



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR
DE BIOATIVOS FENÓLICOS EM FARINHAS INTEGRAIS E SUAS
POTENCIAIS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA**

DOUTORANDA:

Bárbara Elizabeth Alves de Magalhães

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos

Salvador/BA

Janeiro - 2022

Bárbara Elizabeth Alves de Magalhães

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR
DE BIOATIVOS FENÓLICOS EM FARINHAS INTEGRAIS E SUAS
POTENCIAIS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia para obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos.

Salvador/BA

Janeiro - 2022



TERMO DE APROVAÇÃO

BÁRBARA ELIZABETH ALVES DE MAGALHÃES

“ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE BIOATIVOS FENÓLICOS EM FARINHAS INTEGRAIS E SUAS POTENCIAIS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor(a) em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos

Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Sergio Luis Costa Ferreira

Doutorado em Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC - Rio)
Universidade Federal da Bahia

Prof^a. Dr^a. Leticia Malta Costa

Doutorado em Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Aníbal de Freitas Santos Júnior

Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra

Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Salvador, 27 de janeiro de 2022.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de
Ciências e Tecnologias Prof. Omar Catunda, SIBI - UFBA.

M189 Magalhães, Bárbara Elizabeth Alves de

Estratégias analíticas para determinação do teor de bioativos
fenólicos em farinhas integrais e suas potenciais atividades
antioxidante e antibacteriana / Bárbara Elizabeth Alves de
Magalhães. – Salvador, 2022.

188 f.

Orientador: Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Química, 2022.

1. Química Analítica. 2. Alimentos - Análise. 3. Compostos
bioativos. I. Santos, Walter Nei Lopes dos. II. Universidade
Federal da Bahia. III. Título.

CDU 543

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por tudo em minha vida e por mais esta etapa vencida.

À Universidade Federal da Bahia (UFBA) e ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ), pela oportunidade de crescimento acadêmico, profissional e pessoal proporcionada pelo curso.

À Universidade do Estado da Bahia (UNEB) e ao Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada (PGQA), pela disponibilização de espaço e recursos para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Walter Santos, pela orientação, apoio e paciência.

Ao Prof. Dr. Jackson Almeida e à Mayara Amariz da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), pela parceria para a prospecção fitoquímica.

À Prof. Dra. Lourdes Cardoso, Rebeca Lopes e Júlia Tanajura da UNEB, pela colaboração no estudo de atividade antimicrobiana.

Ao Prof. Dr. Aníbal de Freitas da UNEB e à Thais Luz da UFBA, pela cooperação para o estudo de bioacessibilidade.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento em Química Analítica, pelos muitos conhecimentos compartilhados.

Aos membros da banca avaliadora, por aceitarem o convite e pelas valiosas contribuições ao trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos meus familiares pelo incentivo. Em especial agradeço aos meus pais Cleone e Francisco, padrasto Jasiel, avó Maria Elizabeth e irmãos Francisco e Pablo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1. Antioxidantes.....	19
2.1.1. Classificação e mecanismos de ação.....	21
2.1.2. Antioxidantes Naturais x Sintéticos.....	22
2.1.3. Medida da atividade antioxidante.....	24
2.2. Compostos fenólicos.....	28
2.2.1. Classificação e estrutura.....	29
2.2.2. Extração.....	32
2.2.3. Separação, identificação e quantificação.....	37
2.2.4. Bioacessibilidade e biodisponibilidade.....	40
2.2.5. Propriedades biológicas e efeitos na saúde.....	43
2.3. Alimentos ricos em antioxidantes fenólicos.....	46
2.3.1. Panorama da pesquisa científica.....	46
2.3.2. Distribuição nos alimentos.....	48
2.3.2.1. Farinhas integrais.....	52
3. OBJETIVOS.....	56
3.1. Objetivo Geral.....	56
3.2. Objetivos Específicos.....	56
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
4.1. Reagentes e soluções.....	57
4.2. Amostras.....	58
4.3. Extração de compostos fenólicos.....	59
4.3.1. Otimização do processo de extração de fenólicos.....	59
4.3.2. Validação do método de extração.....	61
4.3.3. Aplicação do método de extração.....	62
4.4. Prospecção fitoquímica qualitativa.....	62
4.5. Determinações espectrofotométricas.....	65
4.5.1. Teor total de compostos fenólicos.....	65
4.5.2. Teor total de flavonoides.....	65
4.5.3. Teor total de taninos.....	66
4.5.4. Atividade antioxidante.....	66
4.6. Separação/quantificação de compostos bioativos por CLAE-DAD.....	67
4.6.1. Aplicação de método CLAE-DAD de referência.....	68
4.6.2. Otimização de método cromatográfico CLAE-DAD.....	68

4.6.3. Validação do método CLAE-DAD.....	70
4.6.4. Aplicação do método CLAE-DAD otimizado.....	71
4.7. Análises multivariadas.....	72
4.7.1. Análise do perfil fenólico de farinhas de linhaça e gergelim.....	72
4.7.2. Avaliação da autenticidade de farinhas de sementes de chia.....	73
4.8. Avaliação da bioacessibilidade de bioativos fenólicos e antioxidantes de farinha integral de quinoa branca.....	73
4.9. Atividade antibacteriana.....	75
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
5.1. Extração de compostos fenólicos.....	76
5.1.1. Otimização do processo de extração de fenólicos.....	76
5.1.2. Validação do método de extração.....	78
5.2. Prospecção fitoquímica qualitativa.....	79
5.3. Determinações espectrofotométricas de teores de compostos fenólicos e capacidade antioxidante.....	84
5.3.1. Farinha de linhaça (<i>Linum usitatissimum</i> L.).....	85
5.3.2. Farinha de gergelim (<i>Sesamum indicum</i> L.).....	86
5.3.3. Farinha de Amarantho (<i>Amaranthus</i> spp.).....	88
5.3.4. Farinha de Quinoa (<i>Chenopodium quinoa</i> W.).....	89
5.3.5. Farinha de Chia (<i>Salvia hispanica</i> L.).....	91
5.3.5.1. Farinha de chia adulterada.....	95
5.4. Otimização do método cromatográfico CLAE-DAD.....	98
5.5. Validação do método CLAE-DAD.....	116
5.5.1. Cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence LC-20AD.....	116
5.5.2. Cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence-i LC-2030C 3D Plus.....	120
5.6. Separação, identificação e quantificação de compostos bioativos por CLAE-DAD.....	128
5.6.1. Aplicação do método CLAE-DAD otimizado.....	128
5.6.1.1. Farinha integral de quinoa (<i>Chenopodium quinoa</i> W.).....	130
5.6.1.2. Farinha integral de chia (<i>Salvia hispanica</i> L.).....	133
5.6.1.3. Farinha de chia adulterada.....	136
5.6.2. Aplicação de método CLAE-DAD de referência.....	139
5.7. Análises multivariadas.....	142
5.7.1. Análise do perfil fenólico de farinhas de linhaça e gergelim.....	142
5.7.2. Avaliação da autenticidade de farinhas de sementes de chia.....	150
5.8. Avaliação da bioacessibilidade de bioativos antioxidantes de farinha integral de quinoa branca.....	155
5.9. Atividade antibacteriana.....	160
6. CONCLUSÕES.....	162
REFERÊNCIAS.....	166

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Linha do tempo com os principais marcos da pesquisa sobre antioxidantes em alimentos.....	20
Figura 2: Estruturas químicas de antioxidantes sintéticos.....	23
Figura 3: Subgrupos de flavonoides e ácidos fenólicos.....	30
Figura 4: Estruturas químicas das classes de flavonoides.....	31
Figura 5: Estruturas químicas das classes de ácidos fenólicos.....	32
Figura 6: Número de registros nas últimas duas décadas sobre o tópico antioxidantes fenólicos em alimentos.....	47
Figura 7: Os dez países com maior número de registros nas últimas duas décadas sobre o tópico antioxidantes fenólicos em alimentos.....	47
Figura 8: Áreas de pesquisa dos registros sobre o tópico antioxidantes fenólicos em alimentos nas últimas duas décadas.....	48
Figura 9: Semente (A) e farinha (B) de linhaça marrom e semente (C) e farinha (D) de linhaça dourada (<i>Linum usitatissimum</i> L.).....	52
Figura 10: Semente (A) e farinha (B) de gergelim preto e semente (C) e farinha (D) de gergelim branco (<i>Sesamum indicum</i> L.).....	53
Figura 11: Sementes (A) e farinha (B) de chia (<i>Salvia hispanica</i> L.).....	54
Figura 12: Grãos (A), flocos (B) e farinha (C) de quinoa (<i>Chenopodium quinoa</i> W.) branca.....	54
Figura 13: Grãos (A), flocos (B) e farinha (C) de amaranto (<i>Amaranthus</i> spp.) branco.....	55
Figura 14: Superfície de resposta do planejamento de misturas simplex-centroide.....	76
Figura 15: Eficiência de extração (%) variando a proporção de metanol e acetona.....	76
Figura 16: Gráfico de Pareto para a avaliação da significância das variáveis do método de extração.....	77
Figura 17: Superfícies de resposta do planejamento Box Behnken.....	78
Figura 18: Gráfico de Pareto da avaliação da robustez do método de extração.....	79
Figura 19: Cromatograma de mistura de padrões resultante do primeiro gradiente de eluição aplicado.....	99
Figura 20: Cromatograma de mistura de padrões resultante do gradiente de eluição ótimo.....	101
Figura 21: Comparação dos cromatogramas empregando metanol (preto) e etanol (rosa) na fase móvel.....	103
Figura 22: Comparação de cromatogramas resultantes de diferentes vazões.....	105

Figura 23: Comparação de cromatogramas resultantes de diferentes temperaturas.....	107
Figura 24: Cromatograma de mistura de padrões empregando as condições cromatográficas ótimas (cromatógrafo Prominence LC-20AD).....	108
Figura 25: Cromatograma de mistura de 18 padrões empregando as condições cromatográficas ótimas (cromatógrafo Prominence LC-20AD).....	110
Figura 26: Cromatograma de mistura de 18 padrões empregando as condições cromatográficas ótimas (cromatógrafo Prominence-i LC-2030C).....	113
Figura 27: Cromatograma de mistura de 17 padrões injetada após ajuste das condições cromatográficas (cromatógrafo Prominence-i LC-2030C).....	114
Figura 28: Gráfico de Pareto da avaliação da robustez do método de separação (cromatógrafo Prominence LC-20AD).....	120
Figura 29: Gráfico de Pareto da avaliação da robustez do método de separação (cromatógrafo Prominence-i LC-2030C).....	123
Figura 30: Estruturas químicas dos analitos do método CLAE-DAD otimizado.....	124
Figura 31: Cromatogramas de amostras de farinha integral de grãos de quinoa branca.....	131
Figura 32: Cromatogramas de amostras de farinha integral de sementes de chia.....	136
Figura 33: Cromatogramas de amostras adulteradas de farinha de chia e seus adulterantes.....	138
Figura 34: Projeção das amostras de farinha de linhaça e gergelim no plano CP1 x CP2.....	143
Figura 35: Projeção das variáveis no plano CP1 x CP2 para as farinhas de gergelim e linhaça.....	143
Figura 36: Dendrograma para as amostras de farinha de gergelim e linhaça.....	145
Figura 37: Demarcação dos grupos de farinha de gergelim e linhaça no mapa auto-organizável de Kohonen.....	146
Figura 38: Mapas de calor para as variáveis estudadas.....	146
Figura 39: Estrutura da rede Perceptron multicamadas.....	148
Figura 40: Pesos generalizados do modelo gerado com a rede Perceptron.....	149
Figura 41: Gráfico de escores (CP1 x CP2) para as farinhas de chia produzidas e comerciais.....	152
Figura 42: Gráfico de pesos (CP1 x CP2) para as farinhas de chia produzidas e comerciais.....	152
Figura 43: Projeção das amostras de farinha de chia autênticas e adulteradas no plano CP1 x CP2.....	154
Figura 44: Projeção das variáveis no plano CP1 x CP2 para as farinhas de chia autênticas e adulteradas.....	154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Princípios, vantagens e desvantagens de métodos de determinação da atividade antioxidante.....	27
Tabela 2: Antioxidantes fenólicos em alimentos.....	50
Tabela 3: Matriz do planejamento de misturas simplex-centroide com valores codificados e reais.....	59
Tabela 4: Matriz do planejamento fatorial completo de dois níveis (2^3) com valores codificados e reais.....	60
Tabela 5: Matriz do planejamento Box Behnken com valores codificados e reais.....	61
Tabela 6: Matriz do planejamento fatorial fracionário (2^{3-1}), com valores codificados e reais.....	62
Tabela 7: Sistemas de eluição e reveladores e padrões de referência para prospecção fitoquímica por CCD.....	64
Tabela 8: Matriz do planejamento fatorial (2^2) aplicado para a avaliação da robustez.....	71
Tabela 9: Resultado da prospecção fitoquímica qualitativa de extratos de farinhas integrais.....	80
Tabela 10: Resultados das determinações espectrofotométricas para farinhas de linhaça marrom e dourada.....	85
Tabela 11: Resultados das determinações espectrofotométricas para farinhas de gergelim preto e branco.....	87
Tabela 12: Resultados das determinações espectrofotométricas para farinhas de amaranto branco.....	88
Tabela 13: Resultados das determinações espectrofotométricas para farinhas de quinoa branca.....	90
Tabela 14: Resultados das determinações espectrofotométricas para farinhas de chia.....	92
Tabela 15: Resultados das determinações espectrofotométricas para farinha de chia adulterada e adulterantes.....	96
Tabela 16: Primeiro gradiente de eluição avaliado.....	100
Tabela 17: Gradiente de eluição ótimo.....	101
Tabela 18: Resoluções dos picos obtidos no estudo do gradiente de eluição... ..	102
Tabela 19: Resoluções dos picos obtidos no estudo da vazão (mL min^{-1}).....	104
Tabela 20: Gradiente de vazão ótimo.....	105
Tabela 21: Resoluções dos picos obtidos no estudo da temperatura.....	106

Tabela 22: Gradiente de eluição final (cromatógrafo Prominence LC-20AD).....	108
Tabela 23: Gradiente de vazão final (cromatógrafo Prominence LC-20AD).....	108
Tabela 24: Parâmetros de avaliação da eficiência da separação cromatográfica (cromatógrafo Prominence LC-20AD).....	111
Tabela 25: Gradiente de eluição final (cromatógrafo Prominence-i LC-2030C)...	114
Tabela 26: Gradiente de vazão final (cromatógrafo Prominence-i LC-2030C)....	114
Tabela 27: Parâmetros de avaliação da eficiência da separação cromatográfica (cromatógrafo Prominence LC-20AD).....	115
Tabela 28: Parâmetros das curvas analíticas (cromatógrafo Prominence LC-20AD).....	117
Tabela 29: Repetitividade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia) (cromatógrafo Prominence LC-20AD).....	118
Tabela 30: Parâmetros das curvas analíticas (cromatógrafo Prominence-i LC-2030C).....	121
Tabela 31: Repetitividade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia) (cromatógrafo Prominence-i LC-2030C).....	122
Tabela 32: Parâmetros das curvas com adição de padrão a extrato de quinoa	128
Tabela 33: Parâmetros das curvas com adição de padrão a extrato de chia.....	129
Tabela 34: Concentração dos compostos bioativos em amostras farinha de quinoa branca.....	131
Tabela 35: Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) de ácidos fenólicos em amostras de farinha integral de chia.....	134
Tabela 36: Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) de ácido trans-cinâmico e flavonoides em amostras de farinha integral de chia.....	135
Tabela 37: Concentração dos compostos bioativos em amostras adulteradas de farinha de chia e seus adulterantes.....	137
Tabela 38: Parâmetros das curvas analíticas para determinação de ácidos fenólicos e flavonoides em farinhas de linhaça e gergelim.....	139
Tabela 39: Concentração de ácidos fenólicos e flavonoides ($\mu\text{g g}^{-1}$) em farinhas de linhaça e de gergelim.....	140
Tabela 40: Percentual de classificação das amostras de validação de acordo com os grupos (F: farinha de linhaça; S: farinha de gergelim).....	141
Tabela 41: Resultados das determinações espectrofotométricas para frações da bioacessibilidade de farinha de quinoa.....	156
Tabela 42: Concentração (mg L^{-1}) dos compostos bioativos nas frações da bioacessibilidade de farinha de quinoa.....	159

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABTS - 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico)
- ANOVA - Análise de variância
- CCD - Cromatografia em Camada Delgada
- CIM - Concentração Inibitória Mínima
- CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CP - Componente Principal
- DAD - Detector com Arranjo de Diodos
- DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
- EAG - Equivalente de Ácido Gálico
- EAT - Equivalente de Ácido Tânico
- EQ - Equivalente de Quercetina
- FC - Reagente Folin-Ciocalteu
- FD - Reagente Folin-Denis
- HCA - *Hierarchical Cluster Analysis* (análise hierárquica por agrupamento)
- HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*
- LD - Limite de Detecção
- LQ - Limite de Quantificação
- MIC - Minimum Inhibitory Concentration
- n.d. - não detectado
- PC - Ponto Central
- PCA - *Principal Components Analysis* (análise dos componentes principais)
- TLC - *Thin Layer Chromatography*
- UV-Vis - Ultravioleta-Visível

RESUMO

Os alimentos de origem vegetal são potenciais fontes de compostos bioativos, como compostos fenólicos, que são antioxidantes naturais, e seu consumo pode prevenir o dano oxidativo que leva ao desenvolvimento de diversas doenças. Em vista do grande consumo de farinhas integrais e dos benefícios à saúde associados à ingestão, é relevante o estudo da composição e atividades biológicas desses alimentos. Nesse sentido, foram investigados a composição fitoquímica, o teor de bioativos fenólicos e o potencial antioxidante de farinhas integrais de linhaça (marrom e dourada), gergelim (preto e branco), chia (preta e branca), quinoa (branca) e amaranto (branco). Para tanto, o método de extração de compostos fenólicos foi otimizado através de planejamento experimental, empregando metanol e acetona (8:2, v v⁻¹) para a extração sólido-líquido. O perfil fitoquímico dos extratos foi analisado por CCD, a capacidade antioxidante *in vitro* e os teores totais de compostos fenólicos dos extratos foram determinados por métodos espectrofotométricos. Um método cromatográfico CLAE-DAD foi desenvolvido para a determinação de 18 compostos bioativos e ao perfil cromatográfico dos extratos foram aplicadas análises multivariadas para identificar os potenciais fitoquímicos biomarcadores das farinhas integrais. A bioacessibilidade dos compostos bioativos de farinha integral de quinoa branca foi avaliada após a simulação *in vitro* da digestão. A atividade antibacteriana das farinhas de chia e quinoa foi avaliada por microdiluição seriada e difusão em ágar. Os resultados indicaram que as farinhas analisadas possuem ampla variedade de metabólitos secundários (compostos fenólicos, antocianinas, lignanas, taninos, derivados antracênicos, antraquinonas, naftoquinonas, xantinas, cumarinas, saponinas, terpenos e esteroides) com diferentes propriedades biológicas e potenciais aplicabilidades. O perfil fenólico e a atividade antioxidante variaram significativamente entre as amostras analisadas, das quais as amostras de farinha de chia apresentaram maiores teores totais de compostos fenólicos (4,10–5,89 mgEAG g⁻¹) e flavonoides (2,78–5,45 mgEQ g⁻¹), elevada capacidade antioxidante (82–94% de inibição de DPPH•) e atividade bacteriostática contra *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* para CIM de 2000 µg mL⁻¹. O método cromatográfico desenvolvido é aplicável a diferentes matrizes que contenham os compostos bioativos: catequina, rutina, naringenina, quercetina, kaempferol, crisina, vanilina, teobromina e ácidos gálico, protocatecuico, clorogênico, cafeico, siríngico, p-cumárico, ferúlico, sinápico, elágico e transcinâmico. Foram determinadas maiores concentrações de ácido sinápico (7,15 a 28,63 µg g⁻¹) e rutina (13,04 a 52,83 µg g⁻¹) nas farinhas de quinoa, catequina (30,95 a 263,71 µg g⁻¹) e ácido trans-cinâmico (19,64 a 238,56 µg g⁻¹) nas farinhas de chia, ácidos clorogênico (1,96 a 8,82 µg g⁻¹) e p-cumárico (1,08 a 14,23 µg g⁻¹) nas farinha de linhaça, e ácidos clorogênico (2,97 a 56,34 µg g⁻¹) e protocatecuico (12,87 a 47,02 µg g⁻¹) nas farinhas de gergelim. Na avaliação da bioacessibilidade foi observado que a maior parte dos compostos fenólicos e antioxidantes da farinha de quinoa se tornou bioacessível principalmente durante e após a digestão gástrica. As análises multivariadas evidenciaram que o perfil fenólico depende da espécie e da variedade da planta, tendo sido possível identificar potenciais biomarcadores das farinhas integrais analisadas.

