

Estudo Estatístico sobre a Correlação entre Atividade Antioxidante e Teor de Fenóis Totais e Flavonoides em Cultivares de Feijão-Caupi e Sementes de Feijões Comerciais

Statistical Study on the Correlation between Antioxidant Activity and Total Phenol and Flavonoid Content in Cowpea Cultivars and Commercial Bean Seeds

Italo Bruno de Sousa Sobral,^a Alexandre Araujo de Souza,^b Ronaldo Cunha Coelho,^c Maria das Dores Alves de Oliveira,^c Patricia e Silva Alves,^d Maurisrael de Moura Rocha,^e  Herbert de Sousa Barbosa^{a,} *

^a Universidade Federal do Piauí, Departamento de Química, Grupo de Estudos em Bionanalítica-GEBO, CEP 64049-550, Teresina-PI, Brasil

^b Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Natureza, Departamento de Química, CEP 64049-550, Teresina-PI, Brasil

^c Instituto Federal do Piauí, Departamento de Formação de Professores, CEP 64000-040, Teresina-PI, Brasil

^d Universidade Federal do Piauí, Departamento de Química, Laboratório de Produtos Naturais e Neuroquímica Experimental-LPNEX, CEP 64049-550, Teresina-PI, Brasil

^e Embrapa Meio-Norte, CEP 64008-780, Teresina-PI, Brasil

*E-mail: hbarbosa@ufpi.edu.br

Submissão: 22 de Março de 2025

Aceite: 25 de Junho de 2025

Publicado online: 2 de Julho de 2025

Legumes are important sources of proteins and bioactive molecules, such as flavonoids. These compounds belong to the group of phenolic compounds and are known for their high antioxidant activity. The aim of this study was to analyze the statistical correlation between samples of cowpea cultivars and commercial bean seeds, considering the possible relationship between antioxidant activity and the content of phenolic compounds. Multivariate statistical methods, such as PCA, HCA and r, were used. The identification of phenolic compounds was performed by the HPLC technique. The antioxidant capacity was analyzed by quantifying the DPPH[•] and ABTS^{•+} radicals, the total phenolic and total flavonoid contents. Green beans obtained the highest contents of total phenolic compounds (100.23 mg GAE/100 g) and antioxidant activity in the DPPH[•] method (7694.46 μmol TEAC/100 g). However, when the ABTS^{•+} radical was used, the Guariba cowpea variety presented the highest value (20,880.63 μmol TEAC/100 g) for antioxidant activity and the lowest values in the quantification of total flavonoids (7.17 mg RE/100 g) and total phenolics (32.20 mg GAE/100 g). High concentration of total flavonoids (12.04 mg RE/100 g) and greater diversity of phenolic acids were found in black beans.

Keywords: Bioactive compounds; polyphenols; legumes; chemometrics.

1. Introdução

O cultivo e o consumo de leguminosas são de grande importância para uma nutrição saudável. O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e outras leguminosas merecem destaque, pois são considerados uma das principais fontes de proteína vegetal em todo o mundo. Além disso, apresentam fitoquímicos com várias atividades biológicas, incluindo atividades antioxidantes.¹ Nesse contexto, destaca-se também o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), considerado uma das leguminosas mais consumidas entre os brasileiros, devido ao seu alto valor nutritivo. Isso corre em virtude da concentração elevada de proteínas e compostos bioativos presentes nessa leguminosa.²

O feijão-caupi pertence à família *Leguminosae* (ou *Fabaceae*) e é nativo da África. Ao longo dos anos, tem sido cultivado em regiões tropicais e subtropicais.³ Algumas pesquisas relatam a presença de diferentes compostos fenólicos como flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas, entre outros. Acredita-se que esses compostos podem fornecer benefícios para a saúde devido às suas elevadas atividades antioxidantes.⁴⁻⁵⁻⁶ A literatura relata o mecanismo de defesa que compostos fenólicos exercem na célula, neutralizando os estresses bióticos e abióticos, sequestrando espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), formando complexos com metais pró-oxidantes e regenerando compostos antioxidantes.⁷ Os flavonoides, além de serem importantes para a saúde humana, também ajudam no desenvolvimento das plantas, atuando como agentes de defesa e inibindo os estresses oxidativos ambientais.⁸

As leguminosas podem ser classificadas dependendo de seu conteúdo fenólico (em termos de Equivalente em Ácido Gálico – EAG) em três grupos, como baixo teor de fenólicos totais (<100 mg EAG/100 g), moderado (100-200 mg EAG/100 g) e alto (>200 mg EAG/100 g).⁹ Ensaio de capacidade antioxidante de eliminação dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, em extratos de sementes e folhas de cultivares de soja e de feijão azuki, demonstraram que o maior potencial

antioxidante foi exibido pelas folhas de feijão azuki, enquanto na soja a atividade antioxidante das sementes foi maior do que a das folhas. Além disso, foi possível confirmar que o perfil de polifenóis teve correlação com a atividade antioxidante das amostras, o que foi confirmado pela análise de correlação de Pearson.¹⁰

Neste contexto, os dados estatísticos gerados na análise de alimentos e interpretados por meio da quimiometria têm ganhado destaque. Isso ocorre porque esses dados são utilizados para avaliar as semelhanças e diferenças entre vários alimentos, ou mesmo para projetar objetos (amostras) em um plano fatorial bidimensional baseado em diferentes características, utilizando diferentes métodos matemáticos e estatísticos.^{11, 12} Dentre os diversos métodos estatísticos exploratórios existentes, os mais conhecidos são a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise de Agrupamento por Métodos Hierárquicos (HCA). Essas técnicas quimiométricas são amplamente utilizadas porque atendem às necessidades dos pesquisadores e proporcionam uma fácil interpretação dos resultados gerados. Essas técnicas quimiométricas são amplamente utilizadas porque atendem às necessidades dos pesquisadores, principalmente por reduzirem a complexidade dos conjuntos de dados multivariados, contribuindo para a melhor visualização e interpretação dos padrões existentes.¹³

Embora pesquisas anteriores demonstrem que os vegetais tenham atividade antioxidante, ainda são poucos os estudos na literatura correlacionando as sementes de cultivares feijão-caupi com outras cultivares de feijão, levando em consideração a capacidade antioxidante e o teor de compostos fenólicos. Diante disso, foram realizados ensaios de quantificação de atividade antioxidante utilizando os radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, quantificação do teor de fenóis e flavonoides totais, além da identificação de alguns compostos fenólicos por meio da Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Dentre as quatro cultivares de feijão-caupi analisadas, três delas foram submetidas à técnica de biofortificação, sendo cedidas pela Embrapa Meio-Norte (Teresina-PI, Brasil). A biofortificação é um método que visa aumentar o valor nutricional de leguminosas com ajuda de melhoramento genético, técnicas transgênicas ou práticas agronômicas.¹⁴ O objetivo deste estudo é analisar o grau de similaridade entre oito amostras de sementes de feijão e a correlação entre flavonoides, fenóis totais com atividade antioxidante, utilizando as ferramentas estatísticas Análise de Componentes Principais (PCA), Análise de Agrupamento por Métodos Hierárquicos (HCA) e Análise de Correlação de Pearson.

2. Parte Experimental

2.1. Reagentes, padrões e materiais

Todos os reagentes usados são de grau analítico. A água deionizada ($\geq 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtida de um Millipore

RiOs-DITM adquirido da Milli-Q (Billerica, MA, EUA) foi usada para o preparo de todas as soluções. Para a quantificação de flavonoides e fenóis totais, utilizaram-se os seguintes reagentes: etanol P. A. (Synth-Diadema/SP, Brasil), cloreto de alumínio (Synth-Diadema/SP, Brasil), carbonato de sódio (Synth-Diadema/SP, Brasil), Folin Ciocalteu, ácido gálico e rutina (Sigma Aldrich-São Paulo/SP, Brasil). Os reagentes usados para o ensaio da atividade antioxidante utilizando os radicais ABTS^{•+} e DPPH[•] foram: ABTS ((ácido 2,2'-azino- bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) sal diamônico (Sigma Aldrich-São Paulo/SP, Brasil), etanol P.A (Synth-Diadema- SP, Brasil), metanol P.A (Synth-Diadema- SP, Brasil), persulfato de potássio (Sigma Aldrich-São Paulo/SP, Brasil), trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) (Sigma Aldrich- São Paulo/SP, Brasil), água destilada, DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (Sigma Aldrich-São Paulo/SP, Brasil). Foram utilizados os seguintes equipamentos: espectrofotômetro UV/visível (Quimis - São Paulo/SP, Brasil), centrífuga de bancada NI 1812 (Nova Instruments – Piracicaba/SP, Brasil), moinho multiuso (Lucadema - São José do Rio Preto/SP, Brasil), balança analítica (Mettler Toledo- Columbus/Ohio, EUA), mesa agitadora (Quimis-São Paulo/SP, Brasil).

