcA} ± 0,74
	Intestinal	186,14 ^{cA} ± 11,15		6,93 ^{abC} ± 1,14	9,92 ^{bA} ± 0,15
Feijão-caupi cozido	Antes (extrato aquoso)	17,21 ^{cE} ± 2,11	744,74 ^A	2,59 ^{bC} ± 0,48	2,99 ^{bD} ± 0,01
	Antes (extrato metanólico)	12,32 ^{cE} ± 2,92		2,13 ^{bCD} ± 0,02	1,48 ^{cd} ± 0,00
	Oral	17,62 ^{cC} ± 1,43		2,22 ^{bB} ± 0,01	1,37 ^{cC} ± 0,02
	Gástrica	41,62 ^{bC} ± 6,45		1,90 ^{bB} ± 0,00	1,47 ^{cC} ± 0,06
	Intestinal	128,18 ^{aB} ± 2,86		14,90 ^{aA} ± 1,37	5,28 ^{aB} ± 0,01
Feijão-caupi cozido + suco de laranja	Antes (extrato aquoso)	71,09 ^{cC} ± 3,04	273,79 ^B	1,34 ^{dD} ± 0,57	8,33 ^{aB} ± 1,00
	Antes (extrato metanólico)	39,79 ^{dD} ± 1,27		2,78 ^{bC} ± 0,10	7,02 ^{aB} ± 1,08
	Oral	39,44 ^{dB} ± 0,70		2,10 ^{cB} ± 0,03	4,38 ^{bB} ± 0,03
	Gástrica	107,33 ^{bB} ± 8,42		0,81 ^{eC} ± 0,16	7,26 ^{aB} ± 0,16
	Intestinal	194,64 ^{aA} ± 6,87		12,79 ^{aB} ± 2,27	4,70 ^{bB} ± 0,11

IB: Índice de bioacessibilidade. Os valores são a média de três determinações independentes ± desvio padrão. Diferentes letras minúsculas representam diferença significativa entre amostras não digeridas, fases oral, gástrica e intestinal para uma mesma amostra. Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa entre as amostras para cada fase de digestão ou para amostras não digeridas. Para o IB, letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística significativa entre as amostras. (teste de Tukey. $p \leq 0,05$).

Considerando a capacidade antioxidante, observamos que não houve uma tendência particular em aumentar ou diminuir seus valores em suco, feijão-caupi cru e cozido ou amostras de codigestão. Os valores de CA foram principalmente variáveis entre as fases de digestão e matrizes alimentares, mas foram visivelmente maiores na fase intestinal para a amostra de codigestão (12,79 μM trolox/g) e a amostra de feijão-caupi cozido (14,90 μM trolox/g). Embora haja uma correlação entre a capacidade antioxidante, teor de fenólicos totais e ácido ascórbico, é importante ressaltar que as medidas de CA não representam uma mera soma dos potenciais antioxidantes de compostos isolados, mas também consideram suas interações sinérgicas (PELLEGRINI *et al.*, 2003). De fato, isso poderia explicar a discrepância nos valores de CA observados, e também os altos aumentos observados nessas duas amostras em particular, uma submetida ao aquecimento e a outra à codigestão com um suco de fruta rico em vitamina C e fenólicos. Esta seria a primeira evidência de interações sinérgicas observadas nestas amostras e que poderiam ser eliciadas mais provavelmente a partir de interações polifenol-polifenol, polifenol-proteína ou ainda proteína-carboidrato através da reação de Maillard.

O feijão-caupi é uma matriz alimentar rica em proteínas e carboidratos complexos, considerando os resultados, descobriu-se que essas macromoléculas estão interferindo na bioacessibilidade dos polifenóis do feijão-caupi, principalmente durante as fases de simulação gastrointestinal. Por exemplo, ao considerar a passagem da fase oral para a fase final da digestão, os aumentos obtidos no teor de fenólicos totais foram de 627% para a digestão do feijão-caupi cozido e de 393% para as amostras de codigestão. Os ganhos no teor de polifenóis foram mais pronunciados no caso de amostras de feijão-caupi cozido. Ao considerar apenas as amostras aquosas, na última fase da digestão os valores de CFT aumentaram 644% para as amostras de feijão-caupi cozido e 173% para as amostras de codigestão. Para o feijão-caupi cru, o aumento foi de apenas 36%, o que sugere que o tratamento térmico em amostras cozidas contribuiu para interações proteínas-fenólicos e amido-fenólicos. Zeng *et al.* (2020) relataram que a gelatinização do amido promovida pelo cozimento, aliada a digestão, promove a liberação do complexo amido-fenólicos, resultando em aumento de CFT, bem como atividade antioxidante, fator esse não observado antes da digestão. O calor também modifica as estruturas compactas do grão, o que favorece o acesso das proteases às proteínas, promovendo a liberação de compostos fenólicos conjugados (SANGSUKIAM E DUANGMAL, 2022).

As mudanças observadas para os fenólicos cítricos e de feijão-caupi durante a digestão, ou seja, as mudanças em suas concentrações quando submetidas a diferentes condições de meio nas fases oral, gástrica e intestinal, foram refletidas pelos índices de bioacessibilidade das amostras, que foram cada vez mais elevados para amostras de feijão-caupi e feijão-caupi cozido

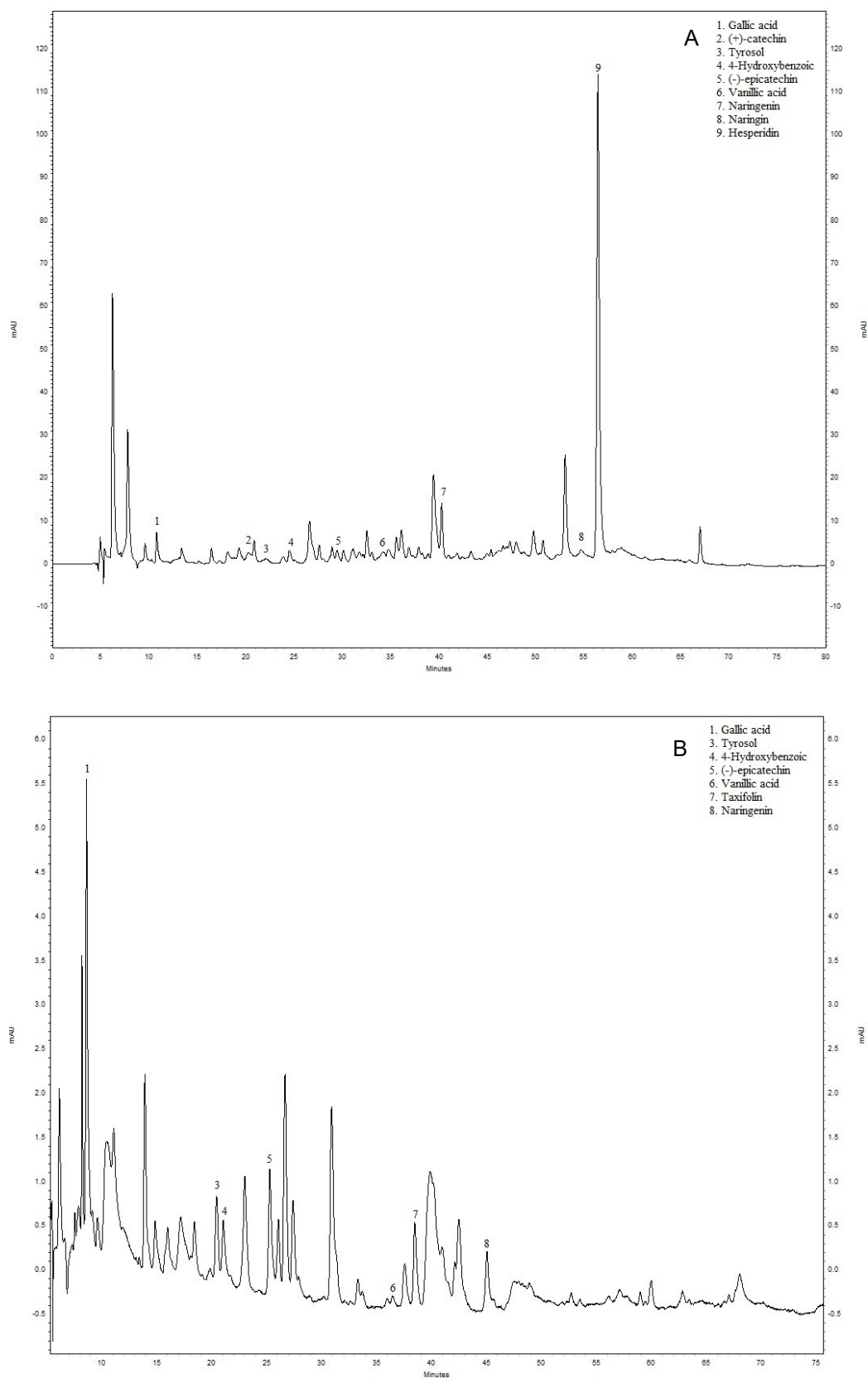
quando comparado com a amostra de suco de laranja sozinho (31,87%). O valor de IB para feijão-caupi cozido (744,74%) e feijão-caupi cozido + suco de laranja (273,79%) foi pronunciadamente superior ao da amostra crua (136,11%), indicando que o tratamento térmico afetou positivamente a bioacessibilidade dos fenólicos do feijão-caupi. Levando em consideração a amostra de codigestão, os resultados mostraram que o IB foi bastante diminuído em comparação com a amostra de feijão-caupi cozido. Ao contrário dessa constatação, seria de se esperar o contrário no caso de codigestão com suco de laranja, um suco de fruta rico em fenólicos. Ao estudar a digestão do feijão-caupi, foi relatado anteriormente que os complexos fenólico-peptídeo são formados durante a digestão no intestino superior do feijão-caupi processado (APEA-BAH *et al.*, 2021). Isso poderia explicar a redução do valor de IB para a amostra de codigestão, mesmo na presença de uma quantidade praticamente maior de polifenóis (FZ+SL). Entretanto ao avaliar o teor de CFT em cada fase de digestão da amostra codigerida e levar em conta que a amostra possui 50% do teor de feijão-caupi existente na amostra de feijão-caupi cozido, bem como 50% do teor de suco de laranja existente na amostra, percebe-se que há um teor maior de compostos fenólicos na amostra FZ+SL, indicando sinergismo das amostras. O que provavelmente tenha ocorrido em função do pH do suco ter contribuído com a redução do pH da fase gástrica, melhorando a atividade da pepsina, e promovendo maior digestão das proteínas, ocasionando maior liberação de peptídeos com capacidade redutora.