Palavras-chave: farinhas integrais; compostos fenólicos; antioxidantes; bioacessibilidade; atividade antibacteriana; CLAE; quimiometria.

ABSTRACT

Plant foods are potential sources of bioactive compounds, such as phenolic compounds, which are natural antioxidants, and their consumption may prevent oxidative damage that leads to the development of several diseases. In view of the large consumption of wholemeal flours and the health benefits associated with their intake, the study of the composition and biological activities of these foods is relevant. In this sense, the phytochemical composition, the content of phenolic bioactives and the antioxidant potential of flaxseed (brown and yellow), sesame (black and white), chia (black and white), quinoa (white) and amaranth (white) wholemeal flours. Therefore, the phenolic compounds extraction method was optimized through experimental designs, using methanol and acetone (8:2, v v⁻¹) for solid-liquid extraction. The phytochemical profile of the extracts was analyzed by TLC, the *in vitro* antioxidant capacity and the total phenolic compounds contents of the extracts were determined by spectrophotometric methods. An HPLC-DAD chromatographic method was developed for the determination of 18 bioactive compounds and multivariate analyzes were applied to the chromatographic profile of the extracts to identify the potential phytochemical biomarkers of wholemeal flours. The bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidants from whole white quinoa flour was evaluated after *in vitro* digestion simulation. The antibacterial activity of chia and quinoa flours was evaluated by serial microdilution and agar diffusion. The results indicated that the wholemeal flours analyzed have a wide variety of secondary metabolites (phenolic compounds, anthocyanins, lignans, tannins, anthracene derivatives, anthraquinones, naphthoquinones, xanthines, coumarins, saponins, terpenes and steroids) with different biological properties and potential applicabilities. The phenolic profile and the antioxidant activity varied significantly among the analyzed samples, of which the chia flour samples showed higher total contents of phenolic compounds (4.10–5.89 mgEAG g⁻¹ flour) and flavonoids (2.78–5.45 mgEQ g⁻¹ flour), high antioxidant capacity (82–94% of DPPH• inhibition) and bacteriostatic activity against *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* at MIC of 2000 µg mL⁻¹. The chromatographic method developed is applicable to different matrices that contain the bioactive compounds: catechin, rutin, naringenin, quercetin, kaempferol, chrysin, vanillin, theobromine and gallic, protocatechuic, chlorogenic, caffeic, syringic, p-coumaric, ferulic, synapic, ellagic and transcinnamic acids. Higher concentrations of sinapic acid (7.15 to 28.63 µg g⁻¹) and rutin (13.04 to 52.83 µg g⁻¹) in quinoa flours, catechin (30.95 to 263.71 µg g⁻¹) and trans-cinnamic acid (19.64 to 238.56 µg g⁻¹) in chia flours, chlorogenic acids (1.96 to 8.82 µg g⁻¹) and p-coumaric (1.08 to 14.23 µg g⁻¹) in flaxseed flour, and chlorogenic acid (2.97 to 56.34 µg g⁻¹) and protocatechuic acid (12.87 to 47.02 µg g⁻¹) in sesame flour were determined. In the evaluation of bioaccessibility, it was observed that most of the phenolic compounds and antioxidants in quinoa flour become bioaccessible mainly during and after gastric digestion. Multivariate analyzes showed that the phenolic profile depends on the species and variety of the plant, making it possible to identify potential biomarkers of the analyzed wholemeal flours.

Keywords: wholemeal flours; phenolic compounds; antioxidants; bioaccessibility; antibacterial activity; HPLC; chemometrics.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os alimentos funcionais têm recebido muita atenção, principalmente porque, além de nutrientes, fornecem compostos bioativos com potenciais benefícios à saúde (Pellegrini et al., 2017). Entre estes alimentos, destacam-se àqueles com teores ampliados de compostos fenólicos, especialmente flavonoides e ácidos fenólicos, aos quais são atribuídas diversas propriedades funcionais, como a ação antioxidante.

O consumo de alimentos com teores elevados de compostos fenólicos pode evitar o dano oxidativo que leva ao envelhecimento e doenças relacionadas em razão da eliminação de radicais livres do metabolismo celular (Haminiuk et al., 2012). Essa associação tem impulsionado o interesse em alimentos ricos em antioxidantes fenólicos, tanto na investigação dos compostos bioativos naturalmente presentes nos alimentos, quanto na elaboração de alimentos funcionalizados com bioativos fenólicos.

Os alimentos de origem vegetal são potenciais fontes de antioxidantes e antimicrobianos naturais, uma vez que as plantas são fontes de metabólitos secundários, a exemplo dos compostos fenólicos, que ocorrem em todas as suas partes, como sementes, raízes, cascas, folhas e frutos (Shahidi e Ambigaipalan, 2015). Por outro lado, os alimentos podem ser funcionalizados aplicando-se processos biotecnológicos para remover, modificar ou adicionar constituintes (Das, Raychaudhuri e Chakraborty, 2012), como bioativos fenólicos que, além de aumentar o tempo de conservação dos alimentos, podem promover benefícios para a saúde (Caleja et al., 2015).

Neste cenário, a Química Analítica tem assumido um papel de extrema importância para a ampliação do conhecimento da composição bioativa de alimentos. Estratégias analíticas têm sido desenvolvidas para a determinação de antioxidantes fenólicos em alimentos, relacionadas à extração, separação, identificação e quantificação destes compostos bioativos (Pyrzynska e Sentkowska, 2015; Barba et al., 2016; Sardarodiyani e Sani, 2016; Alu'datt et al., 2017; Cong-Cong et al., 2017; Kafkas et al., 2018).

Os compostos fenólicos apresentam ampla variedade de estruturas e propriedades que são associados aos seus potenciais efeitos benéficos à saúde.

Entre as propriedades biológicas dos compostos fenólicos, destaca-se a atividade antioxidante e antimicrobiana. Ressalta-se que a identificação de compostos bioativos e o conhecimento de suas propriedades biológicas, por si só, não permite prever o real efeito na saúde humana. Por isso, faz-se necessária a avaliação da bioacessibilidade e biodisponibilidade dos compostos (Pellegrini et al., 2017). Quanto à bioacessibilidade, refere-se à fração do composto que é liberada da matriz alimentar durante e após a digestão e se torna disponível para a absorção (Palafox-Carlos et al., 2011).

O reconhecimento dos potenciais benefícios à saúde atribuídos aos compostos fenólicos tem motivado a pesquisa de suas propriedades e incentiva a investigação da composição dos alimentos em busca de fontes de antioxidantes fenólicos. A composição fitoquímica, tal qual o perfil fenólico e a capacidade antioxidante dos alimentos dependem de vários fatores, principalmente da espécie da planta, de fatores bióticos e abióticos e de condições ambientais, pois influenciam diretamente na composição do alimento (Calegari et al., 2017; Ribeiro et al., 2020). Diante disto, destaca-se a relevância da investigação do perfil fenólico e da capacidade antioxidante dos alimentos.

A investigação de antioxidantes fenólicos em alimentos também ganha destaque em meio à preocupação com a toxicidade dos antioxidantes sintéticos para fins alimentícios. É crescente o interesse em identificar antioxidantes naturais para incorporação aos alimentos em substituição dos sintéticos em razão da preocupação com os efeitos deletérios para a saúde humana atribuídos aos aditivos sintéticos, cujo consumo a longo prazo está associado a produção de substâncias tóxicas para saúde (André et al., 2010) e a indesejáveis efeitos gastrointestinais, dermatológicos, respiratórios, neurológicos e carcinogênicos (Benabdallah et al., 2016).

Outro contexto importante para a investigação de compostos fenólicos em alimentos surge em meio ao alarmante desenvolvimento de resistência microbiana a medicamentos, que tem impulsionado pesquisas de novas substâncias antimicrobianas naturais. Os compostos fenólicos possuem propriedades que os permitem atuar como agentes antimicrobianos eficientes para prevenção e no tratamento de vários distúrbios de saúde e doenças

causadas por diferentes microrganismos (Mekinić et al., 2019; Dikpinar e Süzgeç-Selçuk, 2020).

Em meio aos alimentos funcionais, cresce o interesse por sementes oleaginosas e grãos de cereais e pseudocereais, devido ao valor nutricional, presença de compostos bioativos e propriedades funcionais relacionadas. Sementes e grãos são reconhecidos como excelentes fontes de compostos bioativos e antioxidantes naturais (Shahidi e Ambigaipalan, 2015). As sementes oleaginosas podem ser consumidas *in natura* na dieta bem como seus subprodutos, como óleo e farinha. Os grãos de cereais e pseudocereais têm sido tradicionalmente consumidos na forma integral, em flocos e como farinha.

As farinhas integrais de sementes e grãos têm sido amplamente utilizadas no desenvolvimento de alimentos funcionais (Costantini et al., 2014; Coelho e Salas-Mellado, 2015; Iglesias-Puig, Monedero e Haros, 2015; Sohaimy et al., 2018). Em vista do aumento do consumo de farinhas integrais e seus produtos e dos benefícios à saúde associados à ingestão desses alimentos, é importante investigar a presença de compostos bioativos nas farinhas integrais para relacioná-los aos efeitos benéficos relatados.

Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo investigar o perfil fitoquímico, avaliar as potenciais atividades antioxidante e antibacteriana, determinar os teores de compostos fenólicos e avaliar a bioacessibilidade de compostos fenólicos e antioxidantes de farinhas integrais. Neste trabalho é relatada a análise de farinhas integrais de linhaça (*Linum usitatissimum* L.), gergelim (*Sesamum indicum* L.), amaranto (*Amaranthus* spp.), quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) e chia (*Salvia hispanica* L.).

A investigação dos compostos bioativos das farinhas integrais torna-se relevante ao elucidar a composição fitoquímica destes alimentos, ricos em metabólitos secundários diversos, com ampla variedade propriedades funcionais. Tendo em vista que as farinhas têm sido alvo de adulteração em todo o mundo (Rodríguez, Rolandelli e Buera, 2019; Pastor et al., 2016; Verdú et al., 2016), o estudo proposto também demonstra relevância ao fornecer subsídios para a investigação de autenticidade ao passo que esclarece o perfil fenólico das farinhas integrais de sementes e grãos.

Ademais, o desenvolvimento de estratégias analíticas para a determinação de compostos bioativos em alimentos vegetais é significativo ao passo que possibilita revelar potenciais fontes naturais de fitoquímicos para diversas aplicabilidades, como tecnológicas em diferentes áreas (farmacêutica, alimentícia, médica, bioquímica), de ingredientes bioativos para o desenvolvimento de novos produtos cosméticos e alimentos funcionais e de princípios ativos para fármacos, por exemplo.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

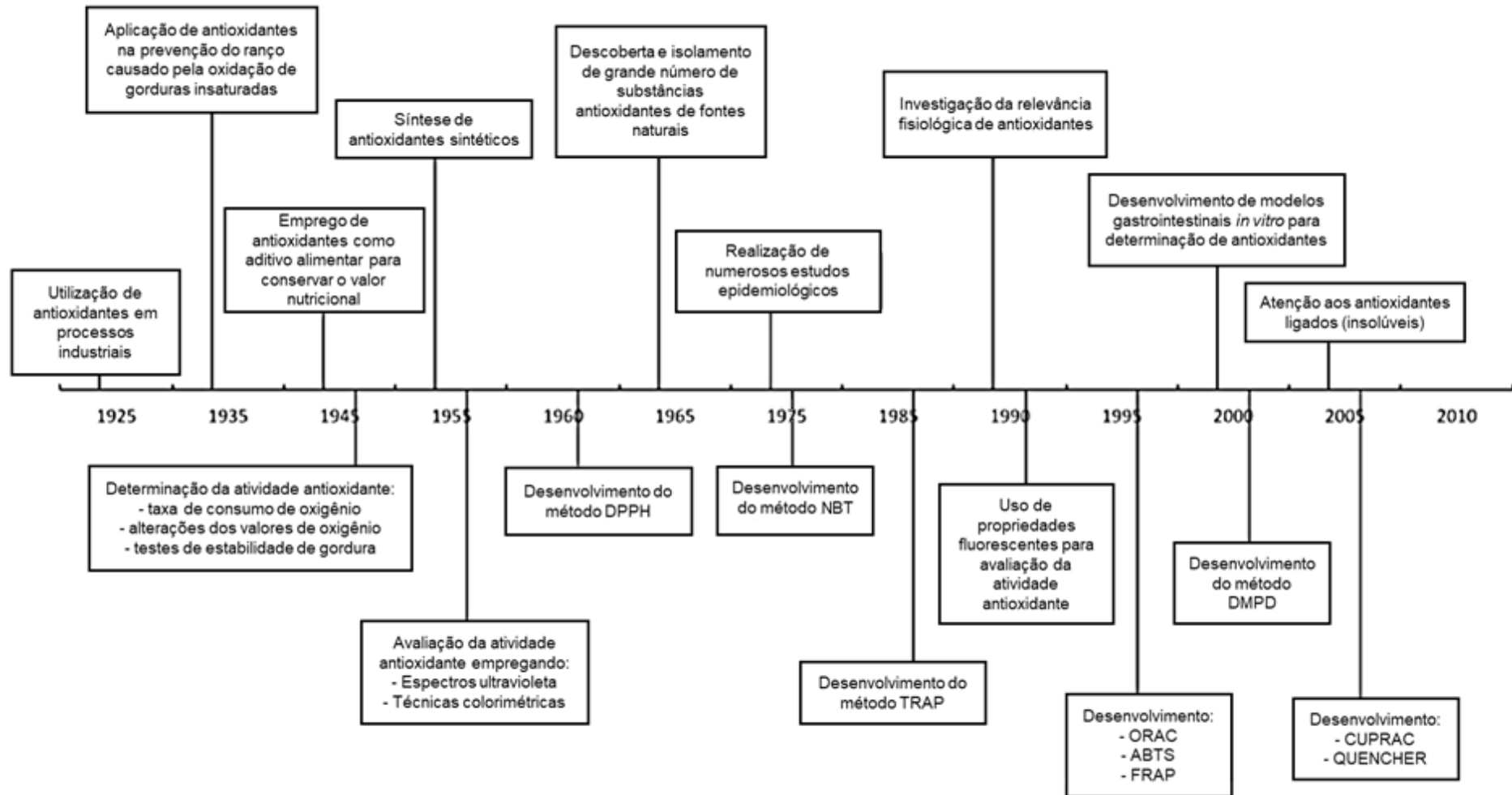
2.1. Antioxidantes

De modo geral, são denominados antioxidantes as substâncias, cujas concentrações são baixas em comparação ao substrato oxidável, capazes de inibir ou retardar significativamente a oxidação do substrato. São formados radicais menos reativos a partir de antioxidantes, de modo que a reação em cadeia não se propaga e os radicais formados são estabilizados através da reação com outro radical ou reciclados pela ação de outro antioxidante, sendo formados produtos estáveis (Sousa et al., 2007).

No final do século XIX, os antioxidantes eram geralmente usados em processos industriais (Cömert e Gökmen, 2018). A partir do período da Primeira Guerra Mundial, os pesquisadores Moureu e Dufraise testaram a atividade antioxidante de mais de 500 compostos. Essa pesquisa desencadeou a busca por aditivos químicos para prevenir a oxidação de alimentos, proporcionando o começo do atual conhecimento das propriedades de vários antioxidantes (Magalhães, Oliveira e Freitas, 2018). A Figura 1 apresenta uma linha do tempo com os principais marcos da pesquisa sobre antioxidantes.

Ao longo dos anos, um grande número de substâncias antioxidantes foi descoberto e isolado de fontes naturais e empregado para conservar alimentos. Pesquisadores identificaram alguns antioxidantes no sangue e na urina, indicando sua importância nos processos bioquímicos. Mais tarde, notou-se que os antioxidantes inibiam os processos de oxidação no organismo e evitavam doenças relacionadas ao estresse oxidativo (Cömert e Gökmen, 2018).

Figura 1: Linha do tempo com os principais marcos da pesquisa sobre antioxidantes em alimentos.



Fonte: adaptado de Cömert e Gökmen, 2018.

* DPPH, TRAP, ORAC, ABTS, FRAP, CUPRAC e QUENCHER designam métodos de determinação de atividade antioxidante.

2.1.1. Classificação e mecanismos de ação

Antioxidantes são compostos ou sistemas que podem interagir com radicais e terminar a reação antes que moléculas vitais sejam danificadas. Os antioxidantes podem atuar em diferentes etapas do processo oxidativo nos alimentos e nas membranas celulares (Sardarodiyani e Sani, 2016). Nos sistemas biológicos, os antioxidantes protegem contra a oxidação, prevenindo doenças associadas ao estresse oxidativo (André et al., 2010).

O processo de oxidação envolve reações em cadeia de radicais oxidativos, que inclui etapas sucessivas de iniciação (produção de radicais livres), propagação e finalização (produção de produtos não radicais) da cadeia. Nas células, a oxidação lipídica nas membranas celulares e a formação de radicais livres pode ser promovida por fatores físicos e químicos endógenos (sistemas de enzimas e cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias) e exógenos (luz UV, radiação ionizante, poluição do ar, fumo, etc.) (Sardarodiyani e Sani, 2016).

Com base nos mecanismos de ação, existem diferentes classificações para os antioxidantes. De maneira mais ampla, os antioxidantes podem ser classificados como primários ou secundários. Os primários atuam como sequestradores de radicais ativos ou doadores de hidrogênio, de modo que atrasam ou inibem a etapa de iniciação ou interrompem a etapa de propagação da reação em cadeia. Os antioxidantes secundários são decompositores de peróxido (André et al., 2010).

De acordo com Pokorny (2007), os antioxidantes são classificados como:

- Preventivos: inibidores de reações de oxidação de radicais livres, obstando a formação dos radicais.
- De quebra de cadeia: interrompem a propagação da reação de auto-oxidação em cadeia.
- Sinergistas: não são eficientes como antioxidantes quando aplicados isoladamente, mas que aumentam a atividade de antioxidantes de quebra de cadeia em uma mistura.
- Agentes redutores: convertem hidroperóxidos em componentes estáveis de maneira não radical.

- Quelantes metálicos: convertem os pró-oxidantes metálicos (especialmente derivados de ferro ou cobre) em produtos estáveis.
- Inibidores de oxigênio singlete.
- Inibidores de enzimas pró-oxidativas.