2.2. Amostras

As cultivares de feijão-caupi biofortificados BRS Xiquexique (XIQ), BRS Tumucumaque (TUM), BRS Aracê (ARA) e não biofortificados BRS Guariba (GUA) foram produzidas pela Embrapa Meio-Norte (Teresina-PI, Brasil). Além dessas amostras, outras cultivares de feijões comuns foram selecionadas, sendo elas: feijão Preto (PRE), feijão Branco (BRA), feijão Carioca (CAR) e feijão Verde (VER). Essas cultivares foram adquiridas em um supermercado da cidade de Teresina-PI, Brasil e foram selecionadas do mesmo produtor industrial.

2.3. Preparo das amostras

A obtenção da farinha das cultivares de feijão-caupi, juntamente com outras amostras de feijões comerciais, foi realizada de acordo com Baroski *et al.*,¹⁵ com algumas modificações, os grãos de feijão foram moídos para a obtenção das farinhas e passadas por uma peneira de 75 mm de diâmetro, a fim de obter partículas mais finas. Em seguida, foram guardadas em tubos Falcon de 50 mL na geladeira para posterior análise. Foram preparados os extratos das amostras de feijão-caupi seguindo a metodologia de Rufino *et al.*,¹⁶ com modificações. Para isso, pesou-se 1 g de cada farinha, em tubo Falcon de 50 mL, e misturou-se com 5 mL de metanol (80%). A mistura foi colocada em agitação por 2 h com auxílio da mesa agitadora a 210 rpm. Depois, centrifugou-se a 3500 rpm a 5 min e 30 °C. Por fim, o sobrenadante foi removido e armazenado em geladeira para posterior análise. Para obtenção das massas das amostras,

coletou-se 1 ou 2 mL do extrato e levou-se para secar na estufa com as tampas abertas a 40 °C por 24 h.

2.4. Atividade antioxidante utilizando o radical ABTS^{•+}

Seguiu-se a metodologia de Baroski *et al.*,¹⁵ com algumas modificações. Para isso, soluções de ABTS 7 mM e persulfato de potássio 140 mM foram preparadas. O cátion radicalar ABTS^{•+} foi preparado por meio da reação de 8 mL da solução de ABTS com 140 µL da solução estoque de persulfato de potássio. A mistura foi deixada em repouso em ambiente escuro, à temperatura ambiente, por 16 h antes do uso. No dia da análise, diluiu-se a mistura em etanol (razão de 1:30) até obter uma absorbância em torno de 0,7 (734 nm). Para a leitura das medidas de absorbâncias, foram feitas 5 diluições de cada extrato, com volume iniciais 100 µL, 125 µL, 150 µL, 175 µL e 200 µL. Em seguida, foram adicionados 1800 µL do radical ABTS^{•+} e 200 µL do extrato mais etanol. Após a mistura, esperou-se 6 min em ambiente escuro e à temperatura ambiente. Em seguida, mediram-se as absorbâncias em 734 nm, em triplicata, por meio de espectrofotômetro UV-Vis (modelo SP-220, Biospectro).

2.5. Atividade antioxidante utilizando o radical DPPH[•]

O ensaio foi realizado por meio da metodologia descrita por Baroski *et al.*,¹⁵ com algumas modificações. Para isso, preparou-se uma solução do radical DPPH 0,60 mM, que foi envolvida com papel alumínio para evitar o contato com a luz e utilizada no mesmo dia da análise. Para a leitura das medidas de absorbâncias, foram feitas 5 diluições de cada extrato, com volume iniciais 100 µL, 125 µL, 150 µL, 175 µL e 200 µL, acrescentando-se 1800 µL do radical DPPH[•] e 200 µL do extrato mais etanol. Após a mistura, esperou-se 20 min em ambiente escuro e a temperatura ambiente. Em seguida, mediram-se as absorbâncias em triplicata com auxílio de um espectrofotômetro a 517 nm.

2.6. Quantificação de flavonoides totais

A quantificação de flavonoides seguiu a metodologia descrita por Baroski *et al.*,¹⁵ com algumas modificações. Para isso, uma solução de cloreto de alumínio 2% foi utilizada. Para a leitura das medidas de absorbâncias, preparou-se um extrato de 500 µg mL⁻¹, coletando-se 1000 µL de cada extrato. Posteriormente acrescentou-se igual volume de cloreto de alumínio. Em seguida, as amostras foram colocadas em tubos de ensaio ficando em repouso por 1 h em ambiente escuro e à temperatura ambiente. Por fim, mediram-se as absorbâncias em triplicata por meio de espectrofotômetro a 420 nm.

2.7. Quantificação de fenóis totais

O conteúdo de polifenóis totais foi determinado pelo método descrito por Qiu *et al.*,¹⁷ com algumas modificações.

Para isso, misturou-se 1 mL de extrato, 250 µL do reagente Folin Ciocalteu e 5 mL de água deionizada. A mistura foi agitada por 1 min em misturador vórtex. Em seguida, adicionou-se 2 mL de uma solução de carbonato de sódio a 15% Na₂CO₃ (m/v). Os tubos foram colocados em ambiente escuro por 1 h. Após esse tempo, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 745 nm.

2.8. Análise por CLAE

As análises por CLAE foram realizadas em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, Modelo Analítico Shimadzu®, LC-20 A com controladora CBM-20^a, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20 A, coluna C-18 Phenomenex Luna (250 × 4,60 mm; 5 µm; 110Å). Os dados foram processados usando o software de solução (versão 1.23 SP1) Shimadzu LC, com a temperatura do forno em 40° C, o tempo de corrida de 50 min, a vazão foi de 1 mL/min e detecção em 254 nm. As frações metanólicas foram analisadas por CLAE-DAD em modo gradiente exploratório linear e um sistema solvente adequado para cada fração. A análise por CLAE foi realizada de acordo com o procedimento proposto por Sales *et al.*,¹⁸ Para isso, antes da análise por CLAE, as amostras foram solubilizadas em (metanol/água 95:05, v/v) e submetidas a uma “limpeza”, usando cartuchos de sílica C-18 acoplados a uma membrana Millipore® (0,45 µm). Depois desse procedimento, aproximadamente (1 mg mL⁻¹) das amostras foram armazenadas em frascos para posterior injeção.

2.9. Estatísticas

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. ANOVA e teste de Tukey com nível de confiança de 95% (p < 0,05) foram aplicados para comparar os valores médios. A correlação de Pearson®, Análises de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamento por Métodos Hierárquicos (HCA) foram aplicadas para avaliar as similaridades entre as diferentes cultivares de feijão estudadas. A matriz de dados tem dimensão 8 (amostras: ARA, TUM, XIQ, GUA, BRA, CAR, PRE) por 4 (variáveis: FLAVONOIDES, CFT, ABTS, DPPH). Não foi aplicado pré-processamento. No HCA foi utilizada a distância euclidiana e ward com método hierárquico. O software R (versão 4.4.0) foi usado com os pacotes corrplot,¹⁹ ComplexHeatmap,²⁰ e MultivariateAnalysis.²¹

3. Resultados e Discussão

3.1. Concentração de fenóis totais e flavonoides

Na análise de flavonoides utilizou-se um padrão de rotina para a construção da curva de calibração. Foram preparadas soluções em cinco concentrações (10, 40, 80, 120 e 160 µg mL⁻¹), resultando em uma curva de calibração

($y = 0,459x - 0,2686$), que mostrou uma boa linearidade ($R^2 = 0,9943$). Essa curva foi utilizada para obtenção dos dados quantitativos apresentados em miligramas equivalente de rutina (ER) por grama de massa seca de material vegetal (mg ER/100 g).

A concentração de polifenóis totais foi deduzida de acordo com a curva de calibração ($y = 0,0083x - 0,01$) estabelecida com ácido gálico. Foram preparadas soluções em cinco concentrações (10, 40, 80, 120 e 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$), mostrando uma boa linearidade ($R^2 = 0,9906$). Todas as análises foram realizadas em triplicata, incluindo um branco para cada corrida. Os polifenóis foram apresentados em miligramas equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de massa seca de material vegetal (mg EAG /100 g).

A avaliação dos teores totais de fenóis e compostos flavonoides mostrou importantes relações existentes entre as amostras avaliadas nesse trabalho. De acordo com a Figura 1A, a cultivar de feijão-caupi XIQ e de feijão comum BRA mostraram resultados estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$). A cultivar de feijão comum VER obteve o maior nível de fenóis totais (100,23 mg EAG/100 g), enquanto a cultivar de feijão-caupi GUA registrou o menor valor (32,20 mg EAG/100 g). A Tabela 1 mostra os valores médios e desvios padrão das medidas realizadas em triplicata para

atividade antioxidante (ABTS e DPPH), flavonoides e fenóis totais (CFT). A Tabela S1 (dados suplementares) mostra a matriz de dados completa com todas as medições em triplicata.