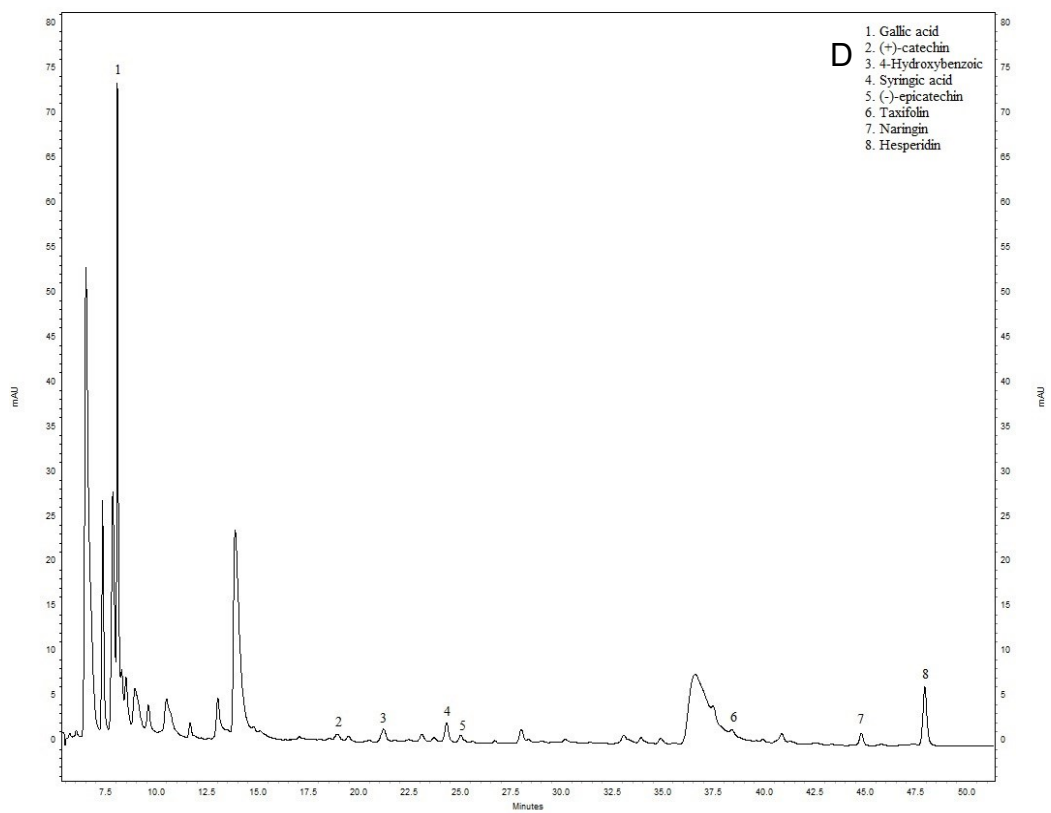
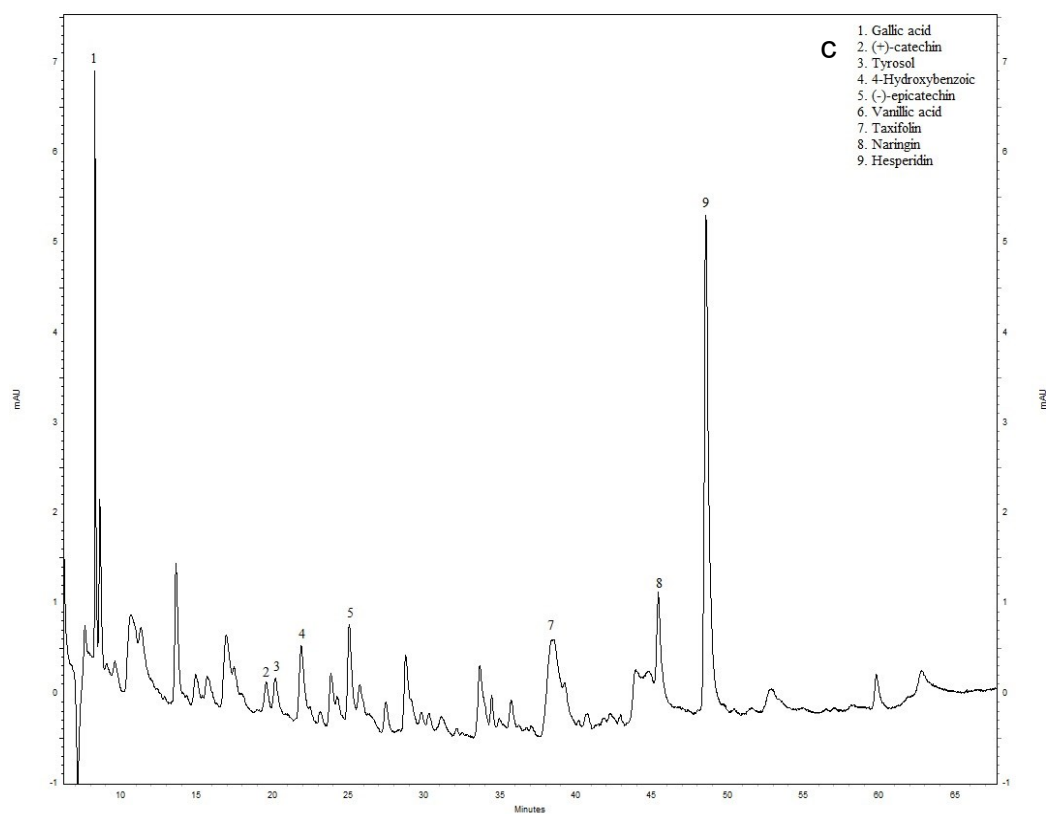
A partir do exposto, descobriu-se que não apenas os compostos fenólicos, mas também as proteínas e o amido do feijão-caupi estavam envolvidas nas interações dos componentes alimentares durante a codigestão *in vitro*, e que isso poderia levar a algum sinergismo entre os fenólicos do suco de laranja e do feijão-caupi. Para entender melhor essas interações, avaliou-se ainda mais os efeitos da digestão *in vitro* nos compostos fenólicos individuais das amostras.

3.3 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS INDIVIDUAIS

Cromatogramas representativos de compostos polifenólicos identificados em 280 nm em amostras não digeridas e amostras de codigestão no final da fase intestinal são apresentados na Figura 1.

Figura 1 - Cromatograma CLAE-DAD representativo de suco de laranja não digerido (A), feijão-caupi cozido não digerido (B), amostra de codigestão não digerida (FZ+SL) (C) e amostra de codigestão no final da fase intestinal (D). A detecção foi realizada a 280nm.





3.3.1 Efeitos da extração e cozimento na composição fenólica

Os efeitos dos solventes de extração (água e metanol acidificado) e do cozimento sobre os fenólicos individuais podem ser comparados na Tabela 3. Observamos que o tipo e a polaridade do solvente foram determinantes para a extração de polifenóis nas amostras e que o feijão-caupi continha mais compostos polares do que os compostos apolares, uma vez que uma maior quantidade de compostos fenólicos foi detectada nos extratos aquosos. Metrouh-amir, Duarte e Maiza (2015) também observaram que a polaridade do solvente afeta o rendimento de compostos fenólicos e de acordo com Herrera-Pool *et al.* (2021) solventes de alta polaridade costumam ser mais eficazes para a recuperação desses compostos.

Tabela 3 - Composição fenólica do feijão-caupi antes e após o cozimento extraído por solventes aquosos e metanólicos acidificados.

Compostos (mg/100g)	Feijão-caupi cru		Feijão-caupi cozido	
	Extrato aquoso	Extrato metanólico	Extrato aquoso	Extrato metanólico
<i>Ácidos fenólicos</i>				
Ácido 4- hidroxibenzóico	4,33 ^{bA} ± 0,02	4,96 ^{aA} ± 0,23	0,41 ^{aB} ± 0,00	0,87 ^{aB} ± 0,01
Ácido gálico	14,84 ^{aA} ± 3,41	3,51 ^{bA} ± 0,02	4,28 ^{aB} ± 0,02	2,80 ^{bB} ± 0,03
Ácido siríngico	4,79 ^a ± 0,20	4,92 ^{aA} ± 0,08	nd	1,54 ^B ± 0,02
Ácido vanílico	2,35 ^{aA} ± 0,15	1,85 ^{bA} ± 0,05	0,13 ^{bB} ± 0,00	0,41 ^{aB} ± 0,00
Ácido cafeico	8,69 ^{aA} ± 0,34	5,84 ^{bA} ± 0,07	2,82 ^{aB} ± 0,03	1,86 ^{bB} ± 0,00
Ácido clorogênico	9,84 ^{aA} ± 0,42	9,12 ^{bA} ± 0,34	2,13 ^{bB} ± 0,03	2,42 ^{aB} ± 0,14
Ácido ferúlico	1,96 ^{aA} ± 0,07	1,53 ^{bA} ± 0,08	0,69 ^{aB} ± 0,03	0,34 ^{bB} ± 0,01
Ácido <i>p</i> -cumárico	3,70 ^a ± 0,12	2,42 ^{bA} ± 0,05	nd	1,22 ^B ± 0,00
<i>Flavonóides</i>				
(-)-epicatequina	23,72 ^{aA} ± 0,03	4,82 ^{bA} ± 0,03	4,65 ^{aB} ± 0,15	2,07 ^{bB} ± 0,03
(+)-catequina	2,42 ^b ± 0,18	6,77 ^{aA} ± 0,05	nd	0,40 ^B ± 0,05
Apigenina	nd	nd	nd	nd
Hesperidina	nd	nd	nd	nd
Kaempferol	nd	nd	nd	nd
Miricetina	7,38 ^{aB} ± 0,01	3,57 ^{bA} ± 0,02	7,60 ^{aA} ± 0,03	3,16 ^{bB} ± 0,01
Naringenina	nd	0,27 ^B ± 0,00	0,72 ^a ± 0,15	0,36 ^{bA} ± 0,00
Naringina	nd	nd	nd	4,09 ± 0,14
Quercetina	nd	nd	nd	nd
Rutina	6,11 ^{aA} ± 0,08	4,50 ^b ± 0,11	1,44 ^B ± 0,03	nd
Taxifolina	1,75 ^{aA} ± 0,03	0,80 ^{bB} ± 0,01	0,92 ^{aB} ± 0,03	0,56 ^{bA} ± 0,00
Tirosol	nd	1,10 ± 0,06	0,63 ± 0,02	nd

nd: não detectado. Os valores são a média de duas determinações independentes ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa entre os solventes de extração para uma mesma amostra.

Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa entre as amostras para um mesmo solvente de extração (teste t de Student. $p \leq 0,05$).

As leguminosas não são consumidas cruas devido aos seus fatores antinutricionais, como taninos, ácido fítico e oligossacarídeos causadores de flatulência que afetam negativamente a digestão (KHATTAB; ARNTFIELD, 2009). O cozimento é um processo comum usado para reduzir esses fatores (VASHISHTH *et al.*, 2021), mas pode afetar outros compostos, como os polifenóis, como pode ser visto na Tabela 3. A análise cromatográfica revelou que, exceto para miricetina e naringenina, as concentrações de todos os outros compostos fenólicos foram impactadas negativamente pelo cozimento para extratos aquosos e metanólicos. Diminuições nas concentrações de polifenóis após o cozimento também foram observadas para a mesma cultivar de feijão-caupi por Barros *et al.* (2017) e Barros *et al.* (2021). Giusti *et al.* (2019) relataram diferentes níveis de compostos fenólicos em leguminosas após o cozimento, mas em geral observou-se uma forte redução em suas concentrações após o tratamento térmico. O mesmo foi relatado para polifenóis em feijão comum (HACHIBAMBA *et al.*, 2013; LÓPEZ *et al.*, 2013). Esse desempenho pode estar relacionado com a destruição dos compostos, interações químicas com outras substâncias da matriz ou lixiviação de fenólicos hidrossolúveis na água de cozimento (LÓPEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2017; SURH; KOH, 2014; VOLF *et al.*, 2014; WALTER *et al.*, 2013); no entanto, após a digestão gastrointestinal pode haver maiores liberações desses compostos ou interações sinérgicas entre eles.