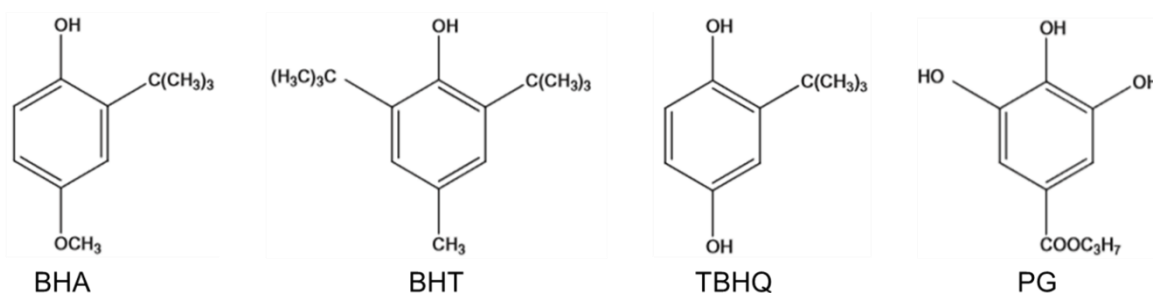
Os antioxidantes também são classificados de acordo com suas estruturas, sendo agrupados como vitaminas (tocoferóis), carotenoides (taninos condensados, xantofilas e carotenos), flavonoides, ácidos fenólicos, lignanas, taninos, estilbenos, antioxidantes contendo enxofre e compostos neoformados (melanoidinas) (Cömert e Gökmen, 2018).

Quanto à origem, os antioxidantes são classificados em três grupos. Antioxidantes naturais são sintetizados por vários microorganismos, como fungos, animais e, mais frequentemente, por plantas. Antioxidantes sintéticos são sintetizados ou biossintetizados em laboratório. Combinando as vantagens dos antioxidantes sintéticos e naturais, alguns antioxidantes são sintetizados em laboratório com estrutura idêntica aos encontrados na natureza, como nos alimentos (Pokorny, 2007).

2.1.2. Antioxidantes Naturais × Sintéticos

Ao longo dos anos foram propostas centenas de compostos para inibir a deterioração oxidativa das substâncias oxidáveis e prolongar o tempo de conservação dos alimentos, no entanto, apenas alguns desses compostos podem ser usados em produtos destinados ao consumo humano. Diante dos potenciais riscos dos aditivos sintéticos para a saúde humana, é crescente o interesse em identificar antioxidantes naturais para a substituição dos sintéticos (André et al., 2010; Benabdallah et al., 2016).

Os antioxidantes sintéticos atualmente permitidos para fins alimentícios são: hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ), octil galato (OG), dodecil galato (DG) e propil galato (PG). Estes antioxidantes são ácidos fenólicos, como apresentado na Figura 2.

Figura 2: Estruturas químicas de antioxidantes sintéticos.

Fonte: adaptado de Shahidi e Ambigaipalan, 2015.

O uso de antioxidantes sintéticos, como os citados, deve seguir as recomendações das autoridades legais, que regulamentam para um número limitado de alimentos os limites máximos para cada aditivo sintético ou associação de aditivos com base na toxicidade dessas substâncias. Vários estudos epidemiológicos e clínicos com compostos antioxidantes têm sido desenvolvidos (Cömert e Gökmen, 2018). Estudos demonstram que o uso excessivo de antioxidantes sintéticos adicionados a alimentos pode produzir substâncias tóxicas para saúde (André et al., 2010).

A ingestão de alguns conservantes sintéticos foi relacionada a efeitos deletérios, tendo sido relatados efeitos colaterais gastrointestinais, dermatológicos, respiratórios, neurológicos e carcinogênicos (Benabdallah et al., 2016). Além da preocupação com a toxicidade, o custo mais alto de antioxidantes sintéticos e a preferência do consumidor pelo natural têm impulsionado a busca por fontes naturais de compostos antioxidantes (Cömert e Gökmen, 2017).

As substâncias antioxidantes naturais podem substituir os sintéticos a fim de prolongar o tempo de conservação dos alimentos, além de proporcionar benefícios à saúde, prevenindo várias doenças relacionadas ao estresse oxidativo (Caleja et al., 2015). Mais que atuar como agentes de preservação, alguns antioxidantes naturais também podem ser usados para conferir características sensoriais favoráveis aos alimentos, como sabor, odor, cor e textura (Pokorny, 2007).

É difícil comparar as eficiências dos antioxidantes naturais e sintéticos, mas geralmente ambos agem por mecanismos semelhantes e suas atividades antioxidantes dependem especialmente de sua estrutura química, potencial redox

e polaridade (Atta, Mohamed e Abdelgawad, 2017). A maioria dos antioxidantes naturais são compostos fenólicos orto-substituídos e geralmente são muito mais polares que os antioxidantes sintéticos, que são principalmente para-substituídos (Eskin e Przybylski, 2000).

Em geral, os antioxidantes naturais devem ser adicionados aos alimentos em quantidades maiores que os sintéticos, principalmente porque não são substâncias puras, de modo que a fração ativa é muito menor que a quantidade adicionada, e por normalmente serem menos ativos (Atta, Mohamed e Abdelgawad, 2017). Entretanto, a real atividade dos antioxidantes depende muito de condições particulares e da composição dos alimentos (Pokorny, 2007).

Os antioxidantes para fins alimentícios devem apresentar algumas características, especialmente: baixo custo; atoxicidade; eficiência em baixas concentrações; alta estabilidade e capacidade de resistir ao processamento; ausência de odor, sabor ou cor; e facilidade de incorporação ao produto (Ramalho e Jorge, 2006; Kiokias, Varzakas e Oreopoulou, 2008).

A adição de antioxidantes a alimentos ainda é insignificante em comparação com o fornecimento de antioxidantes ativos naturalmente presentes nos alimentos. Os antioxidantes frequentemente ocorrem nos alimentos como uma mistura estável de duas ou mais substâncias antioxidantes, criando uma rede complexa. Os antioxidantes dietéticos desempenham papéis importantes nos alimentos e no corpo humano, combatendo os processos de oxidação e prevenindo as doenças crônicas relacionadas ao estresse oxidativo (Cömert e Gökmen, 2018).

2.1.3. Medida da atividade antioxidante

Conforme ilustrado na Figura 1, diversos métodos analíticos foram desenvolvidos ao longo dos anos para a determinação da atividade antioxidante. Muitos métodos baseados na determinação de produtos primários e secundários de oxidação já foram utilizados na avaliação da atividade antioxidante total, como espectrofotométricos, eletroquímicos e cromatográficos (Alu'datt et al., 2017).

Segundo Cömert e Gökmen (2018), inicialmente as determinações da capacidade antioxidante embasavam-se em medidas de taxa de consumo de

oxigênio, alteração dos valores de peróxido ou testes de estabilidade dos valores de peróxido no sistema contendo gordura. A oxidação lipídica é convencionalmente estudada avaliando compostos voláteis ou por determinação do valor de peróxido ou anisidina, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e dienos conjugados (Shahidi e Ambigaipalan, 2015).

O primeiro método colorimétrico desenvolvido utilizou o radical livre estável e não biológico 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). Este método é fundamentado na capacidade de eliminação dos radicais por um antioxidante, que reduz o DPPH• a DPPH₂. A diminuição da absorvância, monitorada espectrofotometricamente, é causada pela mudança de cor da solução, de roxo para amarelo (Mishra, Ojha e Chaudhury, 2012).

Outro método espectrofotométrico desenvolvido foi a Capacidade Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC, do inglês *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*). Trolox é um análogo da vitamina E, solúvel em água, usado como um antioxidante de referência. Esse método se baseia na redução da absorvância de um cátion radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico) (ABTS•⁺) estável, gerado na presença de um oxidante (como persulfato de potássio). Posteriormente, esse método foi modificado, substituindo o ABTS pelo radical hidrofílico N,N-dimetil-p-fenilenodiamina (DMPD•), cujo cátion é gerado na presença de um oxidante (como cloreto férrico) em condição ácida. Em ambos os casos, a descoloração do cátion radical se deve à transferência do átomo de hidrogênio de um antioxidante para o radical (Fogliano et al., 1999).

O método de Potencial Antioxidante Reativo Total (TRAP, do inglês *Total Reactive Antioxidant Potential*) se baseia na medição do oxigênio consumido durante a reação oxidativa do material analisado por radicais peroxila gerados por um azo-iniciador solúvel em água, como o dicloridrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (Sánchez-Moreno, 2002).

No método *Nitroblue Tetrazolium* (NBT) é avaliada a capacidade de antioxidantes em condições fisiológicas para remover radicais superóxido (O₂^{•-}). Neste método, os radicais superóxido, gerados *in vitro* por sistemas de reação enzimática (hipoxifina/xantina oxidase), reduzem o reagente NBT (de cor amarela) para formazan (de cor roxa) (Becker et al., 2019).

No método conhecido como Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (ORAC, do inglês *Oxygen Radical Absorbing Capacity*) é monitorado o decaimento de fluorescência de fluoresceína na presença de antioxidantes e um agente oxidante. Este método mede a capacidade contra radicais peroxila e hidroxila (Davalos, Gomez-Cordoves e Bartolome, 2004) e indica o potencial dos antioxidantes para proteger as proteínas dos danos causados pelos radicais livres (Haminiuk et al., 2012).

O método chamado Poder Antioxidante Redutor de Ferro (FRAP, do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*) é baseado em uma reação de transferência de elétrons, pela qual Fe(III) é reduzido a Fe(II) pelos antioxidantes, provocando uma mudança de cor da solução, de azul claro para escuro (Rufino et al., 2006). Baseado no mesmo princípio, foi desenvolvido o método chamado Capacidade Antioxidante Redutora de Cobre (CUPRAC, do inglês *Copper Reducing Antioxidant Capacity*), que supera desvantagens do ensaio FRAP devido à química redox e ao rápido potencial cinético do íon cobre (Cömert e Gökmen, 2018).

Os métodos descritos são classificados como métodos de transferência de átomos de hidrogênio ou métodos de transferência de elétron. Os métodos de transferência de hidrogênio incluem capacidade de inibição da peroxidação lipídica, ORAC e TRAP. Os métodos de transferência elétrons incluem FRAP, CUPRAC e NBT. Os métodos DPPH e ABTS envolvem ambos os mecanismos de transferência de elétrons e de hidrogênio (Badarinath et al., 2010; Becker et al., 2019).

Esses métodos possuem algumas limitações, como problemas de interferência (André et al., 2010) e, especialmente por se tratarem de métodos *in vitro*, por não levarem em consideração a bioacessibilidade dos antioxidantes (Chitindingu, Benhura e Muchuweti, 2015). A Tabela 1 resume princípios da medição, vantagens e desvantagens dos métodos TRAP, NBT, ORAC, FRAP, CUPRAC, DPPH, ABTS e DMPD.

Tabela 1: Princípios, vantagens e desvantagens de métodos de determinação da atividade antioxidante.

Método	Princípio da medição	Vantagens	Desvantagens
TRAP	Determina o consumo de oxigênio durante a inibição da oxidação plasmática por antioxidantes	O radical peroxil é a forma radical mais comum e que se assemelha à fisiológica	O oxigênio como sonda de detecção não é estável e cria problemas durante o monitoramento
NBT	Monitora espectrofotometricamente a diminuição da absorvância devido à descoloração do reagente NBT reduzido por radicais superóxido	- Método reprodutível, fácil e rápido - Método semelhante a processo fisiológico	- Rastreia apenas antioxidantes hidrofílicos - Aplicado apenas em condições fisiológicas (pH/salinidade)
ORAC	Monitora o decaimento de fluorescência de β -fitoeritrina ou fluoresceína cineticamente na presença de antioxidantes e um agente oxidante	- Leva em consideração a taxa de iniciação e a progressão da oxidação - Método semelhante a processo fisiológico	- Requer sistema automatizado - β -fitoeritrina pode interagir com compostos fenólicos e subestimar a capacidade antioxidante - Fluoresceína é sensível à concentração de oxigênio e temperatura
FRAP	Monitora espectrofotometricamente o aumento da absorvância devido à redução do complexo 2,4,6-tripiridil-estriazina férrico por antioxidantes	Representa bem o mecanismo de transferência de elétrons	- Lenta taxa de reação dos íons férricos - Ignora a cinética da reação
CUPRAC	Monitora espectrofotometricamente o aumento da absorvância devido à redução do reagente de cobre(II)-neocuproína por antioxidantes	- É mais específico para compostos antioxidantes - A taxa de reação dos íons cobre é mais rápida que os íons férricos	Ignora a cinética da reação
DPPH	Monitora espectrofotometricamente a diminuição da absorvância devido à descoloração do radical reduzido por antioxidantes	- Método fácil e reprodutível - Maior capacidade de rastrear antioxidantes lipofílicos	Radicais não-fisiológicos
ABTS		- Método fácil e reprodutível - Capaz de rastrear antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos	
DMPD		Método fácil e reprodutível	

Fonte: adaptado de Cömert e Gökmen, 2018; Becker et al., 2019.

O mais recente método desenvolvido, chamado QUENCHER (do inglês *QU*ick, *E*asy, *N*ew, *CHE*ap, *R*epr*o*ducible) (Cömert e Gökmen, 2018), avalia a capacidade antioxidante total de frações insolúveis e solúveis obtidas após a simulação da digestão gastrointestinal. Esse método é visto como mais semelhantes a processos fisiológicos, uma vez que é eliminada a etapa de extração com solventes orgânicos e, utilizando os métodos clássicos (DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC, ORAC), é determinada a atividade antioxidante de compostos liberados e que se tornam bioacessíveis após o procedimento de digestão (fração solúvel) e a atividade antioxidante dos compostos não digeríveis restantes (fração insolúvel) (Delgado-Andrade et al., 2010).

Cada um dos métodos citados se baseia em um mecanismo e utiliza diferentes fontes de radicais ou oxidantes. Os antioxidantes mostram diferentes potenciais contra formas distintas de radicais e metais. Dessa forma, os resultados desses ensaios são de difícil comparação, sendo geralmente expressos em diferentes unidades, e um único método não é suficiente para determinar a capacidade antioxidante total, sendo recomendável mais de um método para avaliar a real capacidade antioxidante de uma amostra e elucidar o mecanismo da atividade antioxidante (Haminiuk et al., 2012).

A composição fenólica tem sido relacionada à capacidade antioxidante de plantas e alimentos. A presença de anéis fenólicos faz destes compostos excelentes antioxidantes, cujo potencial antioxidante depende principalmente do número e disposição dos grupos hidroxila nas moléculas de interesse (Sousa et al., 2007). A seção a seguir aborda estes compostos.

2.2. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila e uma variedade de substituintes. Estes compostos constituem um grupo diversificado de moléculas e são metabólitos secundários de plantas (Pyrzynska e Sentkowska, 2015), sintetizados durante o desenvolvimento normal da planta e em resposta a diferentes situações de estresse (Gobbo-Neto e Lopes, 2007; Ribeiro et al., 2020).

Os compostos fenólicos apresentam ampla variedade de estruturas e possuem uma gama de atividades biológicas e características funcionais, podendo ser usados como ingredientes de valor agregado em produtos farmacêuticos e cosméticos e na produção de alimentos, em que atuam como corantes e conservantes naturais, por exemplo. Portanto, esses compostos bioativos são de grande interesse para as indústrias farmacêutica, de alimentos e de cosméticos, além de áreas afins da saúde, o que tem impulsionado as pesquisas de compostos fenólicos (Pyrzynska e Sentkowska, 2015; Kafkas et al., 2018).

É crescente a busca por fontes naturais de compostos fenólicos, destacando-se neste cenário os alimentos de origem vegetal. De acordo com Haminiuk et al. (2012), alguns dos tópicos abordados nas pesquisas acerca de compostos fenólicos em alimentos são os seguintes:

- Avaliação de diferentes tipos de extração.
- Quantificação dos teores totais de compostos fenólicos e flavonoides.
- Identificação e quantificação de compostos fenólicos.
- Determinação de atividade antioxidante *in vitro*.
- Avaliação da atividade biológica dos compostos fenólicos.
- Estudo da bioacessibilidade e biodisponibilidade dos compostos fenólicos.

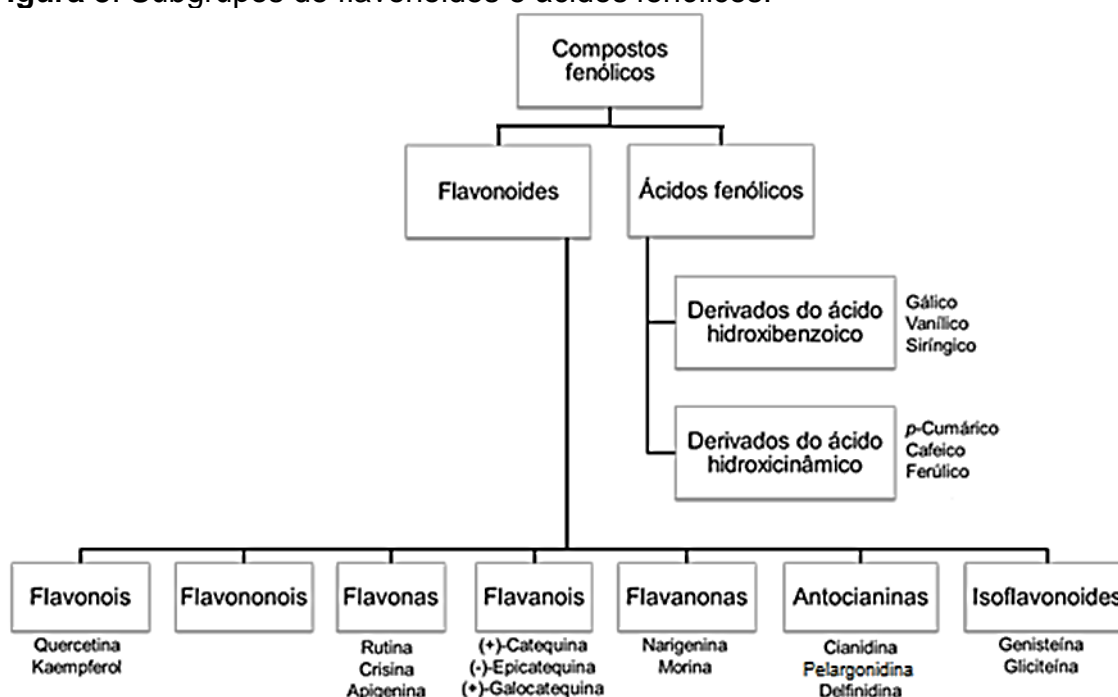
2.2.1. Classificação e estrutura

Os compostos fenólicos apresentam ao menos uma hidroxila em um anel aromático (benzeno) e suas estruturas podem variar de uma molécula simples (fenólicos monoméricos) a polímeros complexos de alta massa molecular (polifenóis) (Sousa et al., 2007; Kafkas et al., 2018). O número de anéis fenólicos e o esqueleto estrutural são os principais critérios para a classificação destes compostos, que incluem um grande número de classes de metabólitos secundários de plantas (Haminiuk et al., 2012) e podem ser encontrados nas formas livre, eterificada, esterificada (Alu'datt et al., 2017) e ligada a componentes da parede celular (Zeng et al., 2016).