Entre as cultivares de feijão-caupi biofortificadas, é possível observar que a cultivar BRS Tumucumaque obteve a maior concentração de fenóis totais (58,75 mg EAG/100 g). Nesse sentido, a biofortificação pode ter contribuído para o aumento da concentração de fenóis totais nessa cultivar, pois a cultivar não biofortificada GUA obteve a menor concentração. Em uma pesquisa anterior que envolveu a quantificação de fenóis totais em 9 linhagens de feijão comum (vermelho, creme, rosa, marrom, branco com manchas, branco, amarelo, cinza e preto), foi observado que o feijão branco obteve o menor teor de fenóis totais dentre os feijões analisados, com média de 60 mg EAG/100 g.⁹ Portanto, o valor de fenóis totais encontrado no feijão BRA (50,7 mg EAG/100 g) é semelhante ao relatado na literatura, estando menor que os demais feijões comuns em estudo (Branco, Carioca, Preto e Verde). Os resultados de fenóis totais encontrados nas amostras de feijão foram maiores ainda que os relatados em algumas leguminosas como grão de bico (creme) 46,0 mg EAG/100 g⁹, feijão mariposa 48,0 mg EAG/100 g⁹ e arroz integral 72,5 mg EAG/100 g.²²

Tabela 1. Valores médios e desvios padrão dos valores em triplicata de Flavonoides, Fenóis Totais (CFT) e Atividade Antioxidante (ABTS e DPPH)

Amostras	Flavonoides	CFT	ABTS	DPPH
ARA	8,90 \pm 0,02	55,29 \pm 0,17	5798,99 \pm 22,49	926,06 \pm 2,35
TUM	8,88 \pm 0,02	58,75 \pm 0,32	4988,37 \pm 19,71	924,20 \pm 6,30
XIQ	9,66 \pm 0,02	51,14 \pm 0,07	4625,13 \pm 35,30	876,49 \pm 3,41
GUA	7,18 \pm 0,10	32,21 \pm 0,12	20880,63 \pm 93,31	1184,24 \pm 3,62
BRA	9,99 \pm 0,02	50,70 \pm 0,07	5273,78 \pm 17,93	840,71 \pm 7,58
CAR	2,83 \pm 0,01	92,95 \pm 0,07	3629,91 \pm 11,16	3589,66 \pm 10,14
PRE	12,04 \pm 0,03	86,23 \pm 0,07	4421,06 \pm 18,47	2611,48 \pm 4,07
VER	7,31 \pm 0,01	100,23 \pm 0,27	20736,65 \pm 78,83	7694,46 \pm 24,12

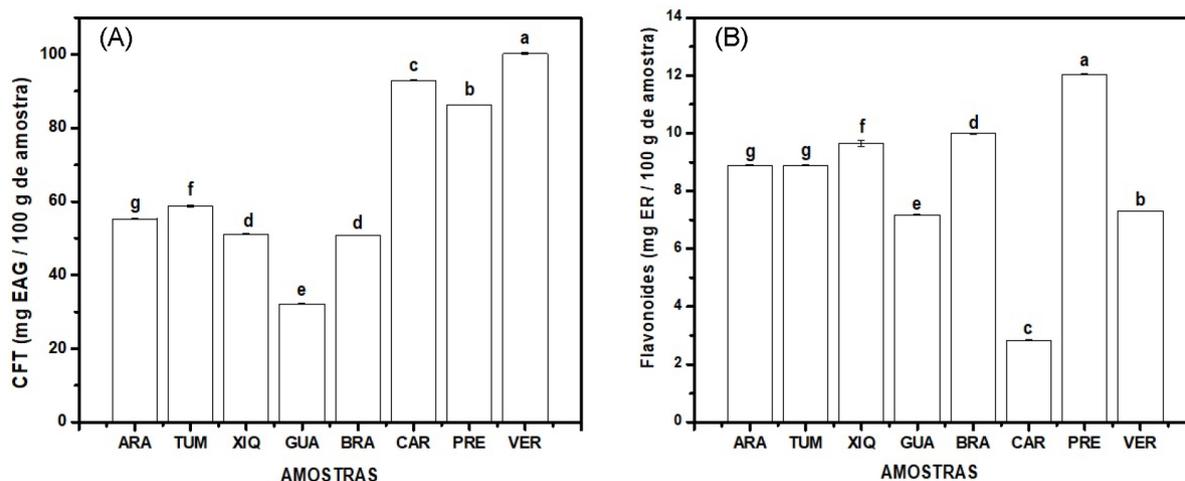


Figura 1. Concentrações de fenóis (1A) e flavonoides (1B) totais nas amostras analisadas. As médias seguidas de letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)

As cultivares de feijão-caupi seguem a mesma tendência, onde as sementes de cores escuras são encontradas altos valores de concentração de compostos fenólicos em comparação com outras variedades. Portanto, variedades de feijões de cor mais claras tendem a ter menor teor de fenóis totais.⁹ Na literatura é possível encontrar a concentração de fenóis totais para o feijão-caupi marron 63,78 mg EAG/100.⁹ Esse valor é semelhante ao encontrado para as cultivares de feijão-caupi, contudo, um pouco superior. A maior foi encontrada na cultivar TUM (58,74 mg EAG/100 g), e a menor concentração foi encontrada na cultivar GUA (32,20 mg EAG/100 g), o que era esperado, pois o feijão-caupi GUA apresenta tegumento branco e o TUM uma coloração mais escura.

De acordo com a Figura 1A, o feijão comum VER que obteve o maior teor de fenóis totais, apresentando classificação moderada (100,23 mg EAG/100 g). Em um estudo anterior, o feijão comum BRA foi classificado como moderado (1,014 mg EAG/ g), e o feijão comum PRE classificado com alto teor fenóis totais (2,184 mg EAG/g).⁹ No entanto, no presente estudo, as cultivares o feijão comum BRA e PRE apresentaram valores inferiores e foram classificadas como baixo teor de fenóis totais, como pode ser observado na Figura 1A. Em outra pesquisa, o teor de fenóis totais na cultivar TUM de feijão-caupi foi classificado como moderado (177,07 mg EAG/100 g).²³ A cultivar TUM analisada na Figura 1A enquadra-se na classificação de baixo teor de fenóis totais.

De acordo com a Figura 1B, as cultivares ARA e TUM são estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$). O feijão comum PRE obteve o maior teor de flavonoides totais (12,02 mg ER/100 g). Uma justificativa para isso é que os feijões de coloração preta se destacam com altos teores de antocianinas, que são um tipo de flavonoides responsáveis pela pigmentação vermelha, azul ou roxa das plantas.⁹ Já o feijão CAR obteve a menor concentração de flavonoides (2,83 mg ER/100 g) entre todas as amostras de feijões analisadas. Entre as amostras de feijão-caupi, a cultivar que apresentou maior concentração de flavonoides foi o feijão XIQ (9,66 mg ER/100 g), e o que apresentou menor concentração foi a cultivar GUA. Portanto, é possível observar que a biofortificação também mostrou possíveis influências na concentração de flavonoides.

Os níveis de flavonoides foram inferiores aos relatados em uma pesquisa realizada com as cultivares de feijão-caupi, ARA 58,35 mg/100 g, TUM 45,80 mg/100 g e XIQ 67,96 mg/100 g.²⁴ Por outro lado, outras cultivares de feijão-caupi do sudoeste de Maluku, Indonésia, obtiveram valores semelhantes, variando entre 7,0 a 29 mg/100 g.²⁵ Outra leguminosa que também obteve valores semelhantes foram as leguminosas de feijão *Dolichos (Labiab purpureus L.)* da Índia que variou de 2,15 a 8,32 mg/100 g.²⁶

Os flavonoides, encontrados no feijão-caupi e em outras leguminosas, são encontrados principalmente no tegumento da semente, impactando na cor do tegumento.²⁷ A principal

via de produção dos compostos fenólicos está associada ao estresse ambiental por meio dos fenilpropanoides (PPP).²⁸ A literatura relata a biossíntese de formação dos ácidos fenólicos e flavonoides, sendo que a maioria dos compostos fenólicos são derivados da fenilalanina seguindo a rota do ácido chiquímico. Nessa via, a molécula de amônia é dissociada da fenilalanina por meio da enzima fenilalanina amônia-liase, e em seguida formam-se os ácidos trans-cinâmico e cumárico. Os ácidos formados servem como substratos para a formação dos fenólicos e flavonoides.²⁹ Portanto, as condições de cultivo podem influenciar a concentração de flavonoides e compostos fenólicos.