3.3.2 Efeitos da digestão *in vitro* na composição fenólica

As mudanças nas concentrações de compostos fenólicos individuais nas amostras antes e após a digestão *in vitro* são apresentadas na Tabela 4. As diferenças foram observadas para amostras de suco de laranja e feijão-caupi. Ácido gálico, hesperidina e quercetina foram os principais compostos fenólicos detectados no suco de laranja após a digestão. A amostra de suco de laranja apresentou redução na detecção da maioria dos compostos fenólicos ao final da fase gástrica, exceto *p*-cumárico e quercetina, bem como na fase intestinal, com exceção dos ácidos gálico e clorogênico, (-)-epicatequina e quercetina. Ácido siríngico, rutina e taxifolina não foram detectados no suco de laranja, mas puderam ser quantificados após digestão gástrica e intestinal, enquanto ácido vanílico, ferúlico e *p*-cumárico, (+)-catequina, apigenina, kaempferol, miricetina, naringenina, naringenina e tirosol foram quantificados em suco de laranja, mas não detectados após a digestão. A redução de compostos fenólicos após a fase gástrica também foi observada em um mix de suco de frutas (kiwi, laranja e abacaxi) submetido

à digestão *in vitro* por Rodríguez-Roque *et al.* (2013). Nossos resultados também concordam com Peña-Vázquez *et al.* (2022) que relataram uma redução de 25% na bioacessibilidade de fenólicos em suco de laranja doce, bem como a presença de hesperidina como principal composto antes e após a digestão. Koehnlein *et al.* (2016) sugeriram que os compostos fenólicos são protegidos contra a ação enzimática e alteração do pH durante a digestão pela matriz sólida e complexa, e em líquidos essa proteção não ocorre. A diminuição de hesperidina e naringina após a digestão pode ocorrer pelas condições alcalinas causando sua conversão em chalconas (SUN *et al.*, 2019).

No feijão-caupi cozido, observamos menor detecção de polifenóis apenas na fase oral e aumento da detecção da maioria dos compostos após as fases gástrica e intestinal. Os ácidos gálico, cafeico e clorogênico e a miricetina foram os compostos mais significativos identificados antes e após a digestão do feijão-caupi cozido. O ácido 4-hidroxibenzóico e o ácido vanílico apresentaram incrementos em suas concentrações desde o início da digestão gastrointestinal. Naringenina, rutina e tirosol foram quantificados no extrato aquoso do feijão-caupi cozido, mas não foram detectados após a digestão, enquanto o ácido siríngico, ácido p-cumárico e (+)-catequina foram quantificados apenas nas fases de digestão. Os flavonóides do feijão-caupi cozido foram identificados em maior teor após as fases gástrica e intestinal; no entanto, não ultrapassaram os níveis de pré-digestão. As concentrações de ácidos fenólicos, com exceção do ácido ferúlico, foram muito maiores na fase intestinal quando comparadas à amostra não digerida, destacando-se os índices de bioacessibilidade acima de 200% para esses compostos, a saber: 4-hidroxibenzóico, gálico, siríngico, vanílico e p -ácidos cumáricos.

Tabela 4 - Composição fenólica de suco de laranja, feijão-caupi cozido e combinação feijão-caupi + suco de laranja antes e após diferentes fases da digestão *in vitro*.

Compostos (mg/100g)	Suco de laranja				Feijão-caupi cozido					Feijão-caupi cozido + suco de laranja				
	Antes	Gástrica	Intestinal	IB (%)	Antes (extrato aquoso)	Oral	Gástrica	Intestinal	IB (%)	Antes (extrato aquoso)	Oral	Gástrica	Intestinal	IB (%)
Ácidos fenólicos														
Ácido 4-hidroxibenzóico	0,15 ^{aC} ± 0,03	nd	0,05 ^{bB} ± 0,00	33,3 ^C	0,41 ^{bB} ± 0,00	0,65 ^{bA} ± 0,05	0,85 ^{bB} ± 0,05	1,61 ^{aA} ± 0,57	392,7 ^A	1,36 ^{bA} ± 0,02	0,66 ^{cA} ± 0,20	1,71 ^{aA} ± 0,24	1,65 ^{aA} ± 0,00	121,3 ^B
Ácido gálico	0,51 ^{bC} ± 0,01	0,31 ^{cC} ± 0,01	2,06 ^{aB} ± 0,03	403,3 ^A	4,28 ^{bB} ± 0,02	1,59 ^{dB} ± 0,05	2,37 ^{cB} ± 0,31	15,64 ^{aA} ± 4,0	365,4 ^B	6,54 ^{bA} ± 0,08	2,20 ^{cA} ± 0,13	6,08 ^{bA} ± 0,58	14,1 ^{aA} ± 3,36	215,6 ^C
Ácido siríngico	nd	0,18 ^{bC} ± 0,01	0,21 ^{aC} ± 0,00	-	nd	0,92 ^{bA} ± 0,05	0,36 ^{cB} ± 0,01	2,12 ^{aB} ± 0,01	-	1,96 ^b ± 0,00	0,77 ^{cB} ± 0,05	0,77 ^{cA} ± 0,02	2,59 ^{aA} ± 0,00	132,1
Ácido vanílico	0,16 ^B ± 0,03	nd	nd	-	0,13 ^{cB} ± 0,00	0,30 ^{bA} ± 0,02	0,27 ^{bA} ± 0,10	0,59 ^a ± 0,00	453,8	0,30 ^{aA} ± 0,02	0,27 ^{aB} ± 0,02	0,32 ^{aA} ± 0,06	nd	-
Ácido cafeico	1,03 ^{aC} ± 0,00	0,28 ^{cC} ± 0,00	0,52 ^{bC} ± 0,00	50,5 ^C	2,82 ^{aB} ± 0,03	0,78 ^{dB} ± 0,04	1,34 ^{cB} ± 0,08	2,64 ^{bB} ± 0,00	93,6 ^A	6,08 ^{aA} ± 0,06	1,07 ^{dA} ± 0,05	1,57 ^{cA} ± 0,01	4,19 ^{bA} ± 0,05	68,9 ^B
Ácido clorogênico	0,27 ^{bC} ± 0,03	0,13 ^{cC} ± 0,00	0,35 ^{aC} ± 0,03	129,6 ^B	2,13 ^{bB} ± 0,03	1,56 ^{cA} ± 0,10	1,94 ^{bB} ± 0,10	3,56 ^{aB} ± 0,07	167,1 ^A	6,98 ^{aA} ± 0,20	1,82 ^{dA} ± 0,34	3,92 ^{cA} ± 0,01	5,34 ^{bA} ± 0,08	76,5 ^C
Ácido ferúlico	0,28 ^{aB} ± 0,09	0,07 ^{bC} ± 0,00	nd	-	0,69 ^{aA} ± 0,03	0,23 ^{bA} ± 0,02	0,21 ^{bB} ± 0,00	0,17 ^{cB} ± 0,00	24,6 ^B	0,13 ^{cC} ± 0,01	0,23 ^{bA} ± 0,03	0,36 ^{aA} ± 0,03	0,41 ^{aA} ± 0,05	315,4 ^A
Ácido <i>p-cumárico</i>	0,34 ^{bB} ± 0,00	0,46 ^{aC} ± 0,00	nd	-	nd	0,43 ^{bB} ± 0,02	0,75 ^{bB} ± 0,08	1,73 ^{aB} ± 0,00	-	3,88 ^{aA} ± 0,00	0,57 ^{dA} ± 0,02	1,24 ^{cA} ± 0,15	2,96 ^{bA} ± 0,02	76,3
Flavonóides														
(-)-epicatequina	0,19 ^{bC} ± 0,04	nd	0,40 ^{aC} ± 0,06	210,5 ^A	4,65 ^{aB} ± 0,15	1,22 ^{dA} ± 0,08	1,58 ^{cB} ± 0,10	2,64 ^{bB} ± 0,34	56,8 ^B	7,28 ^{aA} ± 0,21	1,01 ^{dA} ± 0,17	2,40 ^{cA} ± 0,40	4,20 ^{bA} ± 0,18	57,7 ^B
(+)-catequina	0,71 ^a ± 0,03	0,24 ^{bC} ± 0,01	nd	-	nd	0,66 ^{bA} ± 0,11	1,12 ^{aA} ± 0,15	0,91 ^a ± 0,19	-	nd	0,77 ^{aA} ± 0,09	0,86 ^{aB} ± 0,07	nd	-
Apigenina	0,44 ± 0,00	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	-
Hesperidina	11,5 ^{aB} ± 0,47	6,31 ^{bB} ± 0,17	4,24 ^{cB} ± 0,23	36,9 ^B	nd	nd	nd	nd	-	13,2 ^{aA} ± 0,49	3,89 ^d ± 0,19	8,57 ^{bA} ± 0,26	7,45 ^{cA} ± 0,82	56,4 ^A
Kaempferol	1,64 ± 0,01	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	nd	-
Miricetina	2,43 ^{aB} ± 0,03	0,80 ^{bC} ± 0,00	nd	-	7,60 ^{aA} ± 0,03	0,70 ^{dB} ± 0,01	2,75 ^{cB} ± 0,03	4,43 ^{bB} ± 0,02	58,3	nd	1,35 ^{cA} ± 0,10	3,72 ^{bA} ± 0,06	8,79 ^{aA} ± 0,04	-
Naringenina	0,46 ^C ± 0,07	nd	nd	-	0,72 ^{aB} ± 0,15	0,12 ^{bB} ± 0,00	nd	nd	-	1,59 ^{aA} ± 0,06	0,15 ^{cA} ± 0,01	0,28 ^b ± 0,00	nd	-
Naringina	0,30 ^B ± 0,01	nd	nd	-	nd	0,78 ^B ± 0,03	nd	nd	-	3,28 ^{aA} ± 0,27	0,90 ^{cA} ± 0,03	1,99 ^b ± 0,03	2,13 ^b ± 0,13	64,9
Quercetina	0,75 ^{cB} ± 0,00	1,26 ^{bB} ± 0,01	1,31 ^{aB} ± 0,06	174,7 ^A	nd	0,62 ^B ± 0,00	nd	nd	-	12,7 ^{aA} ± 0,02	1,37 ^{dA} ± 0,01	4,01 ^{cA} ± 0,00	8,89 ^{bA} ± 0,04	70,0 ^B
Rutina	nd	nd	0,11 ± 0,03	-	1,44 ^{aA} ± 0,03	0,74 ^{bA} ± 0,05	nd	nd	-	1,02 ^{aB} ± 0,09	0,54 ^{bB} ± 0,1	0,50 ^b ± 0,01	nd	-
Taxifolina	nd	0,10 ^{aC} ± 0,01	0,27 ^{bC} ± 0,00	-	0,92 ^{bA} ± 0,03	0,32 ^{dA} ± 0,00	2,29 ^{aA} ± 0,13	0,75 ^{cB} ± 0,00	81,5 ^A	3,75 ^{aB} ± 0,16	0,21 ^{dB} ± 0,01	0,64 ^{cB} ± 0,04	1,01 ^{bA} ± 0,03	26,9 ^B
Tirosol	0,14 ^C ± 0,01	nd	nd	-	0,63 ^A ± 0,02	nd	nd	nd	-	0,56 ^B ± 0,04	nd	nd	nd	-
TOTAL	21,30 ± 0,86	10,14 ± 0,22	9,52 ± 0,44		26,42 ± 0,52	11,62 ± 0,65	15,84 ± 1,15	36,78 ± 5,20		70,64 ± 1,73	17,78 ± 1,53	38,94 ± 1,96	63,68 ± 4,84	

Os valores são a média de duas determinações independentes ± desvio padrão. Diferentes letras minúsculas representam diferença significativa entre as fases de digestão de uma mesma amostra. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre as diferentes amostras para uma mesma fase da digestão ou IB (teste de Tukey. $p \leq 0,05$). IB = índice de bioacessibilidade. nd = não detectado.