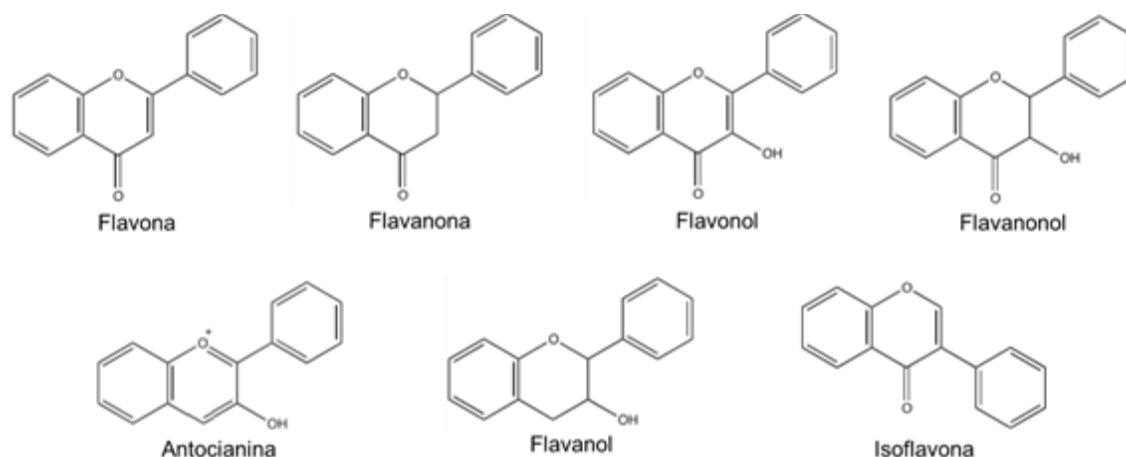
Segundo Alu'datt et al. (2017), os compostos fenólicos são classificados de acordo com estruturas químicas como fenóis simples, ácidos fenólicos, formas

aldeídicas de ácidos fenólicos, ácidos fenilacéticos, fenilpropanóides e seus derivados, acetofenonas, álcoois namílicos, cromonos e cumarinas. De acordo com Robbins (2003), os principais grupos de compostos fenólicos presentes nos alimentos são flavonoides e ácidos fenólicos, haja vista que os flavonoides representam aproximadamente dois terços dos fenólicos dietéticos e os ácidos fenólicos quase o terço restante. Estas classes de fenólicos, seus subgrupos e alguns de seus representantes são apresentados na Figura 3.

Figura 3: Subgrupos de flavonoides e ácidos fenólicos.



Os flavonoides são difenilpropanos ciclizados, em geral derivados do composto 2-fenilcromona, formado por três anéis (dois fenólicos e um heterociclo com oxigênio), todos com vários níveis de hidroxilação e metoxilação. A classe dos flavonoides inclui uma ampla gama de compostos de estrutura química C6-C3-C6 (fenilbenzopirano) e são distribuídos em grupos: flavonois, flavononois, flavonas, flavanois, flavanonas, antocianinas e isoflavonoides (Figura 4). Mais de 6000 flavonoides já foram identificados (Shahidi e Ambigaipalan, 2015).

Figura 4: Estruturas químicas das classes de flavonoides.

Fonte: adaptado de Shahidi e Ambigaipalan, 2015.

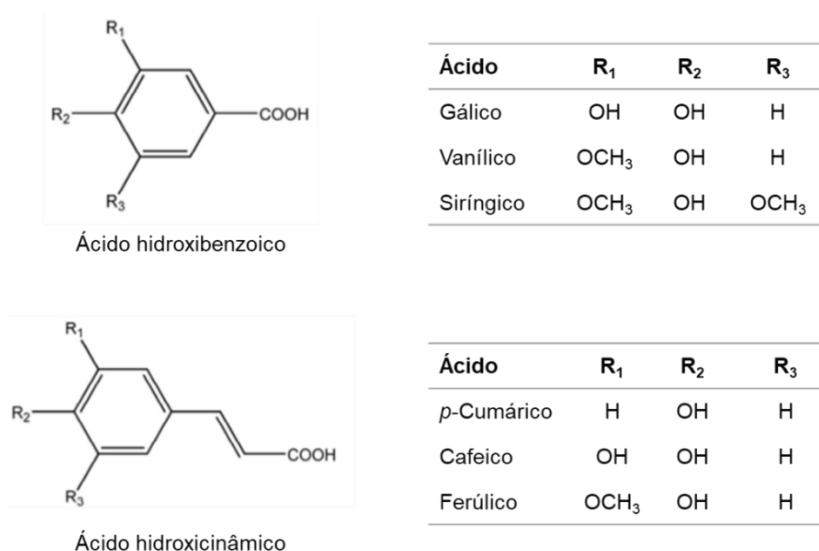
Os derivados de flavonoides variam no seu anel heterocíclico de oxigênio de seis membros, mas todos têm o esqueleto de carbono C6-C3-C6 característico (Figura 4). O anel heterocíclico de flavononas, flavanonóis e flavanóis é caracterizado pela presença de ligação simples (C2-C3). Flavonóis, flavonas e isoflavonas possuem uma ligação dupla (C2=C3) do anel heterocíclico. Flavonóis diferem das flavonas, assim como flavanonóis diferem das flavanonas por possuírem na posição 3 do anel heterocíclico um grupo hidroxila. Nos isoflavonoides o anel heterocíclico de oxigênio é substituído por um anel fenil na posição C-3, enquanto que para os flavonoides o anel heterocíclico é substituído na posição C-2. As antocianidinas e os flavanóis (catequinas) não apresentam grupo carbonila na posição 4 do anel heterocíclico (Shahidi e Ambigaipalan, 2015). A variação das estruturas dos flavonoides resulta de reações de hidroxilação, alquilação, acilação e glicosilação que alteram a molécula básica (Pyrzynska e Sentkowska, 2015).

A maioria dos flavonoides ocorre principalmente como glicosídeos, ligados a uma ou mais moléculas de açúcar, e parte como ésteres. Os flavanóis tendem a polimerizar formando taninos condensados. Flavonas e flavonóis ocorrem principalmente como agliconas nos alimentos (Thompson, 1993; Haminiuk et al., 2012).

A classe dos ácidos fenólicos é dividida em dois grupos: derivados de ácido hidroxibenzoico e derivados de ácido hidroxicinâmico (Figura 5). Estruturalmente, apenas os derivados de ácido benzoico são ácidos fenólicos,

enquanto os derivados de ácido cinâmico são fenilpropanóides (Amarowicz et al., 2009).

Figura 5: Estruturas químicas das classes de ácidos fenólicos.



Fonte: adaptado de Shahidi e Ambigaipalan, 2015.

Os derivados de ácido hidroxibenzoico apresentam em sua estrutura esqueleto C6-C1, enquanto os derivados de ácido hidroxicinâmico apresentam esqueleto C6-C3. Esses derivados diferem no padrão de hidroxilação e metoxilação em seus anéis aromáticos. Os derivados de ácido hidroxicinâmico são mais comuns nas plantas (Călinoiu e Vodnar, 2018).

Nas últimas duas décadas têm sido amplamente investigadas extração, separação, identificação e medição do teor total e individual de compostos fenólicos (Alu'datt et al., 2017). Esses processos serão discutidos nas próximas seções.

2.2.2. Extração

O preparo de amostra tem um papel importante na quantificação de compostos fenólicos, bem como outros fitoquímicos, pois este primeiro processo influencia na precisão e repetibilidade das posteriores análises (Haminiuk et al., 2012). Os métodos de preparo de amostra variam amplamente a depender da matriz dos alimentos e dos compostos fenólicos. Normalmente as amostras de

alimentos contém uma mistura de compostos fenólicos simples e complexos e possuem outros componentes (como proteínas, carboidratos e lipídios) que podem ter um efeito negativo na extração de fenólicos. Portanto, a escolha do método e das condições de extração mais apropriadas é determinante (Kafkas et al., 2018).

A extração de compostos fenólicos de alimentos depende principalmente da natureza da matriz da amostra e das propriedades dos fenólicos, como estrutura molecular, polaridade e concentração (Pyrzynska e Sentkowska, 2015). Para garantir a máxima extração dos compostos fenólicos devem ser avaliados parâmetros como solvente, razão soluto/solvente, tamanho de partícula, tempo de extração, temperatura, pH e outros (a depender do método de extração adotado) (Yang et al., 2011).

Tendo em vista que a extração de compostos fenólicos de alimentos é influenciada por vários parâmetros, a quimiometria desempenha um papel relevante na otimização das condições do método em busca da máxima extração. Empregando técnicas de planejamento multivariado é possível otimizar um processo através de um número relativamente pequeno de experimentos e identificar a significância dos fatores nos processos estudados, bem como a interação entre eles, tendo grande vantagem em relação à otimização univariada (Ferreira, 2015).

A utilização da amostra como pó fino melhora a extração de compostos fenólicos no caso dos alimentos porque, além de aumentar a área de superfície, promove o rompimento da parede celular, facilitando a liberação do fenólico (Haminiuk et al., 2012).

A composição do solvente influencia fortemente a eficiência e o rendimento da extração de compostos fenólicos de alimentos (Kafkas et al., 2018). Vários solventes podem ser usados para a extração de fenólicos, devido à ampla faixa de polaridade dos compostos. Um solvente ideal deve ter as seguintes características: ser seletivo, extraindo o analito em grande quantidade; ter mínima capacidade para dissolução de interferentes; ser quimicamente estável, sem reações irreversíveis com os analitos; e ter uma viscosidade adequada para bombear e transportar (Sardarodiyani e Sani, 2016).

Os solventes mais empregados para a extração de compostos fenólicos e antioxidantes são metanol, etanol e misturas desses solventes com água (André et al., 2010; Alu'datt et al., 2017), além de serem amplamente usados acetona, acetato de etila e propanol (Kafkas et al., 2018). É claro que não há um solvente ou mistura de solventes totalmente satisfatório para a extração de todos os compostos fenólicos (Pyrzynska e Sentkowska, 2015; Cömert e Gökmen, 2018).

O pH influencia a eficiência de extração de compostos fenólicos e tem um papel importante na estabilidade dos fenólicos nos extratos, sendo recomendável a hidrólise catalisada por ácido ou base (Kafkas et al., 2018), pois facilita o rompimento das membranas celulares para liberação dos fenólicos durante a extração. Os solventes para extração de fenólicos têm sido amplamente utilizados acidificados, entretanto, o meio não deve ficar extremamente ácido, porque isso pode levar a quebra da estrutura dos compostos fenólicos. Também é recomendável acidificar os solventes com ácidos orgânicos (fórmico ou acético) em vez de ácidos minerais (Sardarodiyani e Sani, 2016).

Potenciais candidatos para substituição de solventes convencionais têm sido propostos em técnicas de extração verde, como os líquidos iônicos (Armenta et al., 2019), que são sais fundidos e que estão no estado líquido a temperaturas iguais ou abaixo de 100 °C. Os líquidos iônicos exibem volatilidade desprezível e alta estabilidade térmica e química, diferente dos solventes convencionais, e têm sido utilizados como solventes verdes na extração de compostos bioativos, a exemplo de compostos fenólicos, de plantas e alimentos (Tan et al., 2015).

Sistemas baseados em surfactantes também são explorados como solventes verdes para substituição dos solventes convencionais (Armenta et al., 2019). Empregando soluções surfactante, a extração em ponto nuvem tem sido relatada para a extração de compostos fenólicos e antioxidantes, destacando-se como um método simples, rápido, de baixo custo, sensível e seletivo (Chatzilazarou et al., 2010; Katsoyannos et al., 2012; Stamatopoulos, Katsoyannos e Chatzilazarou, 2014; Alibade et al., 2020).

Na extração em ponto nuvem uma solução de surfactante é adicionada a uma amostra aquosa e com o aquecimento da solução acima da temperatura do ponto nuvem (em que ocorre a turvação) há a separação de duas fases, uma rica

em surfactante (viscosa, de pequeno volume e contendo os analitos) e outra aquosa (grande volume) (Pytlakowska et al., 2013). No caso da extração de compostos fenólicos são usados surfactantes não-iônicos, sem cadeias alifáticas ramificadas ou porções aromáticas (Chatzilazarou et al., 2010), considerados atóxicos (Katsoyannos et al., 2012), como por exemplo Tween 20 e 80, PEG-400 ou -8000 (Alibade et al., 2020) ou -6000, Triton X-100 e X-114 (Gortzi et al., 2008).

As principais técnicas relatadas na literatura para extrair compostos fenólicos de alimentos são extração sólido-líquido e líquido-líquido (André et al., 2010; Alu'datt et al., 2017). Extração em fase sólida, soxhlet, refluxo e maceração também são métodos de extração convencionalmente empregados. Métodos aprimorados têm sido propostos para melhorar a eficiência de extração de compostos fenólicos em alimentos, visando reduzir o tempo de extração e o consumo de solventes, diminuindo custos e a geração de resíduos tóxicos. Os métodos que têm ganhado destaque na extração de fenólicos de alimentos incluem: microextração em fase sólida, extração com fluido supercrítico, extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas, extração subcrítica com água, extração com líquidos pressurizados, campo elétrico pulsado e descargas elétricas de alta tensão (Pyrzynska e Sentkowska, 2015; Barba et al., 2016; Cong-Cong et al., 2017; Kafkas et al., 2018).

Nos métodos de extração sólido-líquido e líquido-líquido ocorre a migração dos analitos da amostra para o solvente até o ponto de equilíbrio. A extração sólido-líquido permite remover componentes solúveis da matriz. Esses métodos ainda são amplamente aplicados para a extração de compostos fenólicos por serem simples (Ignat, Volf e Popa, 2011), no entanto, apresentam como desvantagens o uso de quantidades substanciais de solventes orgânicos perigosos, o longo tempo e a baixa eficiência de extração (Cong-Cong et al., 2017).

Os métodos de extração tradicionais têm sido substituídos em busca de maior rendimento de extração e reprodutibilidade e redução do tempo de extração e do consumo de solventes. Em uma perspectiva verde, técnicas de micro-extração são relatadas para diminuir consideravelmente o consumo de solventes e resíduos gerados, reduzindo custos e danos ambientais (Armenta et al., 2019).

O método de extração com fluido supercrítico apresenta algumas vantagens sobre a extração sólido-líquido clássica, especialmente por ser mais seletivo e menos tóxico. No entanto, esse método requer equipamentos caros e altas pressões (Casas et al., 2009). Dióxido de carbono, o fluido mais usado, é não inflamável e requer uma quantidade mínima de solventes orgânicos polares, utilizados nesse caso como modificadores para melhorar a eficiência da extração (Samaranayaka e Li-Chan, 2011).

A extração assistida por ultrassom é um método rápido e eficiente para extração de compostos fenólicos de diferentes matrizes, geralmente em menor tempo do que outras técnicas de extração. A maior eficiência de extração por esta técnica se deve ao rompimento das paredes celulares, redução no tamanho de partícula e aprimoramento da transferência de massa do conteúdo celular para o solvente, causados pelo colapso das bolhas de cavitação (Rodrigues e Pinto, 2007). Uma desvantagem desse método é a possível co-extração de proteínas, açúcares e ácidos orgânicos da matriz, que podem interferir na quantificação dos fenólicos, especialmente por espectrofotometria (Ignat, Volf e Popa, 2011).

A extração assistida por micro-ondas tem se popularizado, sendo aplicado à extração de compostos fenólicos de materiais vegetais diversos. Esta técnica envolve extração com pressão e temperatura controladas, utilizando frascos fechados que proporcionam aumento da eficiência e diminuição do tempo de extração, podendo ser usado com ou sem a adição de solventes orgânicos (Sardarodiyani e Sani, 2016).

A técnica de extração subcrítica com água utiliza como solvente extrator água a altas temperaturas (entre 100 e 374 °C) e a alta pressão (de 10 a 60 bar) para manter o estado líquido. Esta técnica, que oferece tempos de extração mais curtos e maior seletividade, tem sido aplicada para a extração de compostos fenólicos em alimentos (Kanmaz, 2014).

Obviamente, não há um método de extração exclusivo para extrair todos os compostos antioxidantes presentes na estrutura dos alimentos (Cömert e Gökmen, 2018). Dessa forma, a quantificação de antioxidantes em alimentos apresenta dificuldades relacionadas à extração incompleta dos compostos e co-extração com substâncias interferentes (André et al., 2010). Neste sentido,

ressalta-se a importância da otimização dos parâmetros que podem influenciar a extração (Yang et al., 2011).

2.2.3. Separação, identificação e quantificação

Para a análise do conteúdo fenólico de produtos naturais, como plantas e alimentos, existem diversos métodos qualitativos e quantitativos, que incluem espectrofotometria UV-Vis, cromatografia líquida, cromatografia gasosa, eletroforese capilar e espectroscopia no infravermelho próximo (Cong-Cong et al., 2017; Kafkas et al., 2018).

A espectrofotometria UV-Vis é uma técnica simples e rápida para a quantificação de compostos fenólicos, que se baseia em diferentes princípios, conforme as várias estruturas dos fenólicos. Os métodos colorimétricos são largamente aplicados para a quantificação do teor total de fenólicos, principalmente devido à simplicidade e ao baixo custo (Cong-Cong et al., 2017).

O teor total de compostos fenólicos é normalmente determinado espectrofotometricamente utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, que é reduzido em meio básico pelos fenólicos da amostra, fazendo com que a solução assumira a coloração azul, cuja intensidade é proporcional a concentração total de compostos fenólicos (Everette et al., 2010). Alternativamente, pode ser usado o reagente Folin-Denis, que apesar de ser um pouco menos sensível, é mais barato e fácil para sintetizar (Magalhães e Santos, 2020a). Vale ressaltar que o método de determinação de compostos fenólicos totais não é específico e qualquer classe de fenólico responde ao ensaio. Assim como para bioativos fenólicos, o reagente Folin pode reagir com qualquer substância redutora presente na amostra, o que pode levar a resultados superestimados (Oliveira et al., 2009).

O teor total de flavonoides também é usualmente determinado espectrofotometricamente, neste caso utilizando cloreto de alumínio (Santos et al., 2017; Magalhães e Santos, 2020a). Uma reação de complexação metálica promove a coloração amarela da solução, com intensidade proporcional à concentração de flavonoides na amostra. Pode ser adicionado nitrito de sódio ao extrato da amostra para melhorar a sensibilidade (Magalhães e Santos, 2020b) ou reduzir o tempo da reação (Sun et al., 2011).

As determinações espectrofotométricas fornecem apenas uma estimativa do teor total. Para a quantificação individual dos compostos fenólicos é preciso empregar métodos de identificação e separação. Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas têm sido aplicadas para identificação de fenólicos e caracterização de novos compostos. Para a separação de compostos fenólicos pode ser empregado Eletroforese Capilar, Eletroforese Capilar de Zona, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) e Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC, do inglês *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*) (Alu'datt et al., 2017).

A CLAE é a técnica mais usada para a separação de compostos fenólicos. O conteúdo fenólico pode ser analisado empregando diferentes combinações de fase estacionária, fase móvel e detectores. As condições da CLAE para a separação de compostos fenólicos incluem principalmente o uso de colunas de C18 (fase reversa) e sistema binário de solventes (Haminiuk et al., 2012; Pyrzynska e Sentkowska, 2015; Alu'datt et al., 2017; Cong-Cong et al., 2017; Kafkas et al., 2018).

Na cromatografia em fase reversa a fase móvel é mais polar que a fase estacionária, que geralmente é constituída por cadeias de hidrocarbonetos quimicamente ligadas à sílica, cujos comprimentos mais comuns são C4, C8 e C18, sendo principalmente empregada a coluna preenchida com octadecilsilano (Lanças, 2009). Neste tipo de separação, o tempo de retenção é maior para compostos fenólicos menos polares (por exemplo, quercetina e kaempferol), enquanto as moléculas polares são eluídas mais facilmente (como ácido gálico e catequina) (Haminiuk et al., 2012).