3.2. Atividade antioxidante utilizando o método do radical DPPH e ABTS

Na análise da atividade antioxidante utilizando os radicais DPPH e ABTS, foi utilizado um padrão de Trolox para a obtenção das curvas de calibração. Para o radical DPPH, obteve-se uma curva com a equação $y = -0,0021x + 0,523$, que apresentou uma boa linearidade ($R^2 = 0,9925$). Já para o radical ABTS, a curva de calibração obtida foi $y = -0,0002x + 0,4623$, que também apresentou uma boa linearidade ($R^2 = 0,9955$).

De acordo com a Figura 2A, as cultivares de feijão-caupi ARA e TUM obtiveram valores de atividade antioxidantes semelhantes ($p < 0,05$) utilizando o método de eliminação do radical DPPH. A amostra de feijão comum Verde foi a que obteve o maior nível de atividade antioxidante (7694,4649 $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g}$). Logo, essa alta atividade antioxidante pode estar relacionada à presença de compostos fenólicos. Os valores de atividade antioxidante utilizando o método DPPH nas cultivares de feijão-caupi, ARA (926,06 $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g}$), TUM (924,20 $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g}$) e XIQ (876,49 $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g}$) foram maiores do que as mesmas cultivares relatadas na literatura para o ARA 614,7 $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g}$, TUM 551,5 $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g}$, XIQ 575,4 $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g}$.²⁴ Algumas amostras ficaram maiores que a leguminosa Ervilha 1249 $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g}$.³⁰ Em contrapartida, as cultivares de feijão-caupi juntamente com feijão BRA ficaram menores.

Na literatura, foi possível encontrar valores de atividade antioxidante para feijão comum equivalente a 3362 $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g}$.³¹ Com exceção do VER 7694,45 $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g}$ e CAR 3589,66 $\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ g}$, todos os demais feijões ficaram abaixo dos dados relatados nesse trabalho.

Os ensaios com a atividade de eliminação de radicais livres de DPPH em variedades de leguminosas são agrupados de acordo com o ponto de atividade de eliminação de radicais livres DPPH, para valores baixos (ponto radical unidades DPPH/g < 125), moderado (125-400, ponto radical unidades DPPH/g) e alto (> 400 pontos radical unidades DPPH/g).³² Diante desse agrupamento, é possível observar na Figura 2A que todos os feijões analisados podem ser classificados como altos valores de atividade antioxidante,

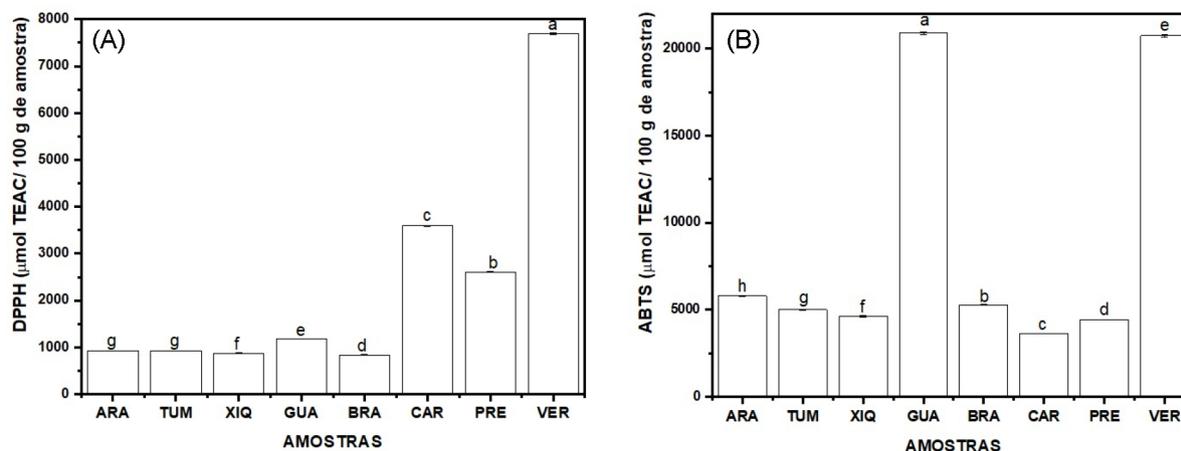


Figura 2. Atividade antioxidante de eliminação do radical DPPH em $\mu\text{mol TEAC}/100\text{ g}$ de amostra (2A) e do radical ABTS em $\mu\text{mol TEAC}/100\text{ g}$ (2B) nas amostras analisadas. As médias seguidas de letras minúsculas diferentes são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$)

sendo que o feijão comum VER apresentou o maior valor de atividade antioxidante de eliminação de radicais livre DPPH. Esse alto valor de atividade antioxidante pode ser justificado pela presença de compostos fenólicos, pois no feijão os compostos fenólicos atuam na defesa contra o estresse ambiental e predadores. Essa ação protetora despertou o interesse da comunidade científica, que identificou nesta leguminosa não só a presença de compostos bioativos como ácidos fenólicos, flavonóis, flavan-3-óis, taninos condensados e antocianinas, mas também atividades anti-inflamatórias e antioxidantes.³³⁻³⁴

Na Figura 2B, ainda é possível observar que todas as amostras de feijão obtiveram valores de atividade antioxidante estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) utilizando o método de eliminação do radical ABTS. A cultivar GUA obteve o maior valor de atividade antioxidante (20880,63 $\mu\text{mol TEAC}/100\text{ g}$) seguido do feijão VER (20736,65 $\mu\text{mol TEAC}/100\text{ g}$), os menores valores de atividade antioxidante foram obtidos pelos feijões CAR 3629,91 $\mu\text{mol TEAC}/100\text{ g}$ e PRE 4421,06 $\mu\text{mol TEAC}/100\text{ g}$. Os valores de atividade antioxidante foram cerca de 7 vezes maiores para as três cultivares de feijão-caupi analisadas em uma pesquisa, ARA 660,1 $\mu\text{mol TEAC}/100\text{ g}$, TUM 556,7 $\mu\text{mol TEAC}/100\text{ g}$, XIQ 608,5 $\mu\text{mol TEAC}/100\text{ g}$.²⁴ Contudo, ainda é possível encontrar na literatura valores de atividade antioxidante para uma cultivar de feijão-caupi marron 4626,1 $\mu\text{mol TEAC}/100\text{ g}$.⁹ Esse valor é semelhante ao encontrado nas cultivares de feijão-caupi, ARA 5798,99 $\mu\text{mol TEAC}/100\text{ g}$, TUM 4988,36 $\mu\text{mol TEAC}/100\text{ g}$ e XIQ 4625,12 $\mu\text{mol TEAC}/100\text{ g}$.

Na mesma pesquisa, também foi analisada a atividade antioxidante do feijão comum PRE 2046,4 $\mu\text{mol TEAC}/100\text{ g}$.⁹ O valor encontrado para o feijão PRE foi de 4421,06 $\mu\text{mol TEAC}/100\text{ g}$, ou seja, é mais que o dobro em relação ao relatado pela literatura e, portanto, sendo também menor que as demais amostras de feijões analisadas. Na literatura, ainda é possível encontrar atividade antioxidante de feijão comum de 1804000 $\mu\text{mol TEAC}/100\text{ g}$, ou seja, cerca de 100 vezes maior que os valores encontrados.³¹ A atividade de

eliminação de radicais livres em leguminosas é agrupada por meio do radical ABTS de acordo com seus valores de TEAC. Dessa forma, é considerado baixo ($< 600\ \mu\text{mol TEAC}/100\text{ g}$), moderado ($600\text{--}1200\ \mu\text{mol TEAC}/100\text{ g}$) e alto ($> 1200\ \mu\text{mol TEAC}/100\text{ g}$).⁹ Diante dessa classificação, é possível observar na Figura 2B, que todos os feijões podem ser classificados com alto valor de eliminação de radicais livres utilizando o radical ABTS, reforçando assim o resultado encontrado no teste com o radical DPPH.