Assim como o feijão-caupi cozido, a combinação de feijão-caupi cozido + suco de laranja para codigestão resultou em menor detecção no teor da maioria dos flavonóides e ácidos fenólicos na fase oral e maior identificação nas fases gástricas e intestinais. A naringenina e a rutina foram a exceção, apresentando concentrações decrescentes ao longo de toda a digestão. Narigenina e tirosol, assim como em outras amostras, foram quantificados nas amostras de codigestão antes do processo de digestão, mas não puderam ser detectados após a digestão. Mais uma vez, alguns ácidos fenólicos apresentaram níveis mais elevados na fase intestinal do que antes da digestão, como os ácidos 4-hidroxibenzóico, gálico, siríngico e ferúlico e a miricetina, este último não foi detectado antes da digestão. De acordo com Hachibamba *et al.* (2013) e Koehnlein *et al.* (2016) a matriz alimentar pode apresentar um efeito protetor sobre os compostos fenólicos através das condições digestivas. Além disso, a hidrólise de macromoléculas e consequente liberação de fenólicos pode ocorrer pela ação de enzimas presentes nos meios de digestão e de acordo com as condições de pH aplicadas (ácido e alcalino) nas diferentes fases da digestão *in vitro*. Os maiores valores de IB ao final da codigestão foram obtidos para os fenólicos: ácido ferúlico (315,4%), ácido gálico (215,6%), ácido siríngico (132,1%) e ácido 4-hidroxibenzóico (121,3%), dentre estes, apenas o ácido siríngico apresentou maior IB na amostra co-digerida do que na amostra isolada. A baixa bioacessibilidade de outros flavonóides, bem como a diminuição do IB da amostra de codigestão em relação às matrizes individuais, pode ser explicada pelas interações e complexos formados entre compostos fenólicos e proteínas ou outras macromoléculas presentes nas amostras (APEA-BAH *et al.*, 2021; DIEZ-SÁNCHEZ; QUILES; HERNANDO, 2021). Particularmente para a hesperidina, que não ocorre naturalmente no feijão e não foi detectada em amostras de feijão-caupi, descobrimos que após a codigestão suas concentrações aumentaram significativamente nas fases gástrica e intestinal, elevando seu valor de IB até 52,8%. Isso implica que interações de matriz ou sinergismo de compostos levaram a favorecer a bioacessibilidade deste polifenol. Embora inferior, foi possível verificar que a codigestão de suco de laranja e feijão-caupi permitiu uma bioacessibilidade relevante para 13 dos 20 compostos fenólicos encontrados nas amostras, revelando que o esquema de codigestão tem relevância em estudos de nutrição-saúde quanto as substâncias polifenólicas dos alimentos. A fim de ampliar a compreensão dos efeitos desta codigestão, avaliamos ainda os sinergismos por meio da atividade antioxidante, conteúdo fenólico total e compostos fenólicos individuais.

3.4 SINERGISMO

O cálculo da diferença entre os resultados de codigestão e digestão de amostra única em relação à capacidade antioxidante, CFT e concentrações fenólicas individuais foi realizado de acordo com a eq. 2 e os resultados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Sinergismo calculado pela diferença e pela porcentagem dos valores médios de atividade antioxidante, conteúdo fenólico total (CFT) e compostos fenólicos individuais para avaliar sinergismo da codigestão de feijão-caupi cozido e suco de laranja em diferentes fases da digestão *in vitro*.

	Análise de sinergismo					
	Diferença (mg/100g)			Percentual		
	Oral	Gástrica	Intestinal	Oral	Gástrica	Intestinal
ABTS	-0,09	-2,83	-6,65	95,9	22,2	65,8
FRAP	3,01	1,79	-2,16	319,7	132,7	68,5
CFT	21,82	18,79	34,29	223,8	121,2	121,4
Ácidos fenólicos						
Ácido 4-hidroxibenzoico	0,01	0,86	-0,01	101,4	200,7	99,4
Ácido gálico	0,61	3,40	-3,63	138,2	226,9	79,5
Ácido siríngico	-0,15	0,23	0,26	84,1	142,6	111,2
Ácido vanílico	-0,03	0,05	-0,59	90,4	117,7	0,0
Ácido cafeico	0,29	-0,05	1,03	137,6	96,7	132,6
Ácido clorogênico	0,26	1,85	1,43	116,6	189,4	136,6
Ácido ferúlico	0,00	0,08	0,24	99,4	129,1	241,2
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,14	0,03	1,23	132,4	102,5	171,1
Flavonóides						
(-)-epicatequina	-0,21	0,82	1,17	82,9	151,7	138,5
(+)-catequina	0,11	-0,50	-0,91	116,2	63,1	0,0
Apigenina	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hesperidina	3,89	2,26	3,21	0,0*	135,8	175,7
Kaempferol	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Miricetina	0,65	0,17	4,36	192,3	104,8	198,4
Naringenina	0,03	0,28	0,00	127,0	0,0*	0,0
Naringina	0,12	1,99	2,13	114,9	0,0*	0,0*
Quercetina	0,75	2,75	7,58	221,5	318,3	678,6
Rutina	-0,20	0,50	-0,11	73,6	0,0*	0,0
Taxifolina	-0,11	-1,75	-0,01	66,0	26,9	99,0
Tirosol	nd	nd	nd	nd	nd	nd

*Compostos detectados apenas na amostra de codigestão, impossibilitando o cálculo de percentual. nd: não detectado. Obs.: Considerando que não houve digestão oral da amostra de suco, os valores foram considerados de zero nos cálculos.

A codigestão de feijão-caupi cozido e suco de laranja (FZ+SL) teve efeito positivo durante o curso da digestão nos valores de CFT, que pode ser observado pelas diferenças calculadas positivas para todas as fases da digestão (21,82 fase oral, 18,79 fase gástrica e 34,29 fase intestinal), bem como aumento pelos percentuais superiores a 100% (223,8 fase oral, 121,2 na fase gástrica e 121,4 na fase intestinal). Se o valor calculado for positivo, significa que a concentração de fenólicos totais, neste caso, foi maior para a amostra de codigestão em comparação à soma de CFT de feijão-caupi e suco de laranja quando ambos foram digeridos sozinhos. O mesmo se aplica à capacidade antioxidante e às concentrações de compostos fenólicos determinadas por CLAE-DAD. Nossos resultados revelaram que a codigestão das amostras levou a interações não identificadas que causaram algum aumento nos níveis de polifenóis ao final da simulação gastrointestinal e é aqui identificada como sinergismo, dado o aumento da concentração total de compostos bioaccessíveis. O mesmo não foi observado no caso da atividade antioxidante sequestrante de radicais livres (ABTS) que apresentou valores negativos e abaixo de 100%. Por outro lado, houve sinergismo na atividade antioxidante redutora férrica (FRAP) nas fases oral e gástrica durante a codigestão de feijão-caupi e suco de laranja. Além do próprio método antioxidante, esses resultados contraditórios podem ser explicados pelo poder antioxidante específico eliciado por um ou outro composto fenólico dependendo de sua estrutura química, interações composto-composto e interferência relacionada à matriz. Por esta razão, as diferenças calculadas observadas para as concentrações de compostos polifenólicos individuais presentes nas amostras são efetivamente importantes. Conforme mostrado na Tabela 5, encontramos valores positivos indicando sinergismos para a maioria dos compostos fenólicos quantificados nas amostras e ao longo das três fases da simulação gastrointestinal. As concentrações aumentadas de fenólicos bioaccessíveis individuais contribuíram para o aumento do valor de CFT, conforme descrito acima.

As interações entre os compostos fenólicos e outros compostos nas matrizes de grãos e suco de laranja podem promover estabilidade frente às condições de digestão, além disso, após a combinação, os complexos fenólicos podem ser quebrados e novas ligações podem ser formadas aumentando o CFT (KOEHNLEIN *et al.*, 2016). No entanto, segundo Sánchez-Rangel *et al.* (2013) o protocolo de Folin-Ciocalteu não é específico para fenólicos, pois outras moléculas como açúcares redutores e ácido ascórbico podem reduzir o reagente de Folin, superestimando os resultados. Mais uma vez, o monitoramento e quantificação de compostos individuais por CLAE foi essencial para elucidar esse impasse. Entre os 20 polifenóis analisados, foram observadas diferenças positivas para os principais compostos como os ácidos clorogênico e *p*-cumárico, hesperidina, naringenina, naringina e quercetina que apresentaram

sinergismo em todas as fases durante o processo de codigestão. A quercetina, a miricetina e a hesperidina foram em sua maioria bioacessíveis e exibiram o maior efeito positivo no final da fase intestinal, enquanto o ácido gálico apresentou o maior efeito negativo. No total, das 60 interações (considerando 20 fenólicos em 03 fases de digestão) 58 % das interações avaliadas foram positivas e apresentaram percentual de sinergismo superior a 100% corroborando com o aumento do CFT.

No entanto, embora a capacidade antioxidante (CA) por ambos os métodos ABTS e FRAP tenham apresentado diferença positiva na fase oral, ambos apresentaram diferenças negativas na última fase da digestão. Considerando o aumento de CFT e a diminuição de CA após a combinação FZ+SL, é possível que os fenólicos liberados apresentem atividade pró-oxidante. Isso ocorre porque os compostos fenólicos podem atuar como agentes anti ou pró-oxidantes, e essa capacidade depende da estrutura química, concentração, matriz alimentar e interações de íons metálicos (AKYÜZ *et al.*, 2017; SAMRA *et al.*, 2011).

Ácido gálico (14,1 mg. 100g⁻¹), quercetina (8,89 mg. 100g⁻¹) e miricetina (8,79 mg. 100g⁻¹) são os fenólicos observados em maior quantidade após digestão de FZ+SL (Tabela 4). De acordo com Hagerman *et al.* (1998) moléculas pequenas como ácido gálico e quercetina demonstram capacidade pró-oxidante significativa porque são fáceis de oxidar. Akyüz *et al.* (2017) relataram que a quercetina, (-)-epicatequina e (+)-catequina apresentam alta atividade pró-oxidante, assim como as misturas de quercetina/catequina e ácido cafeico/ácido ascórbico que mostraram efeitos pró-oxidantes em estudo realizado por Samra *et al.* (2011).

Em outro aspecto, a cultivar de feijão-caupi (BRS Aracê) utilizada em nosso estudo é biofortificada com ferro (Fe) (60 mg. kg⁻¹) e zinco (Zn) (50 mg. kg⁻¹) (COELHO *et al.*, 2021; VILARINHO *et al.*, 2010a), que podem estimular a oxidação por compostos fenólicos através de sua capacidade de reduzir Fe. Maurya & Devasagayam, (2010) relataram que a capacidade pró-oxidante dos ácidos ferúlico e cafeico depende de sua concentração na matriz, e que o ácido cafeico apresenta maior atividade pró-oxidante do que o ácido ferúlico devido à sua capacidade de reduzir o ferro. Duarte & Lunec (2009) também observaram que o ácido ascórbico (aqui presente no suco de laranja) e o Fe (presente no feijão-caupi) quando juntos apresentaram atividade pró-oxidante.

Embora os efeitos benéficos à saúde dos compostos fenólicos estejam relacionados à sua atividade antioxidante, alguns estudos recentes mostraram que compostos que atuam como pró-oxidantes também podem contribuir com efeitos benéficos (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Khan *et al.* (2020) associaram o efeito anticancerígeno com compostos pró-oxidantes. Mateus *et al.* (2018) e Nakagawa *et al.* (2004) mostraram evidências de que a quercetina com

atividade pró-oxidante pode promover a apoptose de células tumorais. Lambert & Elias (2010) em uma revisão compilaram alguns estudos que sugerem que os efeitos pró-oxidantes de compostos fenólicos podem promover sistemas antioxidantes endógenos em tecidos normais que oferecem proteção contra insultos carcinogênicos.