Os compostos fenólicos estão presentes nas plantas como uma série de análogos com estruturas e propriedades físico-químicas semelhantes (Pyrzynska e Sentkowska, 2015). Devido à complexidade dos compostos fenólicos e a grande semelhança química entre alguns deles, a separação destes compostos por CLAE deve utilizar uma eluição em modo gradiente, em que a composição química da fase móvel é alterada durante a separação cromatográfica. A fase móvel geralmente é um sistema binário com água ultrapura acidificada (com ácido acético, fosfórico, tri-fluoroacético ou fórmico) como solvente polar e um solvente

orgânico (acetoneitrila, metanol ou etanol) como solvente menos polar (Haminiuk et al., 2012; Kafkas et al., 2018). A acidificação do sistema garante a supressão da ionização de grupos carboxílicos dos compostos fenólicos, o que tende a melhorar a resolução dos picos (Merken e Beecher, 2000).

O sistema de CLAE pode ser equipado com uma ampla gama de detectores, como UV-Vis, Detector com Arranjo de Diodos (DAD), fluorescência, índice de refração, eletroquímico e espectrometria de massas. O DAD ainda é um dos mais usados para a análise de compostos fenólicos de materiais vegetais (Haminiuk et al., 2012; Cong-Cong et al., 2017).

O DAD se destaca na análise de amostras desconhecidas por possibilitar uma varredura da região UV-Vis, assim, vários resultados podem ser obtidos a partir de uma única corrida (Cass e Degani, 2011). Quanto ao funcionamento, toda a luz da fonte passa pela cela do DAD e a luz emergente é dispersa por uma grade holográfica, resultando em comprimentos de onda que são focalizados sobre uma fila de fotodiodos (Lanças, 2009).

Para análises qualitativas e quantitativas, CLAE-DAD se baseia em comparações de compostos desconhecidos com padrões de referência, sendo avaliados os tempos de retenção dos picos cromatográficos (Kafkas et al., 2018). Esta técnica se destaca pela versatilidade quanto às amostras e analitos, tempo relativamente reduzido de análise, alta resolução, boas análises qualitativas e quantitativas e boa detectabilidade, entretanto, as principais limitações são a necessidade de experiência do operador e os altos custos da instrumentação e de operação (Collins, Braga e Bonato, 2006).

Sistemas mais sofisticados de cromatografia líquida e detectores modernos estão disponíveis atualmente, no entanto, esses sistemas ainda são caros, o que tende a limitar o uso destes equipamentos. O sistema CLAE-DAD se destaca na identificação de compostos fenólicos por seu baixo custo em relação a outros sistemas, sensibilidade, eficiência de separação e flexibilidade de identificação e amostras (Haminiuk et al., 2012).

2.2.4. Bioacessibilidade e biodisponibilidade

Sabendo que apenas uma parte dos compostos bioativos presentes nos alimentos realmente é absorvida e exerce algum efeito no organismo, a identificação dos metabólitos secundários e o reconhecimento de suas propriedades biológicas não devem ser tomados como uma previsão de seus efeitos sobre a saúde humana. Para tanto, é necessário considerar a bioacessibilidade e a biodisponibilidade dos compostos (Pellegrini et al., 2017).

A bioacessibilidade é definida como a fração do composto que é liberada da matriz alimentar durante e/ou após a digestão, tornando-se disponível para absorção intestinal. A biodisponibilidade considera o uso eficiente de nutrientes e compostos bioativos para o corpo, sendo definida como a fração de composto que realmente é absorvida, ou seja, é a porção que atinge a corrente sanguínea e fica disponível para utilização metabólica e exerce seus efeitos no local da ação (Palafox-Carlos et al., 2011).

A biodisponibilidade é multifatorial por incluir digestão gastrointestinal, absorção, metabolismo, distribuição de tecidos e bioatividade do composto. Portanto, pode ser afetada por uma ampla gama de fatores, relacionados ao alimento e ao indivíduo (Angelino et al., 2017). A partir da ingestão e digestão de um alimento, vários fatores interferem na bioacessibilidade dos compostos fenólicos, principalmente as características da matriz alimentar e do composto.

A matriz alimentar influencia a bioacessibilidade dos fenólicos, pois a quantidade liberada da matriz afeta a fração que é disponibilizada para absorção (Angelino et al., 2017). A quantidade de ingestão de compostos fenólicos dietéticos também é um fator importante, mas os compostos mais abundantes nos alimentos não necessariamente são aqueles que se tornam mais bioacessíveis (Zeng et al., 2016).

O processamento dos alimentos também influencia a bioacessibilidade dos compostos, porque pode alterar a estrutura do alimento e, por consequência, seu conteúdo de fenólico, podendo haver redução ou perda de alguns fenólicos ou enriquecimento de compostos em razão de modificações químicas ou físicas nos alimentos que afetam a liberação dos compostos fenólicos (Parada e Aguilera, 2007; Ribas-Agustí et al., 2017).

A estrutura química dos compostos fenólicos também afeta sua bioacessibilidade, pois determina suas interações com outros fitoquímicos e biomoléculas presentes no alimento, especialmente proteínas e fibras alimentares, afetando sua digestão (Chitindingu, Benhura e Muchuweti, 2015), razão pela qual são considerados antinutrientes.

Antinutrientes são compostos naturalmente presentes nos alimentos e que podem ter efeitos negativos na digestibilidade (Krogdahl et al., 2010), pois se ligam a nutrientes, tornando-os indisponíveis ou reduzindo sua biodisponibilidade (Haileslassie, Henry e Tyler, 2016). Dentre os antinutrientes destacam-se fitatos, oxalatos, saponinas, polifenóis (Kaur et al., 2015), taninos (Wang et al., 2010) e alcaloides (Kokou e Fountoulaki, 2018).

Em relação aos compostos fenólicos, devido à grande quantidade de grupos hidroxila em suas moléculas, podem se ligar fortemente a carboidratos e aos grupos amino de peptídeos e proteínas, impedindo sua hidrólise e, por consequência, reduzindo a digestibilidade e a absorção destes nutrientes (Kokou e Fountoulaki, 2018). Os compostos fenólicos também formam complexos com minerais, especialmente com metais divalentes, como ferro, zinco e cálcio, tornando-os menos biodisponíveis ou indisponíveis (Petry et al., 2010).

A solubilidade também é outra característica que interfere na bioacessibilidade dos compostos fenólicos. A baixa taxa de liberação dos fenólicos de materiais pouco solúveis resulta em baixa bioacessibilidade e, conseqüentemente, baixa biodisponibilidade (Parada e Aguilera, 2007).

As interações biológicas entre compostos fenólicos e enzimas do trato gastrointestinal e microflora do cólon desempenham papel essencial na bioacessibilidade. A ação enzimática pode promover e melhorar a liberação dos fenólicos da matriz (Saura-Calixto, Serrano e Goni, 2007), mas também pode causar a degradação desses compostos (Călinoiu e Vodnar, 2018).

Durante a digestão, os compostos fenólicos são degradados em compostos mais simples, originando diferentes tipos de metabólitos derivados dos anéis fenólicos (Cömert e Gökmen, 2018). Apenas pequenas modificações ocorrem ao longo do trato gastrointestinal superior. Quando atingem o intestino delgado, os fenólicos passam por extenso metabolismo pela ação de enzimas. No

nível colônico, a microbiota intestinal afeta o metabolismo dos compostos fenólicos pelo rearranjo de sua estrutura, bem como pela adição ou remoção de grupos hidroxila e metoxi (Angelino et al., 2017).

Estudos indicaram que os ácidos fenólicos e os flavonoides podem ser absorvidos no corpo humano em quantidades que são, em princípio, suficientes para exercer atividades antioxidantes ou outras atividades biológicas *in vivo* (Shahidi e Ambigaipalan, 2015). Estima-se que aproximadamente 48% dos compostos fenólicos da dieta são bioacessíveis intestino delgado e 42% tornam-se bioacessíveis apenas no intestino grosso (Saura-Calixto, Serrano e Goni, 2007).

A biodisponibilidade é avaliada por estudos *in vivo*, onde os indivíduos recebem uma dose única do alimento em teste e as amostras biológicas (sangue e/ou urina) são coletadas antes e depois do consumo. As mudanças de determinados compostos após o consumo, portanto, refletem a capacidade de absorver os fenólicos de uma matriz alimentar complexa (D'Archivio et al., 2010; Ribas-Agustí et al., 2017). Por outro lado, a bioacessibilidade pode ser avaliada usando diferentes métodos, divididos em quatro grupos de acordo com Gullon et al. (2015):

- *in vitro* – simulação em laboratório das condições da digestão gastrointestinal.
- *in situ* – perfusão intestinal de animais.
- *ex vivo* – avaliação em laboratório de órgãos gastrointestinais de animais.
- *in vivo* – estudos com animais e seres humanos.

Diferentes métodos *in vitro* estão disponíveis para a avaliação da bioacessibilidade, entre os quais um dos mais utilizados é o SBET (do inglês *Simple Bioaccessibility Extraction Test*), que consiste apenas na extração da fase gástrica do método SBRC (do inglês *Solubility/Bioavailability Research Consortium*), segundo o qual as amostras são misturadas com soluções que simulam as condições gástrica e intestinal e incubadas por determinado período de tempo. As soluções que simulam os fluidos gastrointestinais são compostas

principalmente por sais para controlar o pH, ácidos orgânicos, enzimas e proteínas (Li, Padoan e Ajmone-Marsan, 2021).

Outros métodos de bioacessibilidade *in vitro* amplamente empregados são PBET (do inglês *Physiologically Based Extraction Test*) e UBM (do inglês *Unified Bioaccessibility Method*), que foi desenvolvido pelo grupo BARGE (*Bioaccessibility Research Group of Europe*). Para estes métodos, os ensaios reproduzem as condições físico-químicas do trato gastrointestinal humano e as soluções que simulam os fluidos gastrointestinais têm composição de base fisiológica (Li, Padoan e Ajmone-Marsan, 2021).

A bioacessibilidade e a biodisponibilidade estão diretamente relacionadas às propriedades *in vivo* dos compostos fenólicos, pois apenas uma parte é absorvida e exerce algum efeito. Na seção a seguir serão discutidas as propriedades biológicas dos compostos fenólicos, bem como os efeitos à saúde associados.

2.2.5. Propriedades biológicas e efeitos na saúde

Os compostos fenólicos apresentam várias propriedades biológicas, associadas aos seus potenciais efeitos à saúde (Kafkas et al., 2018). Entre essas propriedades destacam-se: antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral, anticarcinogênica, anti-úlceras, antitrombótico, vasodilatadora, neuroprotetora, cardioprotetora, entre outras (Barros et al., 2013; Kabera et al., 2014).

As propriedades biológicas dependem da liberação dos compostos fenólicos da matriz alimentar durante a digestão (Heleno et al., 2015). Em razão disso, deve-se manter uma dieta diversificada e rica em compostos fenólicos, o que tem sido associado à prevenção de várias doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como câncer, hipertensão, diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Caleja et al., 2015).

Em meio as propriedades dos compostos fenólicos, grande destaque é dado à capacidade antioxidante. Estes compostos são conhecidos por atuar na proteção contra espécies reativas de oxigênio e suas ações nocivas (Luo et al., 2011). Os compostos fenólicos são classificados como antioxidantes primários e

sua atividade antioxidante é decorrente, principalmente, de suas estruturas químicas e propriedades de oxirredução, que os conferem a capacidade de atuar como agentes redutores, doadores de hidrogênio e eliminadores de oxigênio singlete, características importantes para a neutralização e o sequestro de radicais livres, nas etapas de iniciação e propagação do processo oxidativo (Barros et al., 2013).

Entre os antioxidantes fenólicos, evidenciam-se os flavonoides e os ácidos fenólicos, principalmente em razão de sua ampla distribuição nos alimentos (Robbins, 2003). Os ácidos fenólicos são bem conhecidos por suas propriedades antioxidante, antimicrobiana e antitumoral (Heleno et al., 2015). Aos flavonoides são relacionados principalmente a atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica e anticancerígena (Panche, Diwan e Chandra, 2016).

Os flavonoides constituem um importante grupo de antioxidantes devido ao seu alto potencial redox e sua capacidade de quelar metais (Haminiuk et al., 2012). Estes compostos apresentam modos de ação nos mecanismos preventivo e de quebra de cadeia (Musialik et al., 2009). A capacidade antioxidante dos flavonoides e de seus derivados depende de vários fatores, como o arranjo dos grupos hidroxila e carbonila em torno da molécula (para quelação de metais), a presença de substituintes doadores de hidrogênio e elétrons (para redução dos radicais livres) e a capacidade de deslocalizar o elétron não emparelhado (para a formação de um radical fenoxil estável). A atividade antioxidante destes compostos geralmente aumenta com um aumento do número de hidroxilas e os mecanismos antioxidantes podem incluir efeitos sinérgicos (Shahidi e Ambigaipalan, 2015).

As atividades bioquímicas dos flavonoides e de seus derivados dependem de suas estruturas químicas e da orientação relativa de várias porções nas moléculas. Exemplo disto, alguns isoflavonoides são antioxidantes mais ativos do que seus flavonoides correspondentes (Han et al., 2009) e o grau de glicosilação afeta diretamente a capacidade antioxidante dos flavonoides que, de modo geral, tende a diminuir com o aumento do número de moléculas de açúcar (Haminiuk et al., 2012).

A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos se deve à reatividade da fração fenol. Vários mecanismos para a ação antioxidante desses compostos foram propostos, mas acredita-se que o predominante seja a eliminação de radical através da doação de átomos de hidrogênio. Os substituintes no anel aromático dos ácidos fenólicos afetam a estabilização e, por consequência, sua capacidade em extinguir radicais. Assim, diferentes ácidos têm atividades antioxidantes distintas (Shahidi e Ambigaipalan, 2015).

De modo geral, os compostos fenólicos atuam como antioxidantes em concentrações relativamente baixas. Como esses compostos são suscetíveis à oxidação, em concentrações mais altas podem se comportar como pró-oxidantes devido ao seu envolvimento em reações de iniciação. Além disso, a combinação de antioxidantes determina o tipo de interação com outros antioxidantes. Essa interação pode ser sinérgica, quando o potencial antioxidante da mistura é maior do que a soma de seus efeitos antioxidantes independentes, ou antagônica, se a capacidade antioxidante do conjunto é menor do que a adição de seus efeitos individuais (Cömert e Gökmen, 2018).

Outra significativa propriedade biológica dos compostos fenólicos é a atividade antimicrobiana, que os permite atuar como agentes antimicrobianos eficientes para prevenção e no tratamento de várias doenças e condições causadas por diferentes microrganismos (Mekinić et al., 2019). O desenvolvimento de resistência microbiana a medicamentos tem impulsionado pesquisas de novas substâncias antimicrobianas de produtos vegetais, que são importantes fontes naturais de antimicrobianos, como compostos fenólicos (Dikpınar e Süzgeç-Selçuk, 2020).

Vários compostos fenólicos isolados de materiais vegetais, como plantas medicinais e alimentos, demonstraram prevenir o crescimento de bactérias e fungos. A atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos difere principalmente de acordo com suas estruturas químicas (Dikpınar e Süzgeç-Selçuk, 2020). Quanto à atividade antibacteriana, por exemplo, geralmente flavanonas e flavanóis apresentam alta atividade, enquanto flavonóis, isoflavonas e glicosídeos têm baixa atividade (Cömert e Gökmen, 2018).

Apesar de inúmeras propriedades biológicas de compostos fenólicos já terem sido confirmadas, a associação entre seus efeitos e o consumo de alimentos que os contêm deve ser baseada na avaliação da bioacessibilidade, pois um composto só pode ser considerado potencialmente eficaz para a saúde humana se estiver disponível para absorção após as fases da digestão gastrointestinal (Pellegrini et al., 2018).

O conhecimento dos potenciais benefícios à saúde atribuídos aos compostos fenólicos, em razão de suas numerosas propriedades biológicas, incentiva uma tendência mundial de investigação da composição dos alimentos em busca de alimentos ricos em antioxidantes fenólicos.

2.3. Alimentos ricos em antioxidantes fenólicos

Antioxidantes fenólicos são uma categoria heterogênea de moléculas, que incluem ácidos fenólicos, flavonoides (e seus derivados), estilbenos (resveratrol), vitaminas (tocoferóis), carotenoides, taninos, entre outros (Sardarodiyani e Sani, 2016). Estudos indicam que o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos pode evitar o dano oxidativo que induz o envelhecimento e leva ao surgimento de doenças relacionadas em razão da eliminação de radicais livres do metabolismo celular (Haminiuk et al., 2012). Essa associação tem impulsionado o interesse em alimentos ricos em antioxidantes fenólicos, sendo crescente o número de pesquisas sobre este tema.

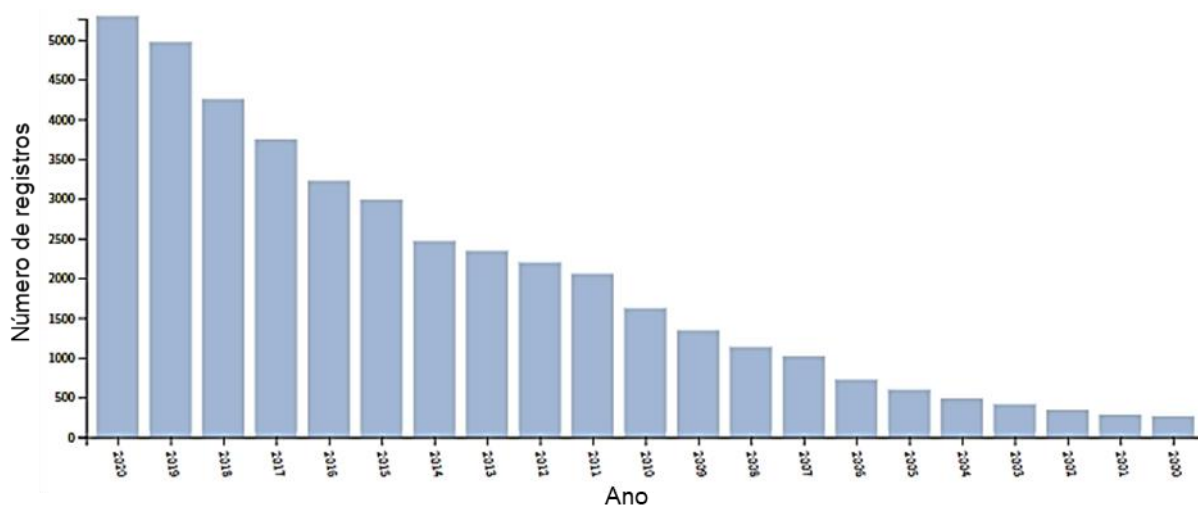
2.3.1. Panorama da pesquisa científica

Em pesquisa na Web of Science® (<https://www.webofknowledge.com/>) sobre o tópico "*phenolic antioxidant food*", em todas as bases de dados, foi verificado um total de 41063 registros no período de 2000 a 2020 (busca em 26/04/2021). A maioria dos registros são artigos (97,3%), mas também foram contabilizados livros, patentes, encontros científicos, relatos de caso, entre outros.