3.3. Correlação de Pearson

Foi aplicado o método de Pearson para avaliar a correlação entre as quatro variáveis estudadas nas sementes de feijão. Na Figura 3, são apresentados os valores dos coeficientes de correlação de Pearson estimados (r), com faixa de cor variando de uma correlação negativa forte

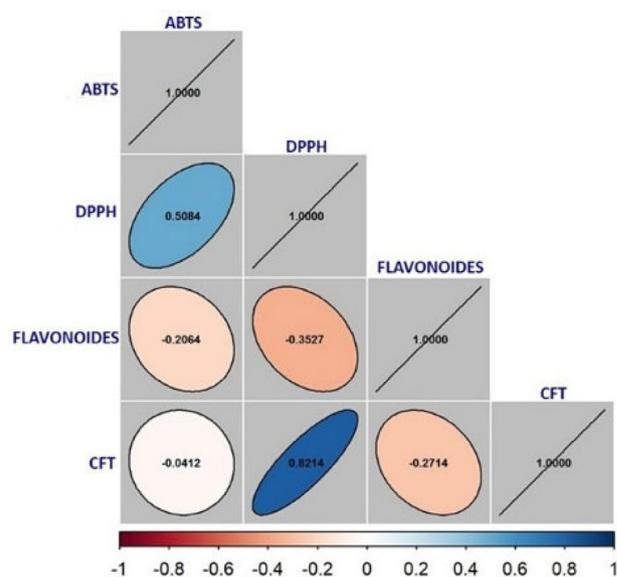


Figura 3. Coeficientes de Pearson para a correlação entre as concentrações de flavonoides, Fenóis Totais e Atividades antioxidantes medidas pelo método ABTS e DPPH em sementes de diferentes cultivares de feijão

(cor vermelha), baixa correlação (cor branca) e uma alta correlação positiva (cor azul).

Foram considerados significativos os valores com $r > 0,7$ e $p < 0,05$. Embora não fossem significativas, as atividades antioxidantes medidas pelo método ABTS e DPPH correlacionam-se positivamente. Foi observada apenas uma correlação significativa ($r = 0,821$, $p = 0,0087$), sendo essa positiva entre a concentração de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante medida pelo método DPPH. Correlação semelhante foi relatada na literatura em um estudo sobre variedades de batata doce, no qual foram analisadas as variáveis CFT, DPPH e ABTS, obtendo uma correlação positiva e estatisticamente significativa ($r = 0,83$, $p < 0,01$), indicando que quanto maior o teor de compostos fenólicos totais, maior a atividade antioxidante.³⁵ As demais correlações não apresentaram significância estatística.

3.4. Análise de componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais utiliza um artifício matemático que transforma um conjunto de variáveis possivelmente correlacionadas em um novo conjunto de variáveis não correlacionadas, chamadas componentes principais.³⁶ Antes da análise de componentes principais, a matriz de dados 8×4 (amostras \times variáveis) foi autoescalada com o objetivo de atribuir o mesmo peso ao conjunto. Foi realizado o teste de esfericidade de Bartlett com o pacote *psych*, função *cortest.bartlett* do software R, obtendo-se $p = 0,00769$ com $df = 6$ (graus de liberdade). Isso significa que se pode rejeitar a hipótese nula H_0 de que a matriz de correlação é a matriz identidade e as variáveis têm correlação entre si na população.

As componentes PC1 e PC2 descrevem 80% da variação total dos dados, sendo a primeira componente principal (PC1) responsável por 54% e a segunda (PC2), por 26% da variação. A Tabela 2 apresenta os valores das cargas fatoriais (loadings) de cada componente principal, que indicam a contribuição de cada variável para cada componente principal. Assim, observa-se que a variável DPPH é a que mais contribui para a PC1, enquanto que a variável ABTS é a que mais contribui para a PC2.

Tabela 2. Porcentagem de contribuição de cada PC e loadings das variáveis

Variáveis	PC1 (54%)	PC2 (26%)
ABTS	0,340	0,816
DPPH	0,658	-0,031
Flavonoides	-0,390	-0,129
Fenóis Totais	0,547	-0,562

A Figura 4 mostra que os feijões Carioca e Verde foram separados dos demais grãos na região de PC1 altamente positiva. Isso ocorre porque esses feijões possuem valores elevados de DPPH e CFT. Existe uma alta correlação positiva entre ABTS ($r = 0,8335$) e PC2. Além disso, a

Figura 4 mostra os feijões BRS-Guariba e Verde na região da PC2 positivo, o que está associado com os valores elevados de ABTS. O grupo dos feijões BRS-Aracê, BRS-Tumucumaque, Branco e BRS-Xiquexique apresenta, na Figura 4, uma região de valores moderados a baixos das variáveis originais. A Tabela S5 (material suplementar) mostra os coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis originais e as pontuações para todos os PCs.

DPPH e ABTS foram as variáveis que mais influenciaram de forma positiva em PC1 e PC2, respectivamente. Na Figura 4, é possível observar que a atividade antioxidante com o método DPPH nos feijões comuns Carioca e Verde (lado positivo de PC1) os distingue dos feijões comuns BRA e PRE (lado negativo de PC1). No grupo das cultivares de feijão-caupi observa-se que separação da cultivar não biofortificada GUA das cultivares biofortificadas (ARA, TUM e XIQ) foi ocasionada principalmente pela atividade antioxidante com o método ABTS.

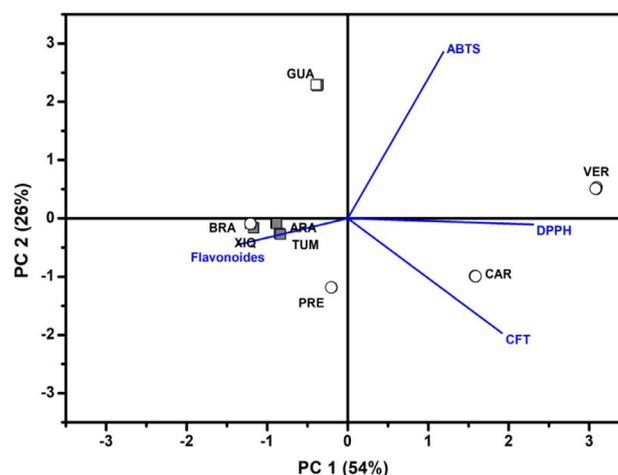


Figura 4. Gráfico biplot da análise de componentes principais (PCA), mostrando as cargas fatoriais (loadings), os autovalores (scores) e as porcentagens da variância explicada pelas componentes principais PC1 e PC2

Na literatura, foi encontrada uma análise multivariada de dados, na qual foi confirmada a correlação entre atividade antioxidante e conteúdo fenólico total por meio da análise de componentes principais (PCA), pelo fato das variáveis utilizadas (FRAP, ABTS, CFT) estarem próximas umas das outras.³⁴ Em um trabalho realizado com as mesmas amostras de feijão, observou-se que a concentração de micronutrientes separa as amostras de feijão comum das cultivares de feijão-caupi.¹¹ Porém, dentro do grupo das cultivares de feijão-caupi, não foi observada uma distinção entre as cultivares biofortificadas e a não biofortificada GUA, fato esse observado com as variáveis estudadas no presente trabalho.

Diante desse fato, é possível que haja alguma relação entre a biofortificação e o aumento do teor de flavonoides totais e fenóis totais das cultivares de feijão-caupi biofortificadas em relação ao controle. Uma das evidências dessa relação é que a cultivar GUA não biofortificada

apresentou menor teor de fenóis e flavonoides totais em relação às demais cultivares biofortificadas.

3.5. Análise de agrupamento por métodos hierárquicos (HCA)

Para uma análise das separações observadas na análise de componente principais foi utilizado a estrutura de agrupamento por métodos hierárquicos e a contribuição das variáveis para os agrupamentos formados por meio da representação visual de um mapa de calor. No mapa de calor, cores mais vermelhas e azuis indicam menores e maiores concentrações, respectivamente. Portanto, verifica-se na Figura 5, no agrupamento das amostras, dois Clusters. O primeiro Cluster ficou agrupado apenas com os feijões Verde e Carioca, mostrando que essas amostras são similares e apresentam as maiores concentrações de compostos fenólicos totais e atividades antioxidantes utilizando o método DPPH.

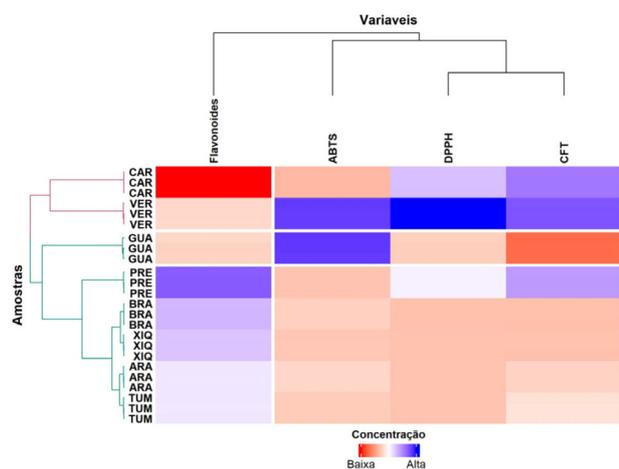


Figura 5. Dendrograma com agrupamento das amostras (horizontal) e variáveis (vertical) e mapa de calor com variações de cores do vermelho (menor concentração) ao azul (maior concentração)

O segundo Cluster ficou dividido em 3 subgrupos, o primeiro formado pela cultivar não biofortificada GUA, o segundo pela semente da cultivar comum PRE e o terceiro pelos feijões TUM, BRA, XIQ, ARA. Este cluster apresenta as sementes com maiores concentrações de flavonoides e as menores concentrações de CFT e atividades antioxidantes utilizando os métodos DPPH e ABTS⁺. No agrupamento das variáveis verifica-se que as variáveis DPPH e CFT, em relação às outras variáveis estudadas, apresentaram resultados mais semelhantes entre as amostras.