4 CONCLUSÕES

O uso da extração aquosa foi mais eficiente na extração de compostos fenólicos do feijão-caupi do que a extração metanólica, sugerindo que os polifenóis do feijão-caupi são predominantemente polares. O cozimento promoveu diminuição significativa do CFT, bem como da capacidade antioxidante do feijão-caupi, mas contribuiu para interações proteína-fenólicas que afetaram positivamente a bioacessibilidade de seus fenólicos. Enquanto a capacidade antioxidante e a bioacessibilidade dos compostos fenólicos do suco de laranja diminuíram após as fases gástrica e intestinal, no feijão-caupi houve aumento da bioacessibilidade dos fenólicos após as últimas fases da digestão. A codigestão do suco de laranja com feijão-caupi cozido levou a um maior teor de alguns fenólicos do que a digestão dessas amostras isoladas, porém a capacidade antioxidante diminuiu na maioria das fases. As diferenças calculadas, bem como os percentuais de sinergismo observados para as concentrações de compostos polifenólicos individuais sugeriram a ocorrência de sinergismos durante a codigestão de feijão-caupi e suco de laranja, e isso foi encontrado para a maioria das substâncias polifenólicas quantificadas nas amostras e ao longo das três fases de simulação gastrointestinal. As concentrações aumentadas de fenólicos bioacessíveis individuais contribuíram para o aumento dos valores de CFT. Por fim, o uso de um sistema de codigestão permitiu observar que a combinação de suco de laranja com feijão-caupi cozido levou a maior teor de bioacessibilidade de polifenóis do que a digestão dessas amostras isoladamente, e suas concentrações revelaram que os sinergismos alimentares não são negligenciáveis ao considerar comportamentos de bioacessibilidade durante a digestão *in vitro*. Essas descobertas podem contribuir para a pesquisa e desenvolvimento de alimentos e ingredientes funcionais à base de feijão e frutas cítricas, além de aplicação em estudos e diretrizes de alimentação e nutrição.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o aumento populacional estimado para os anos futuros, bem como a necessidade de variação das fontes de nutrientes, opções alternativas de proteína vegetal, como o feijão-caupi merecem destaque.

Neste trabalho sobre perfil proteico de feijão-caupi, avaliamos que durante a extração de proteínas, a etapa de limpeza adicional é essencial para a remoção do sal e a execução correta da focalização isoeétrica. Os ajustes realizados no método de extração de proteínas promoveram obtenção de um gel 2-DE com maior resolução e mais reprodutível, o que pode favorecer os próximos passos na identificação das proteínas do feijão-caupi. Além disso, demonstramos que o 2-DE foi eficiente para separar as proteínas de feijão-caupi, permitindo a visualização de alta homogeneidade entre as quatro cultivares avaliadas. A PCA indicou que há diferença entre a abundância de proteínas entre as duas cultivares biofortificadas e as duas não biofortificadas.

Também realizamos o primeiro estudo de codigestão de feijão-caupi cozido e suco de laranja e observamos que o cozimento do feijão-caupi contribui para interações proteínas-fenólicos, o que afeta positivamente a bioacessibilidade de seus fenólicos. As diferenças bem como os percentuais de sinergismo calculados em relação as concentrações de compostos polifenólicos individuais sugeriram a ocorrência de sinergismos durante a codigestão de feijão-caupi e suco de laranja, e isso foi encontrado para a maioria das substâncias polifenólicas quantificadas nas amostras e ao longo das três fases de simulação gastrointestinal. Além disso, observamos que as interações entre suco de laranja e feijão-caupi cozido promoveram o aumento de biodisponibilidade de fenólicos com propriedades pró-oxidantes.

Tendo em vista o significativo teor proteico presente nos grãos de feijão-caupi e a emergente demanda por diversidade de fontes proteicas, estudos como este fornecem informações relevantes para programas de melhoramento relacionados ao acúmulo de proteínas em *Vigna unguiculata*, bem como para a segurança alimentar.

Estudos futuros sobre as interações de feijão-caupi e suco de laranja na biodisponibilidade de polifenóis, bem como a liberação de peptídeos bioativos na codigestão são encorajados.

REFERÊNCIAS

- ABREU, C. E. B. DE *et al.* Proteomic analysis of salt stress and recovery in leaves of *Vigna unguiculata* cultivars differing in salt tolerance. **Plant Cell Reports**, v. 33, n. 8, p. 1289–1306, 2014.
- AIDA, B. *et al.* Biochemical variability and functional properties of cowpea landraces grown in Hoggar: the Algerian arid region. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, n. 4, p. 3509–3522, 2021.
- AHNEN, R. T.; JONNALAGADDA, S. S.; SLAVIN, J. L. Role of plant protein in nutrition, wellness, and health. **Nutrition Reviews**, v. 77, n. 11, p. 735–747, 2019.
- ALIKORD, M. *et al.* Species identification and animal authentication in meat products: a review. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, n. 1, p. 145–155, 1 mar. 2018.
- AKYÜZ, E. *et al.* Novel Protein-Based Solid-Biosensor for Determining Pro-oxidant Activity of Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 28, p. 5821–5830, 2017.
- ALBERGARIA, E. T.; OLIVEIRA, A. F. M.; ALBUQUERQUE, U. P. The effect of water deficit stress on the composition of phenolic compounds in medicinal plants. **South African Journal of Botany**, v. 131, p. 12–17, 2020.
- ALEIXANDRE, A.; ROSELL, C. M. Starch gels enriched with phenolics: Effects on paste properties, structure and digestibility. **LWT**, v. 161, p. 113350, 2022.
- ALGHAMDI, S. S. *et al.* Biochemical and molecular characterization of cowpea landraces using seed storage proteins and SRAP marker patterns. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 1, p. 74–82, 2019.
- ALVES, A. M. *et al.* Ascorbic acid and phenolic contents, antioxidant capacity and flavonoids composition of Brazilian Savannah native fruits. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 564–569, 2017.
- ANJOS BARROS, N. V. DOS *et al.* Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Grains of Biofortified Cowpea Cultivars, Before and After Cooking. **Current Nutrition & Food Science**, v. 16, n. 1, p. 105–113, 2020.
- AOAC. Official Methods of Analysis. **Association of official analytical chemists**, v. 1, p. 771, 1990.
- APEA-BAH, F. B. *et al.* Effect of simulated in vitro upper gut digestion of processed cowpea beans on phenolic composition, antioxidant properties and cellular protection. **Food Research International**, v. 150, p. 963–9969, 2021.
- ARIMOND, M.; RUEL, M. T. Dietary Diversity Is Associated with Child Nutritional Status: Evidence from 11 Demographic and Health Surveys. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 10, p. 2579–2585, 2004.

ATTREE, R.; DU, B.; XU, B. Distribution of phenolic compounds in seed coat and cotyledon, and their contribution to antioxidant capacities of red and black seed coat peanuts (*Arachis hypogaea* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 448–456, 2015.

AVANZA, M. *et al.* 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.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.

BALSAMO, G. M. *et al.* Comparative Proteomic Analysis of Two Varieties of Genetically Modified (GM) Embrapa 5.1 Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Non-GM Counterparts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 48, p. 10569–10577, 2015.

BALSAMO, G. M. **Análise proteômica de variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris*) geneticamente modificado EMBRAPA 5.1 e de genótipos de milho (*Zea mays*) com alto e baixo teor de flavonóides**. 2016. 131 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – UFSC, Florianópolis, 2016.

BAPTISTA, A. *et al.* Characterization of protein and fat composition of seeds from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and bambara groundnuts (*Vigna subterranea* L. Verdc) from Mozambique. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 11, n. 2, p. 442–450, 2017.

BARBA, F. J. *et al.* Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing. **Trends in Food Science and Technology**. v. 67, p. 195–206, 2017.

BARRECA, D. *et al.* Flavanones: Citrus phytochemical with health-promoting properties. **BioFactors**, v. 43, n. 4, p. 495–506, 2017.

BARROS, J. R. M. DE; BARROS, A. L. M. DE; CYPRIANO, M. P. **O mercado da citricultura no Brasil e as suas novas perspectivas**. São Paulo: CitrusBR, 2016.

BARROS, H. R. DE M.; FERREIRA, T. A. P. DE C.; GENOVESE, M. I. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 1892–1898, 2012.

BARROS, N. V. DOS A. *et al.* Effect of cooking on the bioactive compounds and antioxidant activity in grains cowpea cultivars. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 48, n. 5, p. 824–831, 2017.

BARROS, N. V. DOS A. *et al.* Bioacessibilidade in vitro de compostos fenólicos e atividade antioxidante em cultivares biofortificadas de feijão-caupi. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 52, n. 1, p. 1–9, 2021.

BARRY, G. H. *et al.* Variability in Juice Quality of “Valencia” Sweet Orange and Sample Size Estimation for Juice Quality Experiments. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 128, n. 6, p. 803–808, 2003.

BENITO, P.; MILLER, D. Iron absorption and bioavailability: An updated review. **Nutrition Research**, v. 18, n. 3, p. 581–603, 1998.

BESSADA, S. M. F.; BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Pulses and food security: Dietary protein, digestibility, bioactive and functional properties. **Trends in Food Science and Technology**, v. 93, p. 53–68, 2019.

BOISEN, S.; EGGUM, B. O. Critical Evaluation of in Vitro Methods for Estimating Digestibility in Simple-Stomach Animals. **Nutrition Research Reviews**, v. 4, n. 1, p. 141–162, 1991.

BOYE, J.; WIJESINHA-BETTONI, R.; BURLINGAME, B. Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 2, p. S183–S211, 2012.

BRASIL. RDC Nº 02, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 09 jan. 2002. Seção 1, p. 191.

BRASIL. **Guia Alimentar para a População Brasileira** Ministério da Saúde. Brasília, DF, 2008. Disponível em: www.saude.gov.br/bvs <http://www.ufsm.br/congressodireito/anais> http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2017000405009&lng=pt&tlng=pt [http://www.unicamp.br/nepa/arquivo_san/volume_17_1_2010/san_vol_17_1_Neila\[113-122\].pdf](http://www.unicamp.br/nepa/arquivo_san/volume_17_1_2010/san_vol_17_1_Neila[113-122].pdf)

BRASIL. **Guia Alimentar para a População Brasileira** Guia alimentar para a população. Brasília, DF, 2014. Disponível em: <http://www.ufsm.br/congressodireito/anais> http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2017000405009&lng=pt&tlng=pt [http://www.unicamp.br/nepa/arquivo_san/volume_17_1_2010/san_vol_17_1_Neila\[113-122\].pdf](http://www.unicamp.br/nepa/arquivo_san/volume_17_1_2010/san_vol_17_1_Neila[113-122].pdf) www.saude.gov.br/bvs.

BROWN, M. J. *et al.* Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with electrochemical detection. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 2, p. 396–403, 2004.

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.

CARMO, M. C. L. DO. *et al.* Caracterização do mercado consumidor de sucos prontos para o consumo. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 4, p. 305–309, 2014.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related

controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, n. 1, p. 15–25, 2013.

CARRERA, M. *et al.* Proteomics: Contribution of Proteomics Techniques to Understanding the Interrelationship between Food and Health. In: CABALLERO, B.; FINGAS, P. M.; TOLDRÁ, F. (Eds.). . **Encyclopedia of Food and Health**. 4. ed. Oxford: Academic Press, 2016. p. 554–560.

CARVALHO, A. F. U. *et al.* Nutritional ranking of 30 Brazilian genotypes of cowpeas including determination of antioxidant capacity and vitamins. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 26, p. 81–88, 2012.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Eds.). . **Farmacognosia – da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2007. p. 519–535.

CHAI, J. *et al.* The intelligent delivery systems for bioactive compounds in foods: Physicochemical and physiological conditions, absorption mechanisms, obstacles and responsive strategies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, p. 144–154, 2018.

CITRUSBR. **Laranja - a fruta**. Disponível em:
<http://www.citrusbr.com/laranjaesuco/?ins=20>.

CLERENS, S.; PLOWMAN, J. E.; DYER, J. M. Food Proteomics: Mapping Modifications. In: HEAZLEWOOD, J. (Ed.). . **Proteomic Applications in Biology**. [s.l.] IntechOpen, 2012. p. 3–32.

CHEYNIER, V. Phenolic compounds: from plants to foods. **Phytochemistry Reviews 2012 11:2**, v. 11, n. 2, p. 153–177, 2012.

COELHO, R. C. *et al.* Expanding information on the bioaccessibility and bioavailability of iron and zinc in biofortified cowpea seeds. **Food Chemistry**, v. 347, p. 129027, 2021.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira 2018/19. **Observatório agrícola CONAB**, v. 6, n. 9, p. 50, 2019.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira 2021/22. **Observatório agrícola CONAB**, v. 9, n. 3, p. 60, 2022.