O número de registros foi crescente durante esse período das últimas duas décadas (Figura 6), em que o Brasil se destacou na produção de conhecimento do tema, sendo o quinto país com o maior número de registros

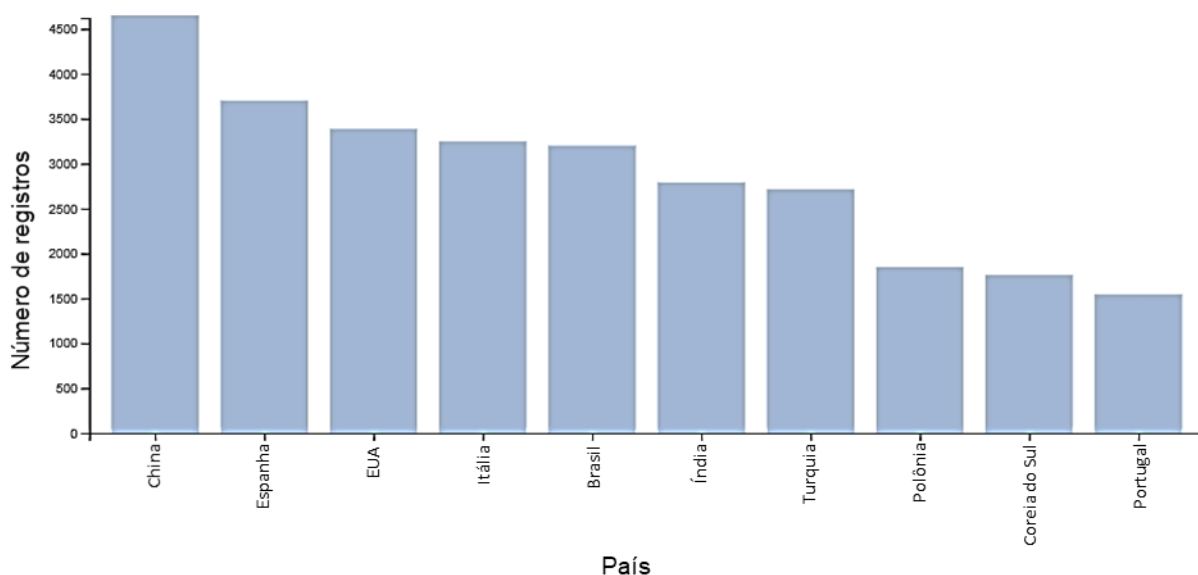
(Figura 7). O grande número de áreas de pesquisa relacionadas a estas produções (Figura 8) ressalta a importância do tema, com maior notoriedade na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Figura 6: Número de registros nas últimas duas décadas sobre o tópico antioxidantes fenólicos em alimentos.



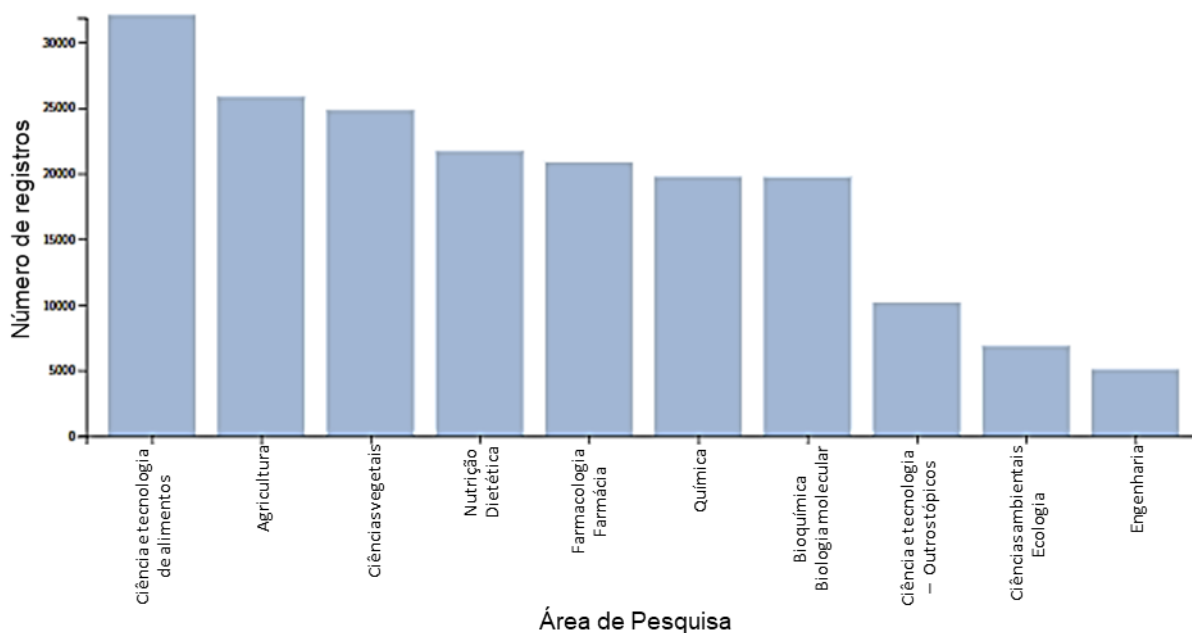
Fonte: Web of Science, 2021 (busca em 26/04/2021).

Figura 7: Os dez países com maior número de registros nas últimas duas décadas sobre o tópico antioxidantes fenólicos em alimentos.



Fonte: Web of Science, 2021 (busca em 26/04/2021).

Figura 8: Áreas de pesquisa dos registros sobre o tópico antioxidantes fenólicos em alimentos nas últimas duas décadas.



Fonte: Web of Science, 2021 (busca em 26/04/2021).

Este panorama revela a relevância do tópico, indicando que o interesse de pesquisa sobre antioxidantes fenólicos em alimentos é crescente em todo o mundo e para diversas áreas e que nas últimas duas décadas o Brasil tem se destacado neste cenário de investigação destes alimentos funcionais.

2.3.2. Distribuição nos alimentos

As plantas são fontes de compostos antioxidantes, que ocorrem naturalmente em todas as suas partes, como sementes, raízes, cascas, folhas e frutos (Shahidi e Ambigaipalan, 2015). Como são onipresentes em todos os órgãos das plantas, os compostos fenólicos são parte integrante da dieta humana. Os fenólicos são determinantes na qualidade sensorial e nutricional de alimentos vegetais (Pyrzynska e Sentkowska, 2015).

Como metabólitos secundários, a produção de compostos fenólicos se dá durante o desenvolvimento da planta e é influenciada por diferentes aspectos, fatores bióticos e abióticos podem interferir na síntese dos compostos fenólicos (Ribeiro et al., 2019). Portanto, os alimentos de origem vegetal também terão seu conteúdo fenólico afetado por estas situações. Nas frutas, por exemplo, a

quantidade de compostos fenólicos depende fortemente do grau maturação (Haminiuk et al., 2012).

O principal fator que influencia a biossíntese de fenólicos é genético, pois cada planta apresenta um perfil fenólico e as interações genético-ambientais podem resultar em uma grande flutuação do conteúdo fenólico e da capacidade antioxidante entre diferentes espécies e entre cultivares da mesma espécie (Călinoiu e Vodnar, 2018).

Fatores que também podem influenciar a composição fenólica dos alimentos vegetais são: composição do solo, condições ambientais e sazonais durante o desenvolvimento da planta, origem geográfica (Gobbo-Neto e Lopes, 2007; Calegari et al., 2017; Ribeiro et al., 2020), estratégias agronômicas e condições fisiopatológicas da planta (Zielinski et al., 2014), além de tratamentos tecnológicos e condições de fabricação e armazenamento dos alimentos (Dias et al., 2013).

Nos alimentos de origem vegetal, os compostos fenólicos são geralmente encontrados sob formas de glicosídeos ligados a diferentes porções de açúcar ou como outras formas ligadas a ácidos orgânicos, aminas, lipídios, carboidratos e outros fenólicos, principalmente ácidos fenólicos (Călinoiu e Vodnar, 2018)

Evidências apontam que uma dieta rica em frutas, vegetais, grãos integrais e leguminosas pode funcionar para a prevenção de doenças (Caleja et al., 2015; Sardarodiyani e Sani, 2016). Destaca-se o consumo de alimentos integrais na dieta, pois a associação de fibras e compostos bioativos tem demonstrado papel protetor contra o desenvolvimento de várias doenças (Călinoiu e Vodnar, 2018). A Tabela 2 reúne os principais compostos fenólicos identificados em alimentos, como frutas, vegetais, legumes, cereais, oleaginosas e bebidas.

Tabela 2: Antioxidantes fenólicos em alimentos. (Continua)

Alimento	Principais compostos fenólicos	Referência
Soja	Ácidos cafeico, clorogênico, trans-cinâmico e gálico	
Lentilha	Ácido p-cumárico, apigenina, miricetina, quercetina, prodelfinidina, procianidina e catequinas	
Feijão preto	Antocianidinas (delfinidina, malvidina) e proantocianidinas (monômeros, dímeros, trímeros, tetrâmeros, pentâmeros, hexâmeros)	
Repolho	Kaempferol, quercetina, luteolina, miricetina e ácidos hidroxicinâmicos	
Batata	Ácidos clorogênico, cafeico, gálico e protocatecuico	
Amêndoa	Tocoferóis, lignanas, catequinas e elagitaninos	
Avelã	Tocoferóis, taninos condensados e catequinas	
Vinho tinto	Ácido gálico, resveratrol, catequinas, quercetina, rutina, taninos e antocianinas	
Vinho branco	Ácidos p-cumárico e cafeico e seus derivados	
Maçã	Quercetina, epicatequina, procianidina, rutina e ácido clorogênico	Cömert e Gökmen, 2018
Damasco	Rutina, catequina, epicatequina, quercetina e ácido clorogênico	
Banana	Catequinas, procianidinas, quercetina, miricetina, kaempferol e ácidos hidroxicinâmicos	
Amora	Miricetina, quercetina e antocianidinas (cianidina, delfinidina, malvidina, petunidina e peonidina)	
Cereja	Quercetina, antocianidinas (cianidina, pelargonidina, peonidina) e ácidos hidroxicinâmicos	
Morango	Kaempferol, quercetina, antocianidinas (cianidina, pelargonidina e peonidina), elagitaninos e ácidos elágico, gálico e cafeico	
Kiwi	Quercetina, epicatequina, catequina, procianidina e ácidos cafeico, cumárico, trans-ferúlico, gálico, salicílico, protocatecuico e vanílico	
Pêssego	Ácido clorogênico, cianidina, catequina e quercetina	
Ameixa	Ácido clorogênico, cianidina e kaempferol	
Uva verde	Ácidos cafeico e gálico, catequina, resveratrol, proantocianidinas e antocianidinas	
Centeio	Ácidos protocatecuico, p-hidroxibenzoico, vanílico, siríngico, ferúlico, p-cumárico, cafeico e sinápico	
Trigo	Ácidos ferúlico, vanílico, cafeico, p-cumárico e siríngico	Călinoiu e Vodnar, 2018
Cevada	Ácidos protocatecuico, p-hidroxibenzoico, salicílico, vanílico, siríngico, ferúlico, p-cumárico e sinápico	
Aveia	Ácidos p-hidroxibenzoico e vanílico	

Tabela 2: Antioxidantes fenólicos em alimentos. (Continuação)

Alimento	Principais compostos fenólicos	Referência
Tomate	Quercetina, rutina, kaempferol e ácido clorogênico	Shahidi e Ambigaipalan, 2015
Brócolis	Kaempferol e quercetina	
Grão-de-bico	Catequina, epicatequina, procianidinas, quercetina e ácido p-cumárico	
Romã	Antocianidinas (delfinidina, cianidina e pelargonidina), taninos hidrolisáveis e lignanas	
Cenoura	Ácidos clorogênico, cafeico, p-hidroxibenzoico e ferúlico	
Cebola	Quercetina, kaempferol, miricetina, catequina e ácidos ferúlico, p-hidroxibenzoico, vanílico e cumárico	
Azeitona	Tirosol e ácidos procatecuico, vanílico, siríngico e p-cumárico	
Espargos	Rutina, quercetina, kaempferol e isorhamnetina	
Castanha de caju	Taninos hidrolisáveis, catequina, epicatequina, cianidina, pelargonidina e ácidos gálico e cafeico	
Amendoim	Resveratrol, catequinas, procianidinas e ácidos p-cumárico, ferúlico, cafeico e clorogênico	
Café	Catequina, rutina e ácidos cafeico, ferúlico, clorogênico, gálico e procatecuico	
Cacau	Catequinas, procianidinas, antocianidinas, luteolina e quercetina	
Linhaça	Lignanas e ácidos p-hidroxibenzoico, gentísico, p-cumárico, ferúlico, clorogênico, cafeico, vanílico e sinápico	
Gergelim	Lignanas, sesamol, pinosinol, sesaminol, sesamol e ácidos p-hidroxibenzoico, p-cumárico, ferúlico e cafeico	
Uva vermelha	Rutina, catequina, malvidina, resveratrol	Haminiuk et al., 2012
Laranja	Hesperetina, naringenina, luteolina e ácidos p-cúmarico e ferúlico	
Mirtilo	Ácido clorogênico, delfinidina, malvidina, peonidina e petunidina	
Abacate	Epicatequina e ácidos cafeico, gálico e vanílico	Han et al., 2019
Quinoa	Rutina, quercetina e ácidos gálico, procatecuico, p-hidroxibenzoico, clorogênico, vanílico, cafeico, siríngico, p-cumárico e ferúlico	
Amaranto	Quercetina, rutina e ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico, p-hidroxibenzoico, vanílico, sinápico, gálico e procatecuico	Karamac et al., 2019
Chia	Quercetina, kaempferol, rutina, hesperidina, miricetina, taninos e ácidos clorogênico, cafeico, gálico e rosmarínico	Kaur e Bains, 2020

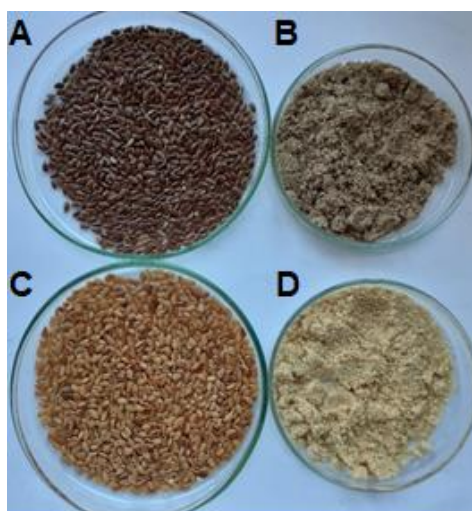
2.3.2.1. Farinhas integrais

De acordo com Sujka et al. (2017), farinha é o produto obtido no processo de moagem de grãos e é uma das principais matérias-primas da indústria de alimentos. Segundo resolução nº 12 de 1978 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), farinha integral é o produto obtido a partir da moagem da parte comestível de grãos, rizomas, frutas ou tubérculos integrais (ANVISA, 1978).

As farinhas de sementes oleaginosas e de grãos de cereais e pseudocereais têm chamado atenção pelo valor nutricional, presença de compostos bioativos e propriedades funcionais relacionadas, sendo utilizadas na indústria de alimentos na produção de alimentos funcionais (Costantini et al., 2014; Coelho e Salas-Mellado, 2015; Iglesias-Puig, Monedero e Haros, 2015; Sohaimy et al., 2018). Entre as sementes oleaginosas destacam-se linhaça, gergelim e chia e entre os pseudocereais destacam-se quinoa e amaranto.

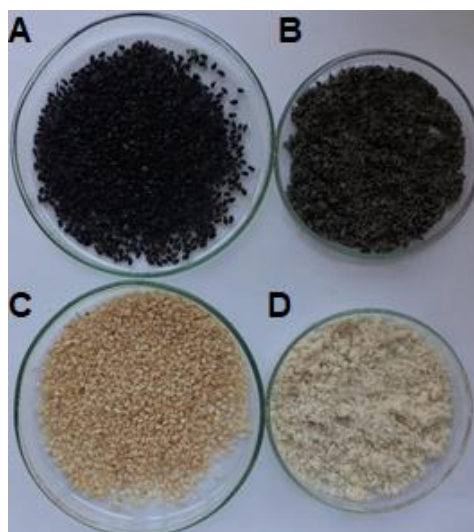
A linhaça (*Linum usitatissimum* L.) é uma planta que produz sementes pequenas e planas que variam do amarelo dourado ao marrom avermelhado (Gutte, Sahoo e Ranveer, 2015). Consideradas como alimento funcional (Corbin et al., 2015), as sementes de linhaça e seus derivados, como farinha (Figura 9), óleo e extrato, têm vários efeitos terapêuticos (Bravi et al., 2011). Além de ser rica em nutrientes, a linhaça contém compostos com efeitos benéficos para a saúde, especialmente antioxidantes fenólicos e lignanas (Silva et al., 2017a).

Figura 9: Semente (A) e farinha (B) de linhaça marrom e semente (C) e farinha (D) de linhaça dourada (*Linum usitatissimum* L.).



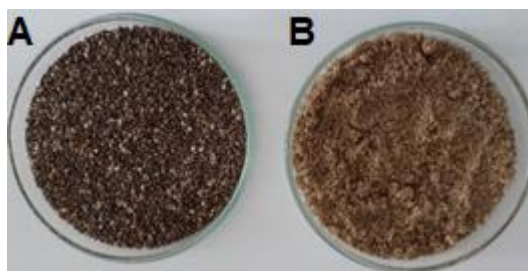
O gergelim (*Sesamum indicum* L.) é rico em proteínas, carboidratos, minerais e fibras, além de vários compostos bioativos, como compostos fenólicos e lignanas (Khademian et al., 2019). O gergelim preto apresenta maior teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em relação ao gergelim branco (Magalhães et al., 2020). As sementes de gergelim são usadas na fabricação de farinha (Figura 10), óleo comestível e outros produtos alimentícios (Kermani et al., 2019), além de amplamente utilizado nas indústrias farmacêutica e cosmética (Khademian et al., 2019).

Figura 10: Semente (A) e farinha (B) de gergelim preto e semente (C) e farinha (D) de gergelim branco (*Sesamum indicum* L.).



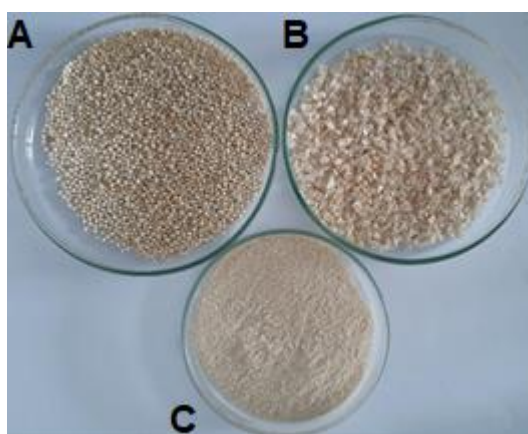
As sementes de chia (*Salvia hispanica* L.) possuem grandes quantidade de lipídios (principalmente ácidos graxos ômega 3 e 6), fibras, proteínas de alto valor biológico, minerais, vitaminas e antioxidantes naturais, principalmente compostos fenólicos (Ixtaina et al., 2011). As sementes de chia e seus subprodutos, farinha (Figura 11) e óleo, têm sido muito usados na produção de alimentos funcionais (Pellegrini et al., 2018; Coelho e Salas-Mellado, 2015; Pizarro et al., 2013). A cor das sementes de chia varia de preto a branco. A chia é convencionalmente comercializada como uma mistura de sementes, sendo principalmente preto-manchado e, em menor porcentagem, de sementes brancas (Ayerza, 2010).

Figura 11: Sementes (A) e farinha (B) de chia (*Salvia hispanica* L.).



A quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) é um pseudocereal com alto teor de proteínas e ácidos graxos (ômega 3 e 6) (Brito et al., 2015), fonte de vitaminas, minerais e fibras (Iglesias-Puig, Monedero e Haros, 2015) e rica em uma grande variedade de compostos com propriedades funcionais (Lin et al., 2019), especialmente compostos fenólicos (Alvarez-Jubete et al., 2010; Han et al., 2019). Os grãos podem apresentar diferentes cores: branco, preto, amarelo e vermelho (Escribano et al., 2017). A quinoa é consumida em grãos *in natura* ou processada como farinha e flocos (Figura 12) (Lin et al., 2019), usados na produção de alimentos funcionais (Calderelli et al., 2010; Navruz-Varli e Sanlier, 2016).

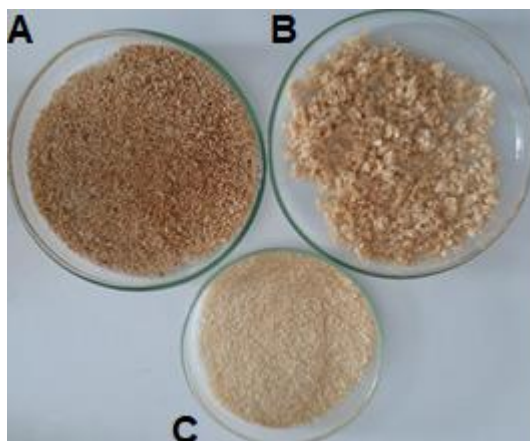
Figura 12: Grãos (A), flocos (B) e farinha (C) de quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) branca.



Amaranto (*Amaranthus* spp.) é um pseudocereal, consumido como farinha, flocos e grãos integrais (Figura 13) e usado na produção de alimentos funcionais (Cornejo et al., 2019). A cor dos grãos varia entre preto, marrom, amarelo e branco (Singh e Punia, 2020). Os grãos de amaranto são conhecidos como fonte de proteínas, fibras, vitaminas e minerais (Karamac et al., 2019), além

de metabólitos secundários, associados a efeitos benéficos à saúde (Tang e Tsao, 2017), destacando-se os compostos fenólicos com atividade antioxidante (Paucar-Menacho et al., 2018; Peiretti et al., 2017; Alvarez-Jubete et al., 2010).

Figura 13: Grãos (A), flocos (B) e farinha (C) de amaranto (*Amaranthus* spp.) branco.



Perante o exposto e discutido nesta seção, ressaltando-se a importância da investigação de antioxidantes e antimicrobianos naturais, entre os quais destacam-se os compostos fenólicos, e em vista do grande consumo de farinhas integrais e seus produtos, considerados alimentos funcionais e cujos benefícios à saúde são frequentemente associados à presença de compostos bioativos, este trabalho propõe-se a analisar farinhas integrais de linhaça (marrom e dourada), gergelim (preto e branco), amaranto (branco), quinoa (branca) e chia (preta e branca). Para tanto, estratégias analíticas visaram a investigação do perfil fitoquímico, a avaliação das potenciais atividades antioxidante e antibacteriana, a determinação dos teores de compostos fenólicos e a avaliação da bioacessibilidade de compostos fenólicos e antioxidantes das farinhas integrais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Determinar perfil fitoquímico, conteúdo fenólico, potenciais atividades antioxidante e antibacteriana, e bioacessibilidade de compostos fenólicos e antioxidantes de farinhas integrais de linhaça, gergelim, amaranto, quinoa e chia.

3.2. Objetivos Específicos

- Otimizar e validar método de extração de compostos fenólicos de farinhas integrais empregando técnicas de planejamento experimental.
- Analisar o perfil fitoquímico dos extratos de farinhas integrais por cromatografia em camada delgada.
- Determinar atividade antioxidante *in vitro* dos extratos de farinhas integrais por métodos espectrofotométricos.
- Quantificar os teores totais de compostos fenólicos dos extratos de farinhas integrais empregando métodos espectrofotométricos.
- Otimizar e validar método de separação de compostos fenólicos e antioxidantes por CLAE.
- Identificar e quantificar compostos bioativos dos extratos de farinhas integrais empregando CLAE-DAD.
- Analisar comparativamente a composição fenólica das farinhas integrais aplicando análises multivariadas.
- Investigar a autenticidade de amostras comerciais de farinha de chia por meio de análises multivariadas.
- Avaliar a bioacessibilidade de compostos fenólicos e antioxidantes de farinha de quinoa aplicando método de simulação de digestão *in vitro*.
- Avaliar a atividade antibacteriana de extratos de farinhas integrais (chia e quinoa) pelos métodos microdiluição seriada e difusão em ágar.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes e soluções

Padrões analíticos de alta pureza adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA): 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico) (ABTS), (+)-catequina, rutina, quercetina, kaempferol, crisina, naringenina, cloreto de pelargonidina, resveratrol, cafeína, teobromina, vanilina, siringaldeído, os ácidos protocatecuico, vanílico, siríngico, ferúlico, sinápico, elágico, gálico, p-cumárico, clorogênico, cafeico, transcinâmico, ascórbico e tânico, saponina, aloína, timol, lupeol, pepsina da mucosa gástrica suína, pancreatina de pâncreas suíno e bile bovina.

Reagentes de pureza analítica: metanol, etanol, acetona, clorofórmio, acetato de etila, dietilamina, éter etílico, tolueno, éter de petróleo, n-butanol, ácido fórmico, ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido fosfórico, ácido acético glacial, anidrido acético, hidróxido de potássio e azul de metileno da Synth (Brasil); ácido fosfomolibdico, carbonato de sódio, hidrogenocarbonato de sódio, nitrito de sódio e dimetilsulfóxido (DMSO) da Vetec (Brasil); cloreto de alumínio e reagente Folin-Ciocalteu da Êxodo Científica (Brasil); sulfato de ferro amoniacal e vanilina da Merck (Alemanha); tungstato de sódio da Dinâmica Química Contemporânea (Brasil); e anisaldeído da Sigma-Aldrich (EUA).

Reagentes de pureza grau HPLC: metanol da Merck (Alemanha), etanol da Honeywell (EUA) e ácido acético glacial da J.T.Baker (EUA). A água ultrapura foi obtida em sistema de purificação modelo Master P&D da Gehaka (Brasil). As soluções-estoque dos padrões ($1,0 \text{ g L}^{-1}$) foram preparadas em metanol grau HPLC, exceto para: cloreto de pelargonidina, solubilizado em metanol acidificado com HCl ($99:1 \text{ v v}^{-1}$); ácido elágico e teobromina, solubilizados em dimetilsulfóxido e metanol ($6:4 \text{ v v}^{-1}$). As soluções intermediárias ($100,0 \text{ mg L}^{-1}$) foram preparadas pela diluição da solução estoque com metanol grau HPLC. As soluções de trabalho (mistura de padrões) foram obtidas em diferentes concentrações a partir de diluição da solução intermediária com metanol grau HPLC. Todas as soluções dos padrões foram armazenadas em frascos âmbar a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para a fase móvel foi preparada a solução de ácido acético 1% (v v^{-1}) com ácido acético glacial grau HPLC e água ultrapura. A solução foi filtrada a vácuo e

sonicada por 10 minutos em banho de ultrassom (maxiclean 1450, Unique, Brasil), para eliminar bolhas de ar formadas na filtração, que podem prejudicar o empacotamento da coluna cromatográfica. A acidificação do sistema garante a supressão da ionização de grupos carboxílicos dos compostos fenólicos, o que tende a melhorar a resolução dos picos (Merken e Beecher, 2000).

4.2. Amostras

Em estabelecimentos comerciais de Salvador-BA foram adquiridas 6 amostras de grãos de quinoa branca e 5 amostras de cada uma seguintes sementes e grãos: linhaça marrom, linhaça dourada, gergelim preto, gergelim branco e amaranto branco. As amostras de sementes e grãos *in natura* foram utilizadas para a produção de farinha, a fim de garantir a autenticidade.

5 amostras comerciais de farinha de chia foram adquiridas para a avaliação de autenticidade. 15 amostras de sementes de chia (mistura de sementes pretas e brancas) foram adquiridas para a produção da farinha integral. As sementes de uma das amostras de chia foram manualmente separadas pela cor, sendo produzida a farinha integral apenas com sementes pretas e somente com sementes brancas, para avaliar separadamente o perfil fenólico de cada variedade.

Sabendo que farinha integral é o produto obtido a partir da moagem da parte comestível de grãos integrais (ANVISA, 1978; Sujka et al., 2017), as sementes e grãos foram triturados em liquidificador doméstico e homogeneizadas em peneira granulométrica 32 mesh (0,50 mm de abertura). As amostras de farinha prontas adquiridas foram homogeneizadas da mesma forma. Todas as amostras foram armazenadas em dessecador a vácuo, codificadas por siglas: primeira letra para indicar a espécie de semente/grão e segunda letra para distinguir a origem (local de aquisição ou marca comercial).

Para simular a adulteração da farinha integral de chia foram utilizados amido de milho e as farinhas: trigo comum, mandioca, aveia e milho. Os adulterantes foram homogeneizados da mesma forma que as amostras de farinha de chia. A simulação da adulteração se deu pela adição de adulterante, separadamente, nas proporções de 5% e 10% (m m⁻¹).

4.3. Extração de compostos fenólicos

4.3.1. Otimização do processo de extração de fenólicos

O método de extração sólido-líquido teve as condições otimizadas empregando planejamentos experimentais (planejamento de misturas simplex-centroide, fatorial completo de dois níveis e Box Behnken), buscando maximizar a extração dos compostos de interesse e minimizar o gasto de solventes orgânicos, reduzindo custos e proporcionando ganho ambiental. Para tanto, foi utilizado o software Statistica versão 7.0 (Stat-Soft Inc., EUA).

A farinha de linhaça dourada foi usada como amostra de referência para a otimização do método de extração. A resposta avaliada foi o teor total de compostos fenólicos, determinado espectrofotometricamente, e os resultados foram expressos em porcentagem de eficiência de extração. Triplicatas do ponto central (PC) foram realizadas para determinar o erro experimental. Os experimentos de todos os planejamentos foram realizados aleatoriamente.

Inicialmente foi aplicado o planejamento de misturas simplex-centroide (Tabela 3) para determinar a composição do solvente extrator, avaliando os solventes: água, metanol e acetona. A massa da amostra foi fixada em 0,5 g e foi estabelecido 15 mL como volume total de solvente extrator.

Tabela 3: Matriz do planejamento de misturas simplex-centroide com valores codificados e reais.

Experimento	Volume de água (mL)	Volume de metanol (mL)	Volume de acetona (mL)
1	1,00 (15,0)	0,00 (0,0)	0,00 (0,0)
2	0,00 (0,0)	1,00 (15,0)	1,00 (0,0)
3	0,00 (0,0)	0,00 (0,0)	1,00 (15,0)
4	0,50 (7,5)	0,50 (7,5)	0,00 (0,0)
5	0,50 (7,5)	0,00 (0,0)	0,50 (7,5)
6	0,00 (0,0)	0,50 (7,5)	0,50 (7,5)
7	0,67 (10,0)	0,17 (2,5)	0,17 (2,5)
8	0,17 (2,5)	0,67 (10,0)	0,17 (2,5)
9	0,17 (2,5)	0,17 (2,5)	0,67 (10,0)
10 (PC)	0,33 (5,0)	0,33 (5,0)	0,33 (5,0)

Após a determinação do solvente extrator, um planejamento fatorial completo de dois níveis (2^3) foi aplicado para investigar a influência da razão amostra:solvente (1:30, 1:60, 1:90), tempo de agitação (30, 60 e 90 min) e velocidade de agitação (100, 250 e 400 rpm) no processo de extração (Tabela 4).

Tabela 4: Matriz do planejamento fatorial completo de dois níveis (2^3) com valores codificados e reais.

Experimento	Razão amostra:solvente	Tempo de agitação (min)	Velocidade de agitação (rpm)
1	-1 (1:30)	-1 (30)	-1 (100)
2	+1 (1:90)	-1 (30)	-1 (100)
3	-1 (1:30)	+1 (90)	-1 (100)
4	+1 (1:90)	+1 (90)	-1 (100)
5	-1 (1:30)	-1 (30)	+1 (400)
6	+1 (1:90)	-1 (30)	+1 (400)
7	-1 (1:30)	+1 (90)	+1 (400)
8	+1 (1:90)	+1 (90)	+1 (400)
9 (PC)	0 (1:60)	0 (60)	0 (250)
10 (PC)	0 (1:60)	0 (60)	0 (250)
11 (PC)	0 (1:60)	0 (60)	0 (250)

Todas as variáveis foram novamente estudadas na fase de otimização alterando o domínio experimental: razão amostra:solvente (1:60, 1:80, 1:100), tempo de agitação (60, 90 e 120 min) e velocidade de agitação (200, 300 e 400 rpm). As condições ótimas foram determinadas empregando o planejamento Box Behnken (Tabela 5).

Tabela 5: Matriz do planejamento Box Behnken com valores codificados e reais.

Experimento	Razão amostra:solvente	Tempo de agitação (min)	Velocidade de agitação (rpm)
1	-1 (1:60)	-1 (60)	0 (300)
2	+1 (1:100)	-1 (60)	0 (300)
3	-1 (1:60)	+1 (120)	0 (300)
4	+1 (1:100)	+1 (120)	0 (300)
5	-1 (1:60)	0 (90)	-1 (200)
6	+1 (1:100)	0 (90)	-1 (200)
7	-1 (1:60)	0 (90)	+1 (400)
8	+1 (1:100)	0 (90)	+1 (400)
9	0 (1:80)	-1 (60)	-1 (200)
10	0 (1:80)	+1 (120)	-1 (200)
11	0 (1:80)	-1 (60)	+1 (400)
12	0 (1:80)	+1 (120)	+1 (400)
13 (CP)	0 (1:80)	0 (90)	0 (300)
14 (CP)	0 (1:80)	0 (90)	0 (300)
15 (CP)	0 (1:80)	0 (90)	0 (300)

4.3.2. Validação do método de extração

Para a validação do método de extração foram avaliados os parâmetros analíticos: precisão, exatidão, robustez e eficiência de extração. A avaliação desses parâmetros foi realizada de acordo com o teor total de compostos fenólicos, determinado espectrofotometricamente, e utilizando a farinha integral de linhaça dourada como amostra de referência e o ácido gálico como padrão de referência.

A precisão foi avaliada pelo desvio padrão relativo do teor de fenólicos de 10 extratos de uma amostra. Para avaliar a exatidão foi adicionado ácido gálico à amostra em três níveis de concentração (65, 100 e 130 mg L⁻¹), em triplicata, e calculado o percentual de recuperação. A eficiência de extração do método foi

avaliada aplicando-se extrações sucessivas a uma mesma amostra. A robustez foi avaliada empregando um planejamento fatorial fracionário de dois níveis (2^{3-1}), adotando as condições ótimas como ponto central (Tabela 6).

Tabela 6: Matriz do planejamento fatorial fracionário (2^{3-1}), com valores codificados e reais.

Experimento	Razão amostra:solvente	Tempo de agitação (min)	Velocidade de agitação (rpm)
1	-1 (1:81)	-1 (67,5)	+1 (385)
2	-1 (1:81)	+1 (82,5)	-1 (315)
3	+1 (1:99)	-1 (67,5)	-1 (315)
4	+1 (1:99)	+1 (82,5)	+1 (385)
5 (PC)	0 (1:90)	0 (75,0)	0 (350)
6 (PC)	0 (1:90)	0 (75,0)	0 (350)
7 (PC)	0 (1:90)	0 (75,0)	0 (350)

4.3.3. Aplicação do método de extração

À 0,2 g de amostra de farinha integral foi adicionado 18 mL de solução de metanol e acetona (8:2 v v⁻¹) acidificada com uma gota (aproximadamente 100 µL) de ácido clorídrico concentrado. As amostras foram submetidas à extração em mesa agitadora (0225M, Quimis, Brasil) a 350 rpm por 75 minutos à temperatura ambiente. As misturas foram filtradas em papel de filtro qualitativo e os filtrados foram rotaevaporados (550, Fisatom, Brasil) a 40 °C e 40 rpm. Os extratos secos foram ressolubilizados em 1,5 mL de metanol grau HPLC e armazenados a -20 °C para análises posteriores.

4.4. Prospecção fitoquímica qualitativa

A prospecção fitoquímica qualitativa foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e em tubos de ensaio. A tentativa de identificação de glucosídeos cardiotônicos foi realizada de acordo com metodologia de Bessa,

Terrones e Santos (2007), sendo observadas mudanças de cor da solução resultante para indicar a presença ou ausência de compostos destas classes de metabólitos secundários nas amostras.

Para glucosídeos cardiotônicos, a 1,0 mL de extrato de farinha integral foi adicionado 1,5 mL de acetato de chumbo 10% ($m v^{-1}$) e 1,0 mL de água ultrapura. A mistura foi aquecida a banho-maria por 10 minutos e filtrada. O filtrado foi adicionado a 2,0 mL de clorofórmio e agitado. A fase clorofórmica foi separada, a qual foi adicionado 1,0 mL do reagente Liebermann-Burchard (uma gota de ácido sulfúrico concentrado em 5 mL de anidrido acético).

Por CCD foi realizada a tentativa de identificação de compostos das classes de metabólitos secundários: alcaloides, antocianinas, antraquinonas, compostos fenólicos, cumarinas, derivados antracênicos, lignanas, mono-, sesqui- e diterpenos, naftoquinonas, saponinas, taninos condensados, taninos hidrolisáveis, triterpenos e esteroides, e xantinas.

Para a CCD, uma pequena quantidade (aproximadamente 10 μ L) de extrato de farinha integral e de um padrão de referência (especificamente para algumas das classes de metabólito) foi aplicado em placas de sílica gel 60 F254 com suporte de alumínio (Merck, Alemanha), eluídas em diferentes sistemas de solventes, de acordo com a classe de metabólito secundário. Após a eluição foram usados reveladores específicos para as classes e as placas foram visualizadas em câmera UV em 254 e/ou 365 nm (Wagner e Bladt, 1996). Os sistemas de eluição, reveladores e padrões de referência para cada classe de metabólito secundário são apresentados na Tabela 7. Foram observados o perfil de manchas e suas cores para determinar a presença ou ausência de compostos de diferentes classes de metabólitos secundários.

Tabela 7: Sistemas de eluição e reveladores e padrões de referência para prospecção fitoquímica por CCD.