É possível observar na Figura 2A que as afinidades de eliminação do radical ABTS são maiores em relação ao radical DPPH em algumas amostras, como é o caso das amostras mencionadas acima. Na literatura, é possível identificar que o feijão comum PRE teve maior afinidade para a eliminação do radical DPPH do que para o radical ABTS.³⁷ No entanto, o maior valor de atividade antioxidante foi para o radical ABTS, 4421,06 $\mu\text{mol TEAC}/100\text{ g}$ contra 2611,47 $\mu\text{mol TEAC}/100\text{ g}$ do radical DPPH para o feijão Preto. Logo, a formação desses três subgrupos pode ser devido a menor afinidade dessas amostras em relação a eliminação do radical DPPH.

A literatura relata ainda que o radical DPPH é mais utilizado para medir antioxidantes lipofílicos, enquanto o radical ABTS é utilizado em antioxidantes hidrofílicos.³⁸ Logo, essa alta afinidade dos extratos em sequestrar o radical ABTS pode ser devido à presença de compostos polares que contribuem para a atividade antioxidante.

3.6. Identificação de compostos fenólicos

Os cromatogramas dos compostos fenólicos identificados e os padrões ácido caféico, ácido cinâmico, ácido ferúlico, ácido gálico, quercetina e rutina foram analisados e comparados de acordo com o tempo de retenção e comprimento de onda. Na Tabela 3, é possível observar que os compostos fenólicos encontrados nas amostras analisados foram, ácido cinâmico, ácido cafeico, quercetina e rutina, sendo que a rutina foi identificada na maioria das amostras de feijão.

Em um estudo realizado com extratos solúveis de feijão-caupi, o maior teor de compostos fenólicos foi de ácido ferúlico. Contudo, não foi possível identificar ácido ferúlico nas cultivares de feijão-caupi.³⁹ Dessa forma, a discrepância dos resultados obtidos se deve aos diferentes métodos de extração, o período de colheita e a variedade das cultivares analisadas.

É possível identificar no cromatograma da cultivar GUA, apresentado na Figura 6A, picos eluindo em 17,49 e 19,78 minutos. Os espectros no UV destes analitos foram comparados com aqueles obtidos para os padrões analisados de ácido cinâmico e quercetina. No extrato da cultivar XIQ, é possível observar na Figura 6B que o tempo de retenção em 15,70 minutos foi compatível com o padrão de rutina. Na cultivar ARA é possível observar na figura 6D os tempos de retenção em 15,69 e 17,43 minutos estão de acordo com

Tabela 3. Tempos de retenção expressos em minutos (min) dos cromatogramas das amostras de feijão

Compostos Fenólicos	Tempo de Retenção (padrão)	Feijão-Caupi (min)	Feijão-Comum (min)
Ácido caféico			14,80
Ácido cinâmico		17,49	17,51; 17,66
Quercetina	20,73	19,78; 17,43	
Rutina	16,39	15,70; 15,69	16,13; 15,72

aqueles observados para os padrões de rutina e quercetina. Na Figura 6C, é possível observar o cromatograma do extrato da cultivar TUM e os picos de baixa e alta intensidade não foram compatíveis com nenhum padrão analisado. Pesquisadores que analisaram os extratos de feijão-caupi nas regiões do tegumento e cotilédones identificaram, por meio do cromatograma, ácidos fenólicos como, ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido cumárico e ácido ferúlico, em 280 nm. Sendo que os ácidos fenólicos mais predominantes encontrados no tegumento foram ácido gálico e protocatecuico, enquanto nos cotilédones p-ácido hidroxibenzoico.⁴⁰ Nas amostras de feijão-caupi, não foi possível identificar ácido gálico e nem ácido ferúlico, sendo que na cultivar GUA e ARA apresentaram uma maior variedade de compostos fenólicos.

Na Figura 7, é possível observar os cromatogramas dos extratos de feijões comuns. Na Figura 7A, correspondente a análise do feijão BRA, foi possível identificar um pico com tempo de retenção 15,72 minutos, compatível com o padrão de rutina. Já na Figura 7B, o cromatograma do extrato de feijão CAR apresenta picos com tempos de retenção em 14,80 e 17,66 minutos, semelhantes aos padrões de ácido caféico e ácido cinâmico. Na Figura 7C, referente à análise do feijão PRE, é possível identificar os picos com tempos de retenção em 16,13 e 17,51 minutos, característicos dos padrões de rutina e ácido cinâmico. No extrato de feijão VER, é possível identificar no

cromatograma apresentado na Figura 7D um pico com o tempo de retenção em 15,72 minutos, semelhante ao tempo de retenção do padrão de rutina. Portanto, o feijão comum PRE e CAR apresentaram uma maior variedade de compostos fenólicos de acordo com os tempos de retenção dos padrões analisados.

Os principais ácidos fenólicos encontrados no feijão comum são ácido gálico, caféico, clorogênico, ferúlico, sinápico e cumárico.⁴¹ No entanto, nas amostras de feijão comum do presente estudo, foi possível encontrar apenas ácido cinâmico, ácido caféico e rutina.

4. Conclusões

Algumas amostras de feijão apresentaram correlação entre a concentração de fenóis totais e a atividade antioxidante, como é o caso do feijão VER, que obteve os maiores valores de fenóis totais e atividade antioxidante utilizando o método DPPH[•]. Já com atividade antioxidante utilizando o método ABTS^{•+}, a cultivar GUA de feijão-caupi obteve o maior valor, em contrapartida, os valores das quantificações de flavonoides totais e fenóis totais foram os menores. No feijão PRE foi encontrada a maior concentração de flavonoides totais. Porém, o mesmo não aconteceu com a atividade antioxidante, sendo que o feijão VER obteve os maiores valores de atividade antioxidante

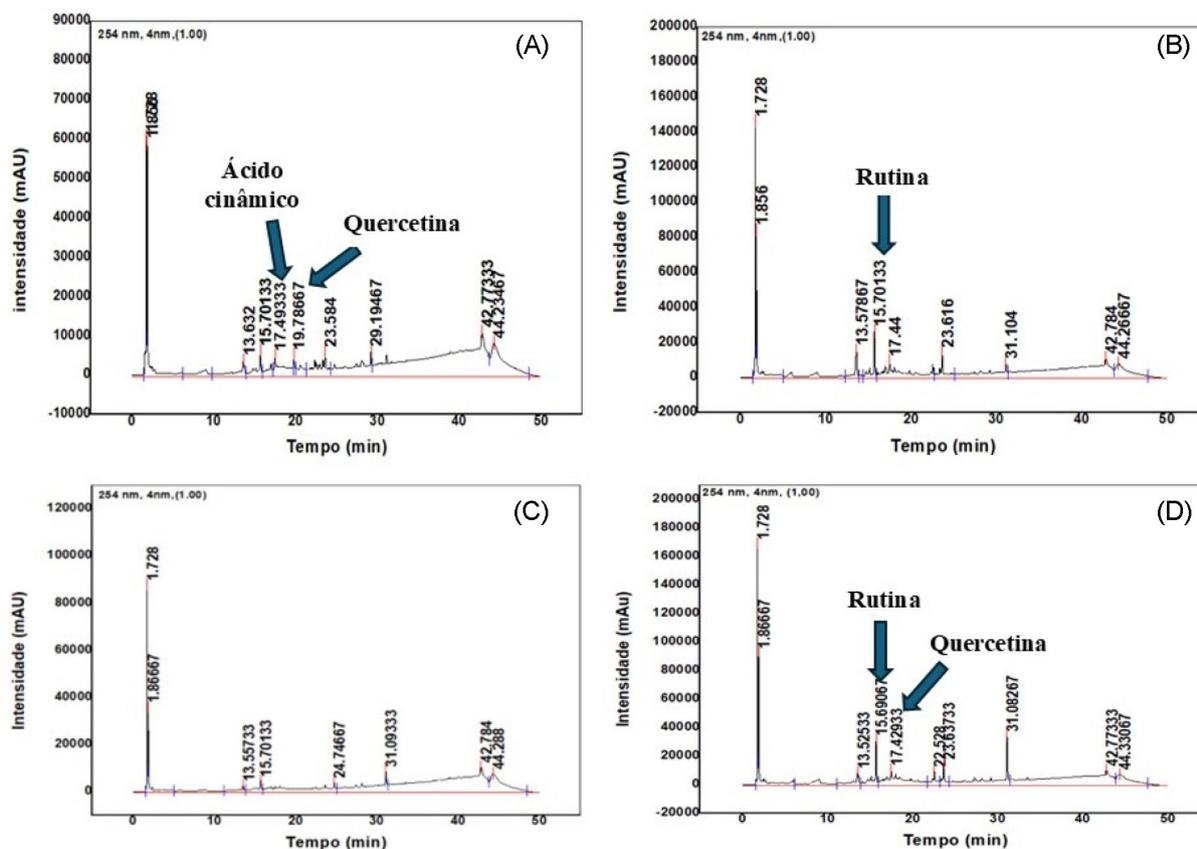


Figura 6. Cromatogramas dos extratos de feijão-caupi, 6A cultivar Guariba (GUA), 6B feijão Xiquexique (XIQ), 6C Tumucumaque (TUM) e 6D Aracê (ARA) (detecção em 254 nm)