D’ALESSANDRO, A.; ZOLLA, L. We are what we eat: Food safety and proteomics. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 1, p. 26–36, 2012.

DANTAS, A. M. *et al.* Bioaccessibility of phenolic compounds in native and exotic frozen pulps explored in Brazil using a digestion model coupled with a simulated intestinal barrier. **Food Chemistry**, v. 274, p. 202–214, 2019.

DE ANCOS, B. *et al.* Influence of orange cultivar and mandarin postharvest storage on polyphenols, ascorbic acid and antioxidant activity during gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 225, p. 114–124, 2017.

DE MELLO, C. S. *et al.* Tuber proteome comparison of five potato varieties by principal component analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 11, p. 3928–3936, 2016.

DENISE, C.; DE-PAULA, C. D.; JARMA-ARROYO, S. Caracterización nutricional y determinación de ácido fítico como factor antinutricional del frijol caupí. **Agronomía mesoamericana**, v. 29, n. 1, p. 29–40, 2018.

DIAZ, M. *et al.* The efficacy of a local ascorbic acid-rich food in improving iron absorption from Mexican diets: a field study using stable isotopes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 3, p. 436–440, 2003.

DIEZ-SÁNCHEZ, E.; QUILES, A.; HERNANDO, I. Interactions between Blackcurrant Polyphenols and Food Macronutrients in Model Systems: In Vitro Digestion Studies. **Foods** **2021**, Vol. 10, Page 847, v. 10, n. 4, p. 847, 2021.

DODEMAN, V. L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic Embryogenesis Versus Somatic Embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 313, p. 1493–1509, 1997.

DOLINSKY, M. *et al.* Total phenolic content of organic and conventional oranges and the effects of their juices on biochemical parameters of wistar rats. **International Food Research Journal**, v. 25, n. 2, p. 842–847, 2018.

DUARTE, T. L.; LUNEC, J. ReviewPart of the Series: From Dietary Antioxidants to Regulators in Cellular Signalling and Gene ExpressionReview: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. **Free Radical Research**, v. 39, n. 7, p. 671–686, 2009.

DUPONT, D.; LE FEUNTEUN, S.; MARZE, S.; SOUCHON, I. Structuring food to control its disintegration in the gastrointestinal tract and optimize nutrient bioavailability. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 46, p. 83–90, 2018.

DURANTI, M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. **Fitoterapia**, v. 77, n. 2, p. 67–82, 2006.

EID, S. Y.; EL-READI, M. Z.; WINK, M. Digitonin synergistically enhances the cytotoxicity of plant secondary metabolites in cancer cells. **Phytomedicine**, v. 19, n. 14, p. 1307–1314, 2012.

EL-SALAM, M. H. A. B. D. Application of proteomics to the areas of milk production , processing and quality control – A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 67, n. 2, p. 153–166, 2014.

EMBRAPA. **BRS Pajeú - cultivar de feijão-caupi com grão mulato claro**, 2009.

ENSKILDE, K., JACOBSEN, S., & SØNDERGAARD, I. Multivariate Data Analysis of Proteome Data. **Methods in Molecular Biology**, n. 355, p. 195–210, 2017.

FAO. **How to Feed the World in 2050**, 2017. Disponível em:

<http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf>

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>.

FDA. Guidance for industry: bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products—general considerations. **Food and Drug Administration, Washington, DC**, 2003.

FILHO, F. R. F. *et al.* **Feijão-Caupi no Brasil: Produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. 1. ed. Teresina-PI: Embrapa Meio-Norte, 2011.

FREIRE FILHO, F. R. *et al.* **Comunicado Técnico 209 - BRS Xiquexique: cultivar de feijao-caupi rica em ferro e zinco**. Teresina-PI: [s.n.]. v. 1

FROTA, K. D. M. G.; LOPES, L. A. R.; SILVA, I. C. V.; ARÊAS, J. A. G. Nutritional quality of the protein of *Vigna unguiculata* L. Walp and its protein isolate. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 48, n. 5, p. 792–798, 2017.

FROTA, K. DE M. G.; SOARES, R. A. M.; ARÊAS, J. A. G. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 470–476, 2008.

FUNDECITRUS. **Dados compilados safra 2005-2019.**, 2019. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/pes/estimativa>>

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.

GIL-IZQUIERDO, A. *et al.* In vitro availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 1035–1041, 2001.

GIROLAMO, F. D. *et al.* Proteomic applications in food allergy: food allergenomics. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 15, p. 259–266, 2015.

GIUSTI, F. *et al.* A comprehensive investigation of the behaviour of phenolic compounds in legumes during domestic cooking and in vitro digestion. **Food Chemistry**, v. 285, p. 458–467, 2019.

GLEESON, J. P.; RYAN, S. M.; BRAYDEN, D. J. Oral delivery strategies for nutraceuticals: Delivery vehicles and absorption enhancers. **Trends in Food Science & Technology**, v. 53, p. 90–101, 2016.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GONÇALVES, A. *et al.* Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), a renewed multipurpose crop for a more sustainable agri-food system: nutritional advantages and constraints. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 9, p. 2941–2951, 2016.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 3665–3685, 2004.

GUPTA, P. *et al.* Characterization of seed storage proteins in high protein genotypes of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 16, n. 1, p. 53–58, 2010.

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, n. 4, p. 290–297, 2011.

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.

HAGERMAN, A. E. *et al.* High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1887–1892, 1998.

HAYAMA, T.; OHYAMA, K. Recent development and trends in sample extraction and preparation for mass spectrometric analysis of nucleotides, nucleosides, and proteins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 161, p. 51–60, 2018.

HE, M. *et al.* Comparative proteome analysis of embryo and endosperm reveals central differential expression proteins involved in wheat seed germination. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 97, 2015.

HEINRICH, M.; BARNES, J.; GIBBONS, S.; WILLIAMSON, E. M. **Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy E-Book**. [s.l.] Elsevier Health Sciences, 2012.

HERBERT, B.; RYDE, N. Review Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis Proteomics and 2-DE. **Electrophoresis**, v. 20, p. 660–663, 1999.

HERRERA-POOL, E. *et al.* Effect of solvent polarity on the Ultrasound Assisted extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from habanero pepper leaves (*Capsicum chinense*) and its identification by UPLC-PDA-ESI-MS/MS. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 76, p. 105658, 2021.

HONGYU, K.; SANDANIELO, V. L. M.; OLIVEIRA JUNIOR, G. J. Análise de Componentes Principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. **Engineering and Science**, v. 1, n. 5, p. 83–90, 2015.

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.

HUSSEIN, R. A.; EL-ANSSARY, A. A. Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants. In: **Herbal Medicine**. 1. ed. [s.l.: s.n.]. v. 1p. 13.

IBGE. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil**. [s.l.: s.n.]. Disponível em:

<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50063.pdf>. Acesso em: 13 ago. 2019.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, Estatística da Produção Agrícola**, 2021. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=72415>.

IPCC. **Global warming of 1.5 °C. Intergovernmental Panel on climate change**, 2018. Disponível em: <https://www.ipcc.ch/sr15/>.

JACOBS, D. R.; GROSS, M. D.; TAPSELL, L. C. Food synergy: An operational concept for understanding nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 5, p. 1543S, 2009.

JACOBSEN, S. *et al.* Multivariate analysis of 2-DE protein patterns – Practical approaches. **Electrophoresis**, v. 28, p. 1289–1299, 2007.

JAGADEESH, D. S.; KANNEGUNDLA, U.; REDDY, R. K. Application of Proteomic Tools in Food Quality and Safety. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 5, n. 5, p. 213–225, 2017.

JANZANTTI, N. S.; MACHADO, T. V.; MONTEIRO, M. Sensory acceptance of juice from FCOJ processing steps. **Journal of Sensory Studies**, v. 26, n. 5, p. 322–330, 2011.

JORRIN-NOVO, J. V. *et al.* Gel electrophoresis-based plant proteomics: Past, present, and future. **Journal of Proteomics**, v. 198, p. 1–10, 2019.

KARASAWA, M. M. G.; MOHAN, C. Fruits as Prospective Reserves of bioactive Compounds: A Review. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 8, n. 5, p. 335–346, 2018.

KELEBEK, H.; CANBAS, A.; SELLI, S. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs. Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grown in Turkey. **Food Chemistry**, v. 107, n. 4, p. 1710–1716, 2008.

KHAN, H. Y. *et al.* Prooxidant anticancer activity of plant-derived polyphenolic compounds: An underappreciated phenomenon. **Functional Foods in Cancer Prevention and Therapy**, p. 221–236, 2020.

KHAN, M. K.; ZILL-E-HUMA; DANGLES, O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, n. 1, p. 85–104, 2014.

KHANG, D.; DUNG, T.; ELZAAWELY, A.; XUAN, T. Phenolic Profiles and Antioxidant Activity of Germinated Legumes. **Foods**, v. 5, n. 2, p. 27, 2016.

KHATTAB, R. Y.; ARNTFIELD, S. D. Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments 2. Antinutritional factors. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 6, p. 1113–1118, 2009.

KIM, M. K. *et al.* Identification of Sensory Attributes That Drive Consumer Liking of Commercial Orange Juice Products in Korea. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 9, p. S1451–S1458, 2013.

KIMURA, A. *et al.* Comparison of Physicochemical Properties of 7S and 11S Globulins from Pea, Fava Bean, Cowpea, and French Bean with Those of Soybean □ French Bean 7S Globulin Exhibits Excellent Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 10273–10279, 2008.

KIRAN, M. *et al.* Muscle-specific variation in buffalo (*Bubalus bubalis*) meat texture: biochemical, ultrastructural and proteome characterization. **Journal of texture studies**, v. 46, p. 254–261, 2015.

KITTS, D. D. Bioactive substances in food: identification and potential uses. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 72, n. 4, p. 423–434, 1994.

KOEHNLEIN, E. A. *et al.* Analysis of a whole diet in terms of phenolic content and antioxidant capacity: effects of a simulated gastrointestinal digestion. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 67, n. 6, p. 614–623, 2016.

KOLTON, A. *et al.* Biosynthesis Regulation of Folates and Phenols in Plants. **Scientia Horticulturae**, v. 291, p. 110561, 2022.

KRIS-ETHERTON, P. M. *et al.* Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American journal of medicine**, v. 113, p. 71S-88S, 2002.

KRISHNAN, H. B. *et al.* Proteomic Analysis of Pigeonpea (*Cajanus cajan*) Seeds Reveals the Accumulation of Numerous Stress-Related Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 23, p. 4572–4581, 2017.

KUMAR, A. *et al.* Nutraceuticals derived from seed storage proteins: Implications for health wellness. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 710-719, 2019.

KUMAR, S. P. J.; RAJENDRA, A.; PRASAD, S.; SINGH, A. Health prospects of bioactive peptides derived from seed storage proteins. *In*: MEGHWAL, M.; GOYAL, M. R. (Eds.). **State-of-the-Art Technologies in Food Science**. 38. ed. Florida: Apple Academic Press, 2017. p. 23.

LABUSCHAGNE, M. T. A review of cereal grain proteomics and its potential for sorghum improvement. **Journal of Cereal Science**, v. 84, p. 151–158, 2018.

LAFARGA, T. *et al.* Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in cooked pulses. **International Journal of Food Science & Technology**, 54, 1816–1823, 2019.

LAMBERT, J. D.; ELIAS, R. J. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, n. 1, p. 65–72, 2010.

LAPARRA, J. M.; GLAHN, R. P.; MILLER, D. D. Bioaccessibility of phenols in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and iron (Fe) availability to Caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 22, p. 10999–11005, 2008.