Classe de Metabólito	Sistemas de eluição	Padrão	Reveladores
Alcaloides gerais	Tolueno: acetato de etila: dietilamina (70:20:10, v v ⁻¹)	Sem padrão	Reagente de Dragendorff
Antocianinas	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26, v v ⁻¹)	Azul de metileno	Sem revelador
Antraquinonas	Éter de petróleo: acetato de etila: ácido fórmico (75:25:1, v v ⁻¹)	Sem padrão	Ácido fosfomolibdico / H ₂ SO ₄ etanólico 10% (v v ⁻¹)
Compostos fenólicos	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26, v v ⁻¹)	Quercetina	Sem revelador
Cumarinas	Tolueno: éter etílico (1:1 saturado com ácido acético 10%, v v ⁻¹)	Sem padrão	KOH etanólico 10% (m v ⁻¹)
Derivados antracênicos	Acetato de etila: metanol: água (100:13,5:10, v v ⁻¹)	Aloína	KOH etanólico 10% (m v ⁻¹)
Lignanas	Clorofórmio: metanol: água (70:30:4, v v ⁻¹)	Sem padrão	Vanilina fosfórica (5-10 min a 100 °C)
Mono, sesqui e diterpenos	Tolueno: acetato de etila (93:7, v v ⁻¹)	Timol	Vanilina fosfórica (5-10 min a 100 °C)
Naftoquinonas	Tolueno: ácido fórmico (99:1, v v ⁻¹)	Sem padrão	KOH etanólico 10% (m v ⁻¹)
Saponinas	Clorofórmio: ácido acético: metanol: água (64:32:12:8, v v ⁻¹)	Saponina	Sem revelador
Taninos condensados	Acetato de etila: ácido acético glacial: ácido fórmico: água (100:11:11:26, v v ⁻¹)	Catequina	Vanilina clorídrica
Taninos hidrolisáveis	n-Butanol: acetona: tampão fosfato pH 5,0 (40:50:10, v v ⁻¹)	Ácido gálico	Sulfato de ferro amoniacal 1% (m v ⁻¹)
Triterpenos e esteroides	Tolueno: clorofórmio: etanol (40:40:10, v v ⁻¹)	Lupeol	Reagente Lieberman-Burchard (5-10 min a 110 °C)
Xantinas	Acetato de etila: metanol: água (100:13,5:10, v v ⁻¹)	Cafeína	Sem revelador

4.5. Determinações espectrofotométricas

4.5.1. Teor total de compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos totais nos extratos de farinhas integrais foi determinado empregando método colorimétrico com reagente Folin. Para as amostras de farinha de quinoa e de chia foi utilizado o reagente Folin-Ciocalteu (FC), de acordo com Oliveira-Júnior et al. (2017). Para as demais amostras foi usado o reagente Folin-Denis (FD), sintetizado pela solubilização de 5 g de tungstato de sódio e 1 g de ácido fosfomolibdico em 38 mL de água ultrapura e 2,5 mL de ácido fosfórico. Após 2 horas sob refluxo, a solução foi resfriada e diluída para 50 mL com água ultrapura (Magalhães e Santos, 2020a).

A 20 µL de extrato foram adicionados 3,18 mL de água ultrapura, 200 µL de reagente Folin e, após 5 minutos, 600 µL de solução aquosa de carbonato de sódio, 20% (m v⁻¹) para FC e 7,5% (m v⁻¹) para FD, agitando ao final. Após duas horas de repouso no escuro e à temperatura ambiente, as absorvâncias foram mensuradas em espectrofotômetro UV-Vis (modelo SP-22, Biospectro, Brasil), em 765 nm para FC e 760 nm para FD. Os resultados foram calculados usando a curva de calibração de ácido gálico (0-10 mg L⁻¹) e expressos como miligrama equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de farinha. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.5.2. Teor total de flavonoides

O teor de flavonoides totais dos extratos de farinhas integrais foi determinado usando método colorimétrico de complexação metálica. Para as amostras de farinha de linhaça, gergelim e quinoa foi empregado o método de Santos et al. (2017) com adaptações. A 100 µL de extrato foi adicionado 2,4 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio hidratado 2% (m v⁻¹) e 1,5 mL de metanol. Após 30 min, a absorvância foi medida em 415 nm em espectrofotômetro UV-Vis (SP-22, Biospectro, Brasil). Os resultados foram calculados usando a curva de calibração de quercetina (0-10 mg L⁻¹) e expressos como miligrama equivalente de quercetina (EQ) por grama de farinha. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para as amostras de farinha de amaranto e chia foi empregado o nitrito de sódio para melhorar a sensibilidade. A 50 µL de extrato foi adicionado 1,8 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio hidratado 2% ($m v^{-1}$), após 5 minutos 50 µL de solução aquosa de nitrito de sódio 5% ($m v^{-1}$) e 1,1 mL de água ultrapura, agitando ao final. Após 60 min as absorvâncias foram mensuradas em 415 nm em espectrofotômetro UV-Vis (SP-22, Biospectro, Brasil). Os resultados foram calculados usando a curva de calibração de quercetina (0-10 mg L⁻¹) e expressos em miligrama equivalente de quercetina por grama de farinha.

4.5.3. Teor total de taninos

Para determinar o teor de taninos totais, Sugiharto, Yudiarti e Isroli (2016) empregaram metodologia similar à utilizada para o teor de compostos fenólicos totais, mantendo iguais os volumes de reagentes, mas substituindo o reagente Folin-Ciocalteu pelo Folin-Denis, utilizando ácido tânico como padrão de referência e comprimento de onda adequado (760 nm). Neste estudo a determinação de taninos totais nas amostras de farinha de chia também foi realizada de forma similar à metodologia para compostos fenólicos totais, empregando o reagente Folin-Denis e como padrão o ácido tânico.

A 20 µL de extrato de farinha de chia foram adicionados 3,18 mL de água ultrapura, 200 µL de reagente Folin-Denis e, após 5 minutos, 600 µL de solução aquosa de carbonato de sódio 7,5% ($m v^{-1}$), agitando ao final. Após duas horas de repouso no escuro e à temperatura ambiente, a absorvância foi mensurada usando espectrofotômetro UV-Vis (modelo SP-22, Biospectro, Brasil) no comprimento de onda de 760 nm. Os resultados foram calculados usando a curva de calibração de ácido tânico (0-10 mg L⁻¹) e expressos em miligrama equivalente de ácido tânico (EAT) por grama de farinha.

4.5.4. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada através de ensaios *in vitro* de capacidade de captura de radicais livres DPPH[•] (Rufino et al., 2007a) e ABTS^{•+} (Rufino et al., 2007b). Para fins comparativos, a atividade antioxidante foi

expressa como porcentagem de eficiência da inibição dos radicais livres, calculada como: $[(\text{ABS branco} - \text{ABS amostra}) / \text{ABS branco}] \times 100$.

Em ambiente escuro foi adicionado 100 μL de extrato a 3,9 mL de solução metanólica de DPPH \cdot 0,06 mM (preparada no dia da análise), agitando ao final. Após o tempo estabelecido em teste de cinética, as absorvâncias foram mensuradas em 515 nm em espectrofotômetro UV-Vis (SP-22, Biospectro, Brasil).

O radical ABTS $^{+\cdot}$ foi preparado pela reação de 5 mL de solução aquosa estoque de ABTS (7 mM) com 88 μL de solução aquosa de persulfato de potássio (140 mM), mantida em ambiente escuro a temperatura ambiente por 16 h. As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro UV-Vis (SP-22, Biospectro, Brasil) no comprimento de onda de 734 nm. 1 mL da solução do radical ABTS $^{+\cdot}$ foi diluído com etanol até a absorvância de $0,70 \pm 0,05$. Foi adicionado 30 μL de extrato a 3 mL da solução diluída de ABTS $^{+\cdot}$, agitando ao final e, após 6 minutos, as absorvâncias foram mensuradas em 734 nm.

4.6. Separação/quantificação de compostos bioativos por CLAE-DAD

Foram utilizados dois sistemas de cromatografia líquida da Shimadzu (Shimadzu Scientific Instruments, Japão):

- Modelo Prominence LC-20AD, com bomba quaternária de alta pressão (LC-20AD), desgasificador (DGU-20A5), detector de arranjo de fotodiodos (SPD-M20A), amostrador automático (SIL-20A), forno de aquecimento para coluna (CTO-20A) e módulo de comunicação (CBM-20A).
- Modelo Prominence-i LC-2030C 3D Plus, com bomba quaternária de alta pressão (LC-40B XR), detector de arranjo de fotodiodos (SPD-40V), auto-amostrador (SIL-40C), forno de aquecimento para coluna (CTO-40C) e módulo de comunicação (CBM-40Life).

A aquisição e o tratamento de dados foram realizados com o programa LCSolutions (Shimadzu Scientific Instruments, Japão). Foi utilizada uma coluna C18 (5 μm , 4,0 x 250 mm) da Sigma-Aldrich (EUA).

4.6.1. Aplicação de método CLAE-DAD de referência

O método CLAE-DAD descrito por Santos et al. (2017), adotado como um método de referência, foi aplicado para a análise do perfil fenólico de farinhas integrais de linhaça marrom e dourada (*Linum usitatissimum* L.) e gergelim preto e branco (*Sesamum indicum* L.). Os extratos foram filtrados em filtro seringa de PTFE (25 mm x 0,45 µm; Whatman, Reino Unido).

A separação cromatográfica foi realizada utilizando o sistema cromatográfico Prominence LC-20AD (Shimadzu Scientific Instruments, Japão), coluna Lichrospher RP 18 (5 µm, 4,6 x 250 mm) da Agilent (Alemanha) a 40 °C, vazão constante de 1,0 mL min⁻¹ e gradiente de eluição com solução aquosa de ácido acético 1% (v v⁻¹) (A) e metanol (B) seguindo o gradiente de eluição 0-10 min: 100% A; 10-20 min: 30% A; 20-21: 25% A; 21-25: 100% A. Os cromatogramas UV foram adquiridos em diferentes comprimentos de onda (260-360 nm).

4.6.2. Otimização de método cromatográfico CLAE-DAD

Com o intuito de ampliar o número de analitos e melhorar a eficiência da separação, foi realizada a otimização do método cromatográfico. A composição da fase móvel, o gradiente de eluição, a vazão da fase móvel e temperatura da coluna foram os fatores otimizados de forma univariada no cromatógrafo Prominence LC-20AD. O método de separação foi adaptado para o cromatógrafo Prominence-i LC-2030C. A otimização foi avaliada com base nos tempos de retenção e resoluções dos picos cromatográficos obtidos pela injeção da mistura dos padrões (1,0 mg L⁻¹).

Para as análises qualitativas e quantitativas por CLAE-DAD, a identificação dos compostos se baseia em comparações de compostos desconhecidos com padrões de referência (Kafkas et al., 2018). A identificação dos compostos foi feita comparando-se os espectros e os tempos de retenção de cada pico cromatográfico com os picos de padrões de referência, injetados individualmente sob as mesmas condições cromatográficas.

O comprimento de onda selecionado para a análise de compostos fenólicos é um critério importante e geralmente varia entre 190 e 380 nm,

enquanto 280 nm é usado para a análise geral de fenólicos (Kafkas et al., 2018). Neste estudo foram determinados os comprimentos de onda de máxima absorção para cada analito, utilizados para a identificação dos picos.

Inicialmente foi realizada a tentativa de separação de 24 analitos: (+)-catequina, rutina, quercetina, kaempferol, crisina, naringenina, cloreto de pelargonidina, resveratrol, cafeína, teobromina, vanilina, siringaldeído e ácidos protocatecuico, vanílico, siringico, ferúlico, sinápico, elágico, gálico, p-cumárico, clorogênico, cafeico, ascórbico e transcinâmico. Os analitos foram selecionados a fim de garantir uma separação eficiente em um tempo de análise razoável.

A eficiência da separação foi avaliada com base nos parâmetros: resolução, fator de retenção, fator de separação e número de pratos teóricos, calculados a partir dos tempos dos picos cromatográficos obtidos na injeção da mistura dos padrões (1,0 mg L⁻¹).

A resolução (R_s) é uma medida quantitativa da qualidade da separação de dois picos adjacentes (Lanças, 2009). Este parâmetro foi calculado segundo Equação 1, onde t_{r1} e t_{r2} são tempos de retenção e W_{b1} e W_{b2} são as larguras da base de dois picos adjacentes.

$$R_s = 2 \frac{(t_{r2} - t_{r1})}{(W_{b1} + W_{b2})} \quad (\text{Eq. 1})$$

O fator de retenção (k) expressa a relação entre o número de moléculas do soluto na fase estacionária e na fase móvel e descreve a velocidade de eluição dos solutos na coluna (Cass e Degani, 2011). Este fator foi calculado pela Equação 2, onde t'_r é o tempo de retenção do analito subtraído do tempo de retenção do solvente.

$$k = \frac{t'_r}{t_r} \quad (\text{Eq. 2})$$

O fator de separação (α) indica a seletividade do método cromatográfico, em relação à separação de dois picos consecutivos (Cass e Degani, 2011). Esse fator foi calculado pela Equação 3, considerando o fator de retenção (k) dos picos adjacentes.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (\text{Eq. 3})$$

O número de pratos teóricos (N) reflete a eficiência das condições cromatográficas (Cass e Degani, 2011). Esse parâmetro foi calculado pela Equação 4, levando em consideração o tempo de retenção (t_r) e largura da base (W_b) do pico.

$$N = 16\left(\frac{t_r}{W_b}\right)^2 \quad (\text{Eq. 4})$$

4.6.3. Validação do método CLAE-DAD

Para a validação do método de separação foram avaliados nos dois sistemas de cromatografia líquida (Shimadzu Scientific Instruments, Japão) os parâmetros analíticos: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e robustez. A linearidade foi avaliada com base na ANOVA, de acordo com o coeficiente de correlação (r) das curvas analíticas e o teste F. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados com base nos parâmetros das curvas analíticas, relacionando o desvio padrão da interseção (s) e o coeficiente angular da curva (S), conforme as equações 5 e 6.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (\text{Eq. 5})$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (\text{Eq. 6})$$

Para o método CLAE-DAD descrito por Santos et al. (2017), aplicado como um método de referência, os limites foram calculados com base nos erros tipo I e II (falsos positivos e falsos negativos) (Olivieri, 2014), usando a Equação 7, onde A é a inclinação do gráfico de calibração univariado, I é o número de amostras de calibração, $s_{y/x}$ é o desvio padrão residual, \bar{c}_{cal} é a concentração média de calibração e c_i é cada um dos valores da concentração de calibração. Da mesma forma foi calculado o LQ, mas com incerteza de previsão de 10%.

$$LD = \frac{3.3s_{y/x}}{A} \sqrt{1 + \frac{\bar{c}_{cal}^2}{\sum_{i=1}^I (c_i - \bar{c}_{cal})^2}} \quad (\text{Eq. 7})$$

A precisão instrumental foi expressa como desvio padrão relativo de medidas realizadas sob as mesmas condições (repetitividade) e em dias não consecutivos (precisão intermediária). A robustez foi avaliada utilizando um planejamento fatorial completo de dois níveis (Tabela 8), em que as condições ótimas estabelecidas foram tomadas como pontos centrais, variando a composição da fase móvel (porcentagem de ácido acético) e a temperatura da coluna cromatográfica. A resposta avaliada foi obtida com a função resposta múltipla aplicada aos resultados individuais de resolução dos picos de cada analito. Os dados do planejamento foram analisados empregando o Statistica 7.0 (StatSoft, EUA).

Tabela 8: Matriz do planejamento fatorial (2^2) aplicado para a avaliação da robustez.

Experimento	Ácido acético (%)	Temperatura (°C)
1	-1 (0,9)	-1 (41)
2	+1 (1,1)	-1 (41)
3	-1 (0,9)	+1 (43)
4	+1 (1,1)	+1 (43)
5 (PC)	0 (1,0)	0 (42)
6 (PC)	0 (1,0)	0 (42)
7 (PC)	0 (1,0)	0 (42)

4.6.4. Aplicação do método CLAE-DAD otimizado

O método cromatográfico otimizado e validado neste estudo foi aplicado para a análise da composição de farinhas integrais de sementes de chia (*Salvia hispanica* L.) e de grãos de quinoa branca (*Chenopodium quinoa* W.) no cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence-i LC-2030C. A aplicabilidade do método otimizado a essas matrizes foi avaliada segundo os parâmetros analíticos seletividade e exatidão.

A seletividade foi avaliada pelo método de adição de padrão para investigar o efeito matriz. Para tanto foram comparadas as inclinações das curvas

analíticas dos padrões no solvente e na presença da matriz. A estimativa do efeito matriz (C%) foi realizada de acordo com a Equação 8, em que S_m é inclinação da curva analítica dos padrões adicionados à amostra e S_s é inclinação da curva dos padrões preparados no solvente (Cerqueira et al., 2011).

$$C\% = 100 \times \left(1 - \frac{S_m}{S_s}\right) \quad (\text{Eq. 8})$$

A exatidão foi estimada em ensaios de adição e recuperação. Optou-se pela adição de um padrão de referência em razão do grande número de analitos e do custo e limitação de padrões. Foi usado ácido gálico como padrão de referência, para as concentrações finais de 1,25, 3 e 6 mg L⁻¹. A recuperação foi calculada conforme a Equação 9, em que C_1 é a concentração na amostra adicionada, C_2 é a concentração na amostra não adicionada e C_3 é a concentração adicionada.

$$Rec = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (\text{Eq. 9})$$

Para a injeção, os extratos de farinhas integrais foram filtrados em filtro seringa de PTFE (13 mm × 0,45 μm; Whatman, Reino Unido). A separação cromatográfica foi realizada a 42 °C, utilizando um gradiente de vazão de 0,8 a 1,3 mL min⁻¹ e um gradiente de eluição com solução aquosa de ácido acético 1% (v v⁻¹) e metanol. Os cromatogramas UV foram adquiridos em diferentes comprimentos de onda (260-360 nm).

4.7. Análises multivariadas

4.7.1. Análise do perfil fenólico de farinhas de linhaça e gergelim

Mapas Auto-organizáveis de Kohonen, Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA) foram aplicados para a análise da composição das farinhas integrais de linhaça e gergelim, sendo avaliada a separação de grupos de amostras de acordo com o perfil fenólico. As análises multivariadas foram baseadas nos dados padronizados centrados na média.

Como as classes de amostras são previamente conhecidas, foi aplicado um método supervisionado, a Rede Perceptron Multicamada, para a verificação da autenticidade das amostras, sendo avaliada a correta classificação das amostras nos grupos previamente estabelecidos de acordo com o perfil fenólico. Os dados foram normalizados: 0 para farinhas de linhaça e 1 para farinhas de gergelim.

PCA e HCA foram realizados com o software Statistica 7.0 (Stat-Soft Inc., EUA). Para as redes neurais artificiais foi utilizado o software R 3.4.4. (The R Foundation, Áustria). Para HCA foram analisadas as médias das triplicatas, enquanto para os demais métodos multivariados as replicatas foram analisadas individualmente.

A rede Perceptron fornece modelos para a discriminação das farinhas de acordo com o tipo de semente. Os mapas de Kohonen e PCA indicam as variáveis responsáveis pela separação das amostras. Com HCA é avaliado o nível de similaridade das amostras.

4.7.2. Avaliação da autenticidade de farinhas de sementes de chia

Para avaliar a autenticidade de farinhas de chia foi aplicado o método PCA (Statistica 7.0, Stat-Soft Inc., EUA) aos dados da composição (concentrações de compostos bioativos determinados por CLAE-DAD) das amostras de farinha de chia comercial, produzida (autêntica) e adulterada (simulação de fraude com farinha de trigo comum, farinha e amido de milho). Os dados foram padronizados centrados na média e foram analisadas as médias das triplicatas.

4.8. Avaliação da bioacessibilidade de bioativos fenólicos e antioxidantes de farinha integral de quinoa branca

O método de simulação *in vitro* representa uma alternativa simples, barata e rápida para a avaliação da bioacessibilidade, que permite analisar a quantidade de compostos disponíveis para captação gastrointestinal (Pellegrini et al., 2018). Nesse estudo foi empregada a simulação *in vitro* da digestão para a avaliação da bioacessibilidade de compostos fenólicos e antioxidantes de farinha de quinoa

branca. O método aplicado foi baseado nas propostas de Cianciosi et al. (2020), Rodríguez-Roque et al. (2013) e Seraglio et al. (2017). Os ensaios foram realizados em triplicata com uma amostra de referência de farinha de quinoa branca e com triplicata dos brancos (sem adição da amostra).

Para a simulação da fase gástrica da digestão foi adicionado a 25 mL de água ultrapura 2,5 g de farinha de quinoa e 12,5 mg de pepsina (315 U mL^{-1}) e o pH foi ajustado para 2,0 com ácido