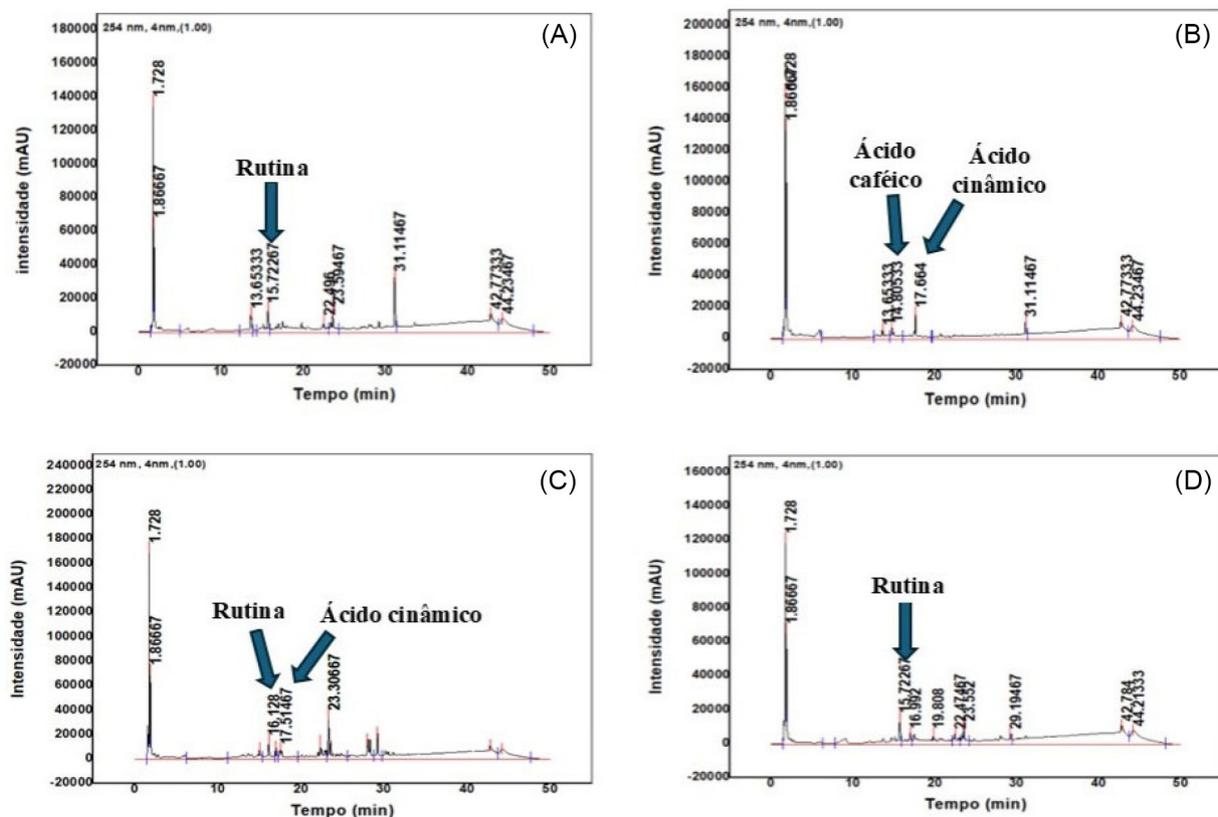


Figura 7. Cromatogramas dos extratos de feijão comum, 7A Branco (BRA), 7B Carioca (CAR), 7C Preto (PRE) e 7D Verde (VER) (detecção em 254 nm)

utilizando os métodos ABTS^{•+} e DPPH[•] entre as cultivares de feijão comum. Nos resultados de atividade antioxidante, realizados por meio do radical DPPH[•], observou-se que as cultivares de feijão-caupi chegaram a valores inferiores de atividade antioxidante em relação à maioria dos feijões comuns. Por meio do cromatograma de CLAE, foi possível observar que o composto fenólico rutina está presente na maioria das amostras analisadas. Contudo, recomenda-se uma posterior análise de quantificação desses compostos fenólicos encontrados nas amostras (ácido cinâmico, ácido caféico, quercetina e rutina) e compará-los com outros padrões, a fim de identificar outros picos dos cromatogramas e melhorar o entendimento do perfil fenólico desses extratos.

Informações Suplementares

Esse trabalho apresenta informações suplementares e estão disponíveis gratuitamente em: <https://rvq.sbg.org.br>

Referências Bibliográficas

- Nina, N.; Theoduloz, C.; Paillán, H.; Jiménez-aspee, F.; Márquez, K.; Schuster K.; Becker, L.; Oellig, C.; Frank, J.; Schmeda-Hirschmann, G. Chemical profile and bioactivity of Chilean bean landraces (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Functional Foods journal* **2023**, *104*, 105513. [Crossref]
- Filho, F. R. F.; Ribeiro, Q. V.; Rocha, de M. M.; e Silva, D. J. K.; Nogueira, da R. do S. M.; Rodrigues, V. E. *Feijão-Caupi no Brasil: Produção, melhoramento genético avanços e desafios*. 1.ed. Embrapa Meio-Norte: Teresina, Brasil, 2011.
- Carvalho, M.; Castro, I.; Moutinho-Pereira, J.; Correia, C.; Egea-Cortines, M.; Matos, M.; Rosa, E.; Carmide, V.; Lino-Neto, T. Evaluating stress responses in cowpea under drought stress. *Journal of Plant Physiology* **2019**, *241*, 153001. [Crossref]
- Apea-bah, F. B.; Serem, C. J.; Bester, J. M.; Duodu, G. K.; Beta, T. Effect of simulated in vitro upper gut digestion of processed cowpea beans on phenolic composition, antioxidant properties and cellular protection. *Food Research International* **2021**, *150*, 110750. [Crossref]
- Awika, M. J.; Duodu, G. K. Bioactive polyphenols and peptides in cowpea (*Vigna unguiculata*) and their health promoting properties: A review. *Journal of Functional Foods* **2017**, *38*, 686. [Crossref]
- Skrovankova, S.; Sumczynski, D.; Mlcek, J.; Jurikova, T.; Sochor, J. Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, *16*, 24673. [Crossref]
- Forni, C. F. F.; Bartoli, M.; Pieretti, S.; Facchiano, A.; D'Arcangelo, D.; Norelli, S.; Valle, G.; Nisini, R.; Beninati, S.; Tabolacci, C.; Jadeja, N. R. Beneficial Role of Phytochemicals on Oxidative Stress and Age-Related Diseases. *BioMed Research International* **2019**, *1*, 8748253. [PubMed]
- Kelley, D. S.; Adkins, Y.; Laugero, K. D. A Review of the Health Benefits of Cherries. *Nutrients* **2018**, *10*, 368. [Crossref]