- LEE, C. Y. Challenges in providing credible scientific evidence of health benefits of dietary polyphenols. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 524–526, 2013.
- LI, A. N. *et al.* Resources and biological activities of natural polyphenols. **Nutrients**, v. 6, n. 12, p. 6020–6047, 2014.
- LIMA, V. L. A. G. *et al.* Total phenolics and antioxidant activity of the aqueous extract of mung bean sprout (*Vigna radiata* L.). **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 1, p. 53–57, 2004.
- LINDEMANN, I.S. *et al.* Rice and common bean blends: Effect of cooking on in vitro starch digestibility and phenolics profile. **Food Chemistry**, 340, 127908, 2021.
- LIU, Y.; HEYING, E.; TANUMIHARDJO, S. A. History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 6, p. 530–545, 2012.
- LÓPEZ-MARTÍNEZ, L. X. *et al.* Effect of cooking and germination on bioactive compounds in pulses and their health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 624–634, 2017.
- LÓPEZ, A. *et al.* Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 547–555, 2013.
- LORENZINI, M. *et al.* Post-harvest proteomics of grapes infected by *Penicillium* during withering to produce Amarone wine. **Food Chemistry**, v. 199, p. 639–647, 2016.
- LUALDI, M., & FASANO, M. Statistical analysis of proteomics data: A review on feature selection. **Journal of Proteomics**, n. 198, p. 18–26, 2019.
- 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.
- LUNA-VITAL, D. A. *et al.* Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. **Food Research International**, v. 76, n. P1, p. 39–50, 2015.
- LUO, J.; CAI, W.; WU, T.; XU, B. Phytochemical distribution in hull and cotyledon of adzuki bean (*Vigna angularis* L.) and mung bean (*Vigna radiata* L.), and their contribution to antioxidant, anti-inflammatory and anti-diabetic activities. **Food Chemistry**, v. 201, p. 350–360, 2016.
- MAGDELDIN, S. *et al.* Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis. **Clinical proteomics**, v. 11, n. 16, p. 1–10, 2014.
- MAGHSOUDLOU, Y.; ASGHARI GHAJARI, M.; TAVASOLI, S. Effects of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of quince fruit and its tisane's sensory properties. **Journal of Food Science and Technology** 2019 56:5, v. 56, n. 5, p. 2365–2372, 2019.

MAPA. Instrução normativa nº 12 de 28 de março de 2008. Estabelece o Regulamento Técnico do Feijão. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 31 mar. 2008. Seção 1.

MAPA. **Manual de Hortaliças Não-Convencionais**. 1. ed. Brasília, DF,: ACS, 2010.

MAPA. **Plano nacional de desenvolvimento da cadeia do feijão e pulses** Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento Brasília, 2018. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/plano-para-aumentar-producao-de-feijao-e-pulses-e-lancado-no-mapa/cartilhafeijaobaixa.pdf>>

MARTINS, N.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 1–12, 2016.

MATEUS, P. G. *et al.* Quercetin: Prooxidant Effect and Apoptosis in Cancer. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 58, p. 265–288, 2018.

MAURYA, D. K.; DEVASAGAYAM, T. P. A. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 12, p. 3369–3373, 2010.

MCCLEMENTS, D. J.; LI, F.; XIAO, H. The Nutraceutical Bioavailability Classification Scheme: Classifying Nutraceuticals According to Factors Limiting their Oral Bioavailability. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 299–327, 2015.

MEDICINE, I. OF. **Dietary Reference Intakes: the essential guide to nutrient requirements**. Washington: The National Academies press, 2006.

MENNAH-GOVELA, Y. A.; BORNHORST, G. M. Fresh-Squeezed Orange Juice Properties Before and During *In Vitro* Digestion as Influenced by Orange Variety and Processing Method. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 10, p. 2438–2447, 2017.

MESQUITA, E.; MONTEIRO, M. Simultaneous HPLC determination of flavonoids and phenolic acids profile in Pêra-Rio orange juice. **Food Research International**, v. 106, p. 54–63, 2018.

METROUH-AMIR, H.; DUARTE, C. M. M.; MAIZA, F. Solvent effect on total phenolic contents, antioxidant, and antibacterial activities of *Matricaria pubescens*. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 249–256, 2015.

MINEKUS, M. *et al.* A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. **Food & Function**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.

MOREIRA-ARAÚJO, R. S. D. R. *et al.* 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.

MOURA, H. F. N. *et al.* Proteomics changes during the incompatible interaction between cowpea and *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz and Sacc. **Plant Science**, v. 217–

218, p. 158–175, 2014.

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 Effect of simulated gastrointestinal digestion on the phenolic compound. **CyTA - Journal of Food**, v. 15, n. 3, p. 391–399, 2017.

NAIR, K. M. *et al.* Inclusion of Guava Enhances Non-Heme Iron Bioavailability but Not Fractional Zinc Absorption from a Rice-Based Meal in Adolescents. **The Journal of Nutrition**, v. 143, n. 6, p. 852–858, 2013.

NAIR, K. M.; AUGUSTINE, L. F. Food synergies for improving bioavailability of micronutrients from plant foods. **Food Chemistry**, v. 238, p. 180–185, 2018.

NATARAJAN, S. S. *et al.* Characterization of Storage Proteins in Wild (*Glycine soja*) and Cultivated (*Glycine max*) Soybean Seeds Using Proteomic Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 3114–3120, 2006.

NAKAGAWA, H. *et al.* Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (Å)-epigallocatechin gallate. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 9, p. 1567–1574, 2004.

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, p. 1763–1771, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. [s.l.] Artmed Editora, 2011.

NEUGART, S. *et al.* The intrinsic quality of brassicaceous vegetables: How secondary plant metabolites are affected by genetic, environmental, and agronomic factors. **Scientia Horticulturae**, v. 233, p. 460–478, 2018.

NEUGART, S.; KRUMBEIN, A.; ZRENNER, R. Influence of Light and Temperature on Gene Expression Leading to Accumulation of Specific Flavonol Glycosides and Hydroxycinnamic Acid Derivatives in Kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1–15, 2016.

NIJDAM, D.; ROOD, T.; WESTHOEK, H. The price of protein: Review of land use and carbon footprints from life cycle assessments of animal food products and their substitutes. **Food Policy**, v. 37, n. 6, p. 760–770, 2012.

NING, F.; WU, X.; WANG, W. Expert Review of Proteomics Exploiting the potential of 2DE in proteomics analyses. **Expert Review of Proteomics**, v. 13, n. 10, p. 901–903, 2016.

NIU, L. Y. *et al.* Physicochemical Characteristics of Orange Juice Samples From Seven Cultivars. **Agricultural Sciences in China**, v. 7, n. 1, p. 41–47, 2008.

NOGUEIRA, F. C. S. *et al.* Proteome analysis of embryogenic cell suspensions of cowpea (*Vigna unguiculata*). **Plant Cell Reports**, v. 26, n. 8, p. 1333–1343, 2007.

OLIVEIRA, J. T. *et al.* In vitro and in vivo digestibility of the albumin and globulin fractions of eight Brazilian cowpea [*Vigna unguiculata* (L) Walp] cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 14, p. 1823–1830, 2004.

ONU. **Transforming our world: the 2030 agenda for sustainable development united nations united nations transforming our world: the 2030 agenda for sustainable development.** 2015.

ORTEA, I.; O'CONNOR, G.; MAQUET, A. Review on proteomics for food authentication. **Journal of Proteomics**, v. 147, p. 212–225, 2016.

ORTEGA, N. *et al.* Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an in-vitro digestion model. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 65–71, 2011.

OSBORNE, T. B.; CAMPBELL, G. F. Proteins of the pea. **Journal of the American Chemical Society**, v. 20, n. 5, p. 348–362, 1898.

OTITOJU, G. T. O.; OTITOJU, O.; NWAMARAH, J. U.; BAIYERI, S. O. Comparative study of the nutrient composition of four varieties of Cowpea (*Vigna unguiculata*) and their products (Beans-based products). **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 14, n. 9, p. 540–546, 2015.

PELLEGRINI, N. *et al.* Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 9, p. 2812–2819, 2003.

PEÑA-VÁZQUEZ, G. I. *et al.* In vitro simulated gastrointestinal digestion impacts bioaccessibility and bioactivity of Sweet orange (*Citrus sinensis*) phenolic compounds. **Journal of Functional Foods**, v. 88, p. 104891, 2022.

PHILLIPS, R. D. *et al.* Utilization of cowpeas for human food. **Field Crops Research**, v. 82, n. 2–3, p. 193–213, 2003.

PROVENZA, F. D. What does it mean to be locally adapted and who cares anyway? **Journal of Animal Science**, v. 86, n. suppl_14, p. E271–E284, 2008.

PULLAIAHGARI, D. *et al.* Proteomic analysis of differentially abundant proteins in the embryo and endosperm of *Givotia moluccana* (L.) Sreem. **Journal of Forestry Research**, p. 1–13, 2019.

QUAN, W. *et al.* Stability of the phenolic compounds and antioxidant capacity of five fruit (apple, orange, grape, pomelo and kiwi) juices during in vitro-simulated gastrointestinal digestion. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 53, n. 5, p. 1131–1139, 2018.

RABILLOUD, T.; LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics : A tutorial ☆. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 10, p. 1829–1841, 2011.

RANGEL, A.; DOMONT, G. B.; PEDROSA, C.; FERREIRA, S. T. Functional properties of

purified vicilins from cowpea (*Vigna unguiculata*) and pea (*Pisum sativum*) and cowpea protein isolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 19, p. 5792–5797, 2003.

RASHEED, F. *et al.* Modeling to Understand Plant Protein Structure-Function Relationships—Implications for Seed Storage Proteins. **Molecules**, v. 25, n. 4, 2020.

REBER, J. D.; EGGETT, D. L.; PARKER, T. L. Antioxidant capacity interactions and a chemical/structural model of phenolic compounds found in strawberries. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 62, n. 5, p. 445–452, ago. 2011.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J. *et al.* Changes in vitamin C, phenolic, and carotenoid profiles throughout in vitro gastrointestinal digestion of a blended fruit juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 8, p. 1859–1867, 2013.

RÖÖS, E. *et al.* Protein futures for Western Europe: potential land use and climate impacts in 2050. v. 17, p. 367–377, 2017.

ROSSI, G. B. *et al.* Comparison of Grain Proteome Profiles of Four Brazilian Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 34, p. 7588–7597, 2017.

ROSSI, G.B. *et al.* Protein profile and antioxidant capacity of processed seeds from two common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **International Journal of Food Science And Technology**, 57, 3934–3943, 2022.

RUBIÓ, L.; MOTILVA, M.-J.; ROMERO, M.-P. Recent Advances in Biologically Active Compounds in Herbs and Spices: A Review of the Most Effective Antioxidant and Anti-Inflammatory Active Principles. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 9, p. 943–953, 2013.

RUFINO, M. DO S. M. *et al.* Determinação de atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução de ferro (FRAP). **EMBRAPA - Comunicado técnico**, n. 125, p. 3–6, 2006.

RUFINO, M. DO S. M. *et al.* Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. **EMBRAPA - Comunicado técnico**, n. 128, p. 0–3, 2007.

SAMRA, M. A. *et al.* Antioxidant/prooxidant properties of model phenolic compounds: Part I. Studies on equimolar mixtures by chemiluminescence and cyclic voltammetry. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 622–629, 2011.

SANCHEZ-MORENO, C. *et al.* Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 430–439, 2003.

SÁNCHEZ-RANGEL, J. C. *et al.* The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. **Analytical Methods**, v. 5, n. 21, p. 5990–5999, 2013.

SANGSUKIAM, T.; DUANGMAL, K. Changes in bioactive compounds and health-

promoting activities in adzuki bean: Effect of cooking conditions and in vitro simulated gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v. 157, p. 111371, 2022.

SANTOS JR, A. O efeito cultural sobre a interação homem-plantas comestíveis. **Ambiente e Educação - Revista de Educação Ambiental**, v. 18, n. 2, p. 83–92, 2013.

SARRIÁ, B. et al. Effects of bioactive constituents in functional cocoa products on cardiovascular health in humans. **Food Chemistry**, v. 174, p. 214–218, 2015.

SAURA-CALIXTO, F.; SERRANO, J.; GOÑI, I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 492–501, 2007.

SERAGLIO, S.K.T. *et al.* Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds, minerals, and antioxidant capacity of *Mimosa scabrella* Bentham honeydew honeys. **Food Research International**, 99, 670–678, 2017.

SERAGLIO, S.K.T. *et al.* Nutritional and bioactive potential of Myrtaceae fruits during ripening. **Food Chemistry**, 239, 649–656, 2018.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, 2015.

SHEAHAN, C. . Plant Guide for cowpea (*Vigna unguiculata*). **USDA-Natural Resources Conservation Service**, p. 5–7, 2012.

SINGH, B. *et al.* Bioactive constituents in pulses and their health benefits. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 4, p. 858–870, 2017a.

SINGH, B. *et al.* Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. **Food Research International**, v. 101, p. 1–16, 1 nov. 2017b.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, 1965.

STAFUSSA, A. P. *et al.* Bioactive compounds of 44 traditional and exotic brazilian fruit pulps: Phenolic compounds and antioxidant activity. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 106–118, 2018.

SUN, Y. *et al.* Flavonoids, phenolic acids, carotenoids and antioxidant activity of fresh eating citrus fruits, using the coupled in vitro digestion and human intestinal HepG2 cells model. **Food Chemistry**, v. 279, p. 321–327, 2019.

SURH, J.; KOH, E. Effects of four different cooking methods on anthocyanins, total phenolics and antioxidant activity of black rice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 15, p. 3296–3304, 2014.

SWANSON, B. G. Tannins and polyphenols. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, p. 5729–5733, 2003.

TANASE, C.; BUJOR, O.-C.; POPA, V. I. Phenolic Natural Compounds and Their Influence on Physiological Processes in Plants. **Polyphenols in Plants**, p. 45–58, 2019.

TEKA, T. A. *et al.* Phytochemical profiles and antioxidant capacity of improved cowpea varieties and landraces grown in Ethiopia. **Food Bioscience**, v. 37, p. 100732, 2020.

THAKUR, N. *et al.* Recent updates on bioaccessibility of phytonutrients. **Trends in Food Science & Technology**, v. 97, p. 366–380, 2020.

THIELLEMENT, H.; ZIVY, M.; PLOMION, C. Combining proteomic and genetic studies in plants. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 782, n. 1–2, p. 137–149, 2002.

USDA. **Citrus : World Markets and Trade Brazil's Orange Production** Foreign Agricultural Service, 2021. Disponível em:
<<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf%3E>.>

VÂLCU, C. M.; SCHLINK, K. Efficient extraction of proteins from woody plant samples for two-dimensional electrophoresis. **Proteomics**, v. 6, n. 14, p. 4166–4175, 2006.

VALENTIM-NETO, P. A. *et al.* Leaf proteome comparison of two GM common bean varieties and their non-GM counterparts by principal component analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 3, p. 927–932, 2016.

VASCONCELOS, É. A. R. *et al.* Protein Extraction From Cowpea Tissues for 2-D Gel Electrophoresis and MS Analysis. **Chromatographia**, v. 62, n. 7–8, p. 447–450, 2005.

VASCONCELOS, I. M. *et al.* Protein fractions, amino acid composition and antinutritional constituents of high-yielding cowpea cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 1, p. 54–60, 2010.

VASHISHTH, R. *et al.* Influence of cooking methods on antinutritional factors, oligosaccharides and protein quality of underutilized legume *Macrotyloma uniflorum*. **Food Research International**, v. 143, p. 110299, 2021.

VILARINHO, A. A. *et al.* **Comunicado Técnico 62 - Brs Aracê – Cultivar de Feijão-Caupi com Grãos de Embrapa Meio-Norte** Boa Vista - RR, 2010a.

VILARINHO, A. A. *et al.* **Comunicado Técnico 58 - BRS ITAIM – Cultivar de Feijão-caupi com Grãos Tipo Fradinho**. Boa Vista - RR: EMBRAPA, 2010b.

VOLF, I. *et al.* Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols. **Chemical Papers**, v. 68, n. 1, p. 121–129, 2014.

VUOLO, M. M.; LIMA, V. S.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R. Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. In: **Bioactive Compounds**. [s.l.] Woodhead Publishing, 2019. p. 33–50.

WALTER, M. *et al.* Antioxidant properties of rice grains with light brown, red and black pericarp colors and the effect of processing. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p.

698–703, 2013.

WOOLF, P. J.; FU, L. L.; BASU, A. Vprotein: Identifying optimal amino acid complements from plant-based foods. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. 1–7, 2011.

WU, X.; GONG, F.; WANG, W. Protein extraction from plant tissues for 2DE and its application in proteomic analysis. **Proteomics**, v. 14, n. 6, p. 645–658, 2014.

XU, B.; CHANG, S. K. C. Total Phenolics, Phenolic Acids, Isoflavones, and Anthocyanins and Antioxidant Properties of Yellow and Black Soybeans As Affected by Thermal Processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 7165–7175, 2008.

XU, G. *et al.* Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 545–551, 2008.

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.

ZEHFUS, L. R. *et al.* Haskap berry phenolic subclasses differentially impact cellular stress sensing in primary and immortalized dermal fibroblasts. **Cells**, v. 10, n. 10, 2021.

ZENG, L. *et al.* Effect of gelatinization processing on the antioxidant, digestion, and physicochemical properties of wheat starch enhanced with tannic acid. **LWT**, v. 125, p. 109228, 2020.

ZHAN, X. *et al.* Innovating the Concept and Practice of Two-Dimensional Gel Electrophoresis in the Analysis of Proteomes at the Proteoform Level. **Proteomes**, v. 7, n. 4, 2019.

ZHANG, Y.; LI, Y. Identification of heat-stable proteins in imbibed Cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Acta physiologiae plantarum**, v. 37, n. 2, p. 1-7, 2015.

ZOU, Z. *et al.* Antioxidant activity of Citrus fruits. **Food Chemistry**, v. 196, p. 885–896, 2016.

ANEXO 1 – Artigo publicado

Honaiser et al.
Food Production, Processing and Nutrition (2022) 4:16
<https://doi.org/10.1186/s43014-022-00095-z>

Food Production, Processing
 and Nutrition

RESEARCH

Open Access



Comparison of grain protein profiles of Brazilian cowpea (*Vigna unguiculata*) cultivars based on principal component analysis

Tuany Camila Honaiser¹, Gabriela Barbosa Rossi¹, Maurisrael de Moura Rocha² and Ana Carolina Maisonnave Arisi^{1*}

Abstract

This study aims to compare the grain protein profile of four Brazilian cowpea cultivars (BRS Aracê, BRS Itaim, BRS Pajeú, and BRS Xiquexique) by two-dimensional electrophoresis (2-DE) and principal component analysis (PCA). 2-DE efficiently separate cowpea protein profiles, showing high homogeneity among the four cultivars. In addition, the principal component analysis indicated that there is a difference in abundance of proteins among the cultivars. The cultivars BRS Aracê and BRS Xiquexique, both biofortified in iron and zinc, were separated from the cultivars BRS Itaim and BRS Pajeú. These results demonstrate that protein profiles can be used to discriminate cowpea varieties.

Keywords: Vigna, 2-DE, PCA, Legumes

*Correspondence: anuarisi@ufsc.br

¹Food Science and Technology Department, CAL CCA UFSC, Federal University of Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, Florianópolis, Santa Catarina 1346, 88034-001, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

ANEXO 2 – Artigo publicado









International Journal of Food Science and Technology 2022

1

Original article

Synergism and phenolic bioaccessibility during *in vitro* co-digestion of cooked cowpea with orange juice

Tuany Camila Honaiser,^{1,2}  Stefany Grutzmann Arcari,²  Keli Cristina Fabiane,² 
 Maurisrael de Moura Rocha,³  Isabela Maia Toaldo Fedrigo¹  & Ana Carolina Maissonave Arisi^{1*} 

1 CAL CCA UFSC, Food Science and Technology Department, Federal University of Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88034-001, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

2 Federal Institute of Santa Catarina, Rua 22 de abril, 89900-000, São Miguel do Oeste, Santa Catarina, Brazil

3 Embrapa Meio-Norte, Caixa Postal 001, 64008-780, Teresina, Piauí, Brazil

(Received 11 August 2022; Accepted in revised form 16 October 2022)

Summary Foods are susceptible to matrix interferences during the gastrointestinal transit that can affect bioactive molecules. We proposed *in vitro* co-digestion of cowpea beans and orange juice to assess polyphenols bioaccessibility and synergisms. We performed gastrointestinal simulation combining beans and a fruit beverage, to mimic a common meal in a more realistic set-up than the usual single-food models. Twenty phenolic compounds were released in oral, gastric and intestinal compartments and were identified by HPLC-DAD. Gallic acid, (–)-epicatechin and chlorogenic acid were the most bioaccessible polyphenols. Cooking and solvent extraction of cowpea beans affected their polyphenolic concentrations. After digestion, the bioaccessibility indexes were higher for cowpea (136.11%) and cooked cowpea (744.74%) when compared to orange juice (31.87%) indicating that the thermal treatment enhanced the bioaccessibility of cowpea phenolics. The antioxidant capacity was higher in the end of co-digestion compared to cooked cowpea and orange juice digested alone due to synergistic polyphenol-polyphenol interactions or polyphenol-protein interactions. The combination of orange juice with cooked cowpea in co-digestion promoted high content of some bioaccessible phenolics, with 10 out of 20 compounds showing positive interactions at the intestinal phase, suggesting that food synergisms are not neglectable for beans and citrus polyphenols release during the digestion course.

Keywords Antioxidant capacity, bioactive compounds, gastrointestinal simulation, legumes, *Vigna unguiculata*.

ANEXO 3 – Certificado de apresentação oral em evento (V Congresso Nacional do Feijão-Caupi).



Certificamos que

Tuany Camila Honaiser

Apresentou o trabalho **Otimização da extração de proteínas de grãos de feijão-caupi (Vigna unguiculata)** para análise proteômica, na forma de apresentação Oral, de autoria de **Tuany Camila Honaiser, Gabriela Barbosa Rossi, Karina Gonçalves Silveira, Maurisrael de Moura Rocha, Ana Carolina Maisonnave Arisi**, durante o **V Congresso Nacional de Feijão-Caupi**, realizado de 05 a 07 de junho em Fortaleza – CE.

Fortaleza, 07 de junho de 2019.

Alek Sandro Dutra
Presidente do V CONAC

Cândida Hermínia Campos de Magalhães Bertini
Vice-presidente do V CONAC

Para verificar a autenticidade deste certificado, acesse o link <http://vconac2019.gnltus.com.br/certificado> e informe o código: 062450435

ANEXO 4 – Certificado de apresentação em evento (III Workshop de Compostos Bioativos e Qualidade de Alimentos).



CERTIFICATE OF POSTER PRESENTATION

We certificate that the poster titled

BIOACCESSIBILITY OF POLYPHENOLS AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF
ORANGE JUICE AND PEEL EXTRACTS USING IN VITRO DIGESTION

authored by

Tuany C. Honaiser, Karina G. Silveira, Isabela M. Toaldo Fedrigo

was presented in the 3rd Workshop on Bioactive Compounds & Food Quality (16 hours),
that was held by the Federal University of Santa Maria (Brazil), on July 27-30, 2021.
The abstract was published in the Annals of the event (ISSN number 2525-9873).

Tatiana Emanuel

Prof. Dr. Tatiana Emanuelli
Chair of the Organizing Committee



ANEXO 5 – Certificado de apresentação em evento (I Simpósio do Campo à Mesa).