9. Marathe, S. A.; Rajalakshmi, V.; Jamdar, N. S.; Sharma, A. Comparative study on antioxidant activity of different varieties of commonly consumed legumes in India. *Food and Chemical Toxicology* **2011**, *49*, 2005. [[Crossref](#)]
10. Bai, Y.; Xu, Y.; Wang, B.; Li, S.; Guo, F.; Hua, H.; Zhao, Y.; Yu, Z. Comparison of phenolic compounds, antioxidant and antidiabetic activities between selected edible beans and their different growth periods leaves. *Journal of Functional Foods* **2017**, *35*, 694. [[Crossref](#)]
11. Coelho, R. C.; Silva, N. S. D.; Silva, de C. H.; Rocha, de M. M.; Barsotti, F. C. R.; Maltez, F. H.; Dantas, C.; Júnior, L. A. C.; Barbosa, de S. H. Revealing the extended effect of biofortification on seed of cowpea cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* **2023**, *119*, 105291. [[Crossref](#)]
12. De Barros, H. E. A.; Alexandre, S. C. A.; Campolina, A. G.; Alvarenga, G. F.; Ferraz dos S. M. L.S.; Natarelli, L. V.; Carvalho, N. E. E.; Boas, V. de B. V. E. Edible seeds clustering based on phenolics and antioxidant activity using multivariate analysis. *LWT - Food Science and Technology* **2021**, *152*, 112372. [[Crossref](#)]
13. Granato, D.; Santos, S. J.; Escher, G. B.; Ferreira, B. L.; Maggio M. R. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. *Trends in Food Science and Technology* **2017**, *72*, 83. [[Crossref](#)]
14. Kumar, S.; Pandey, G. Biofortification of pulses and legumes to enhance nutrition. *Heliyon* **2020**, *6*, e03682. [[Crossref](#)]
15. Boroski, M.; Visentainer, V. J.; Cottica, M. S.; de Moraes, R. D. *Antioxidante: Princípios e métodos analíticos*. 1ª ed. Editora Appris: Curitiba, Brasil, 2015.
16. Rufino, M. do S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S. de; Moraes, S. M. de; Sampaio, C. de G.; Pérez - Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. D. *Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH*. Embrapa Agroindústria Tropical: Fortaleza, Brasil, 2007.
17. Qiu, Y.; Liu, Q.; Beta, T. Antioxidant properties of commercial wild rice and analysis of soluble and insoluble phenolic acids. *Food Chemistry* **2010**, *121*, 140. [[Crossref](#)]
18. Sales, P.; de Oliveira, M. Das D. A.; Watanabe, J. M. F.; Barbosa, da S. P. A.; da Mata, B. C. A.; Viana, M. de J. e S.; Medeiros, P. C. D. R.; Souza, D. C.; Silva, J. do N.; Lima, M. N.; Júnior, da C. S. J.; Martins, A. F.; Filho, S. e A. F.; de Almeida, M. P. Phytochemical characterization, isolation, antioxidant and cytogenotoxic activity of leaves of *Heliotropium elongatum* (Lehm) I.M. Johnst. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issue* **2023**, *86*, 871. [[PubMed](#)]
19. Wei, T.; Simko, V. R package corrplot: Visualization of a Correlation Matrix (version 0.95). **2024**. [[Link](#)]
20. Gu, Z. Complex heatmap visualization. *iMeta* **2022**, *1*, e43. [[PubMed](#)]
21. Azevedo, A. M.. Multivariate Analysis: Pacote Para Análise Multivariada - R package, v. 0.5.0. **2025**. [[Link](#)]
22. Gong, E. S.; Luo, J. S.; Li, T.; Liu, M. C.; Zhang, W. G.; Chen, J.; Zeng, C. Z.; Liu, H. R. Phytochemical profiles and antioxidant activity of brown rice varieties. *Food Chemistry* **2017**, *227*, 432. [[Crossref](#)]
23. Madrera, R. R.; Negrillo, C. A.; Valle, S. B.; Fernández, F. J. J. Phenolic Content and Antioxidant Activity in Seeds of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Foods* **2021**, *10*, 864. [[Crossref](#)]
24. Barros, dos A. V. N.; Rocha, M. de M.; Glória, A. B. M.; Araújo, da M. A. M.; Moreira- Araújo, dos R. S. R Effect of cooking on the bioactive compounds and antioxidant activity in grains cowpea cultivars. *Revista Ciência Agronômica*, **2017**, *5*, 824. [[Crossref](#)]
25. Karuwal, L. R.; Sinay,H.; Sangur, K.; Purwaningrahayu,D. R.; Yusnawan, E.; Nugraha,Y. Identification of metabolite profiles of local cowpeas (*Vigna unguiculata* L. Walp) from Southwest Maluku, Indonesia. *Journal of Agriculture and Food Research* **2023**, *14*, 1.[[Crossref](#)]
26. Das, Debarati Pal.; Pal, K.; Sahana, N.; Mondal, P.; Das, A.; Chowdhury, S.; de Somnath, M.; Pandit, K. G. Evaluation of morphological and biochemical parameters and antioxidant activity and profiling of volatile compounds in fifteen Dolichos bean (*Lablab purpureus* L.) genotypes of India. *Food Chemistry Advances* **2023**, *2*, 100164. [[Crossref](#)]
27. Ojwang, L. O.; Dykes, L.; Awika, J. M. Ultra Performance Liquid Chromatography–Tandem Quadrupole Mass Spectrometry Profiling of Anthocyanins and Flavonols in Cowpea (*Vigna unguiculata*) of Varying Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 3735. [[Crossref](#)]
28. Liu, H.; Kang, Y.; Zhao, Y. X.; Liu, Y.; Zhang, X.; ShuJie, Z. Effects of elicitation on bioactive compounds and biological activities of sprouts. *Journal of Functional Foods* **2019**, *53*, 136. [[Crossref](#)]
29. Moreira-araújo, R. S. dos R.; Sampaio, R. G.; Soares, M. A. R.; da Silva, P. C.; Araújo5, Da M. A. A.; Arêas, G. A. J. Identification and quantification of phenolic compounds and antioxidant activity in cowpeas of BRS Xiquexique cultivar. *Revista Caatinga* **2018**, *1*, 209. [[Crossref](#)]
30. Chen, S. K.; Lin, H.; Wang, X.; Yuan, Y.; Yin, J.; Song, X. Comprehensive analysis in the nutritional composition, phenolic species and in vitro antioxidant activities of different pea cultivars. *Food Chemistry: X* **2023**, *17*, 100599. [[Crossref](#)]
31. Silva, O. M.; Brigide, P.; de Toledo, V. M. N.; Canniatti-Brazaca, G. S. Phenolic compounds and antioxidant activity of two bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) submitted to cooking. *Brazilian Journal of Food Technology* **2017**, *21*, 1. [[Crossref](#)]
32. Mendoza-Sánchez, M.; Guevara-González, G. R.; Castaño-Tostado, E.; Mercado-Silva, M. E.; Acosta-Gallegos, A. J.; Rocha-Guzmán, E N.; Reynoso-Camacho, R Effect of chemical stress on germination of cv Dalia bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as an alternative to increase antioxidant and nutraceutical compounds in sprouts. *Food Chemistry* **2016**, *212*, 128. [[Crossref](#)]
33. Amopofo, J. O.; Ngadi, M. Stimulation of the phenylpropanoid pathway and antioxidant capacities by biotic and abiotic elicitation strategies in common bean (*Phaseolus vulgaris*) sprouts. *Process Biochemistry*, **2021**, *100*, 98. [[Crossref](#)]
34. Sancho, S. A. R.; Pavan, V.; Pastore, M. G. Effect of in vitro digestion on bioactive compounds and antioxidant activity of common bean seed coats. *Food Research International* **2015**, *76*, 74. [[Crossref](#)]

35. Zhang, L.; Gao, Y.; Deng, B.; Ru, W.; Tong, C.; Bao, J. Physicochemical, Nutritional, and Antioxidant Properties in Seven Sweet Potato Flours. *Frontiers in Nutrition* **2022**, *9*, 1. [[Crossref](#)]
36. Borges, M. E.; Sidou, F. L. Teaching Principal Component Analysis Using a Free and Open Source Software Program and Exercises Applying PCA to Real-World Examples. *Journal of Chemical Education* **2020**, *97*, 1666. [[Crossref](#)]
37. Yang, Q. Q.; Ge, Y.; Gunaratne, A.; Kong, K.; Li, H.; Gul, K.; Kumara, K.; Arachchi, V. L.; Zhu, F.; Corke, H.; Gan, R. Phenolic profiles, antioxidant activities, and antiproliferative activities of different mung bean (*Vigna radiata*) varieties from Sri Lanka. *Food Bioscience journal* **2020**, *37*, 100705. [[Crossref](#)]
38. Moreno-García, L. K.; Antunes-Ricardo, M.; Martínez-Ávila, M.; Milán-Carrillo J.; Guajardo-Flores, D. Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and antihyperglycemic activities of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by-product extracts obtained by supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids* **2022**, *183*, 105560. [[Crossref](#)]
39. Singh, B.; Singh, P. J.; Kaur, A.; Singh, N. Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. *Food Research International* **2017**, *101*, 1. [[Crossref](#)]
40. Gutiérrez-Urbe, J. A.; Romo-Lopez, I.; Serna-Saldívar, O. S. Phenolic composition and mammary cancer cell inhibition of extracts of whole cowpeas (*Vigna unguiculata*) and its anatomical parts. *Journal of Functional Foods* **2011**, *3*, 290. [[Crossref](#)]
41. Teka, A. T.; Retta, N.; Bultosa, G.; Udenigwe, C.; Shumoy, H.; Raes, K. Phytochemical profiles and antioxidant capacity of improved cowpea varieties and landraces grown in Ethiopia. *Food Bioscience* **2020**, *37*, 100732. [[Crossref](#)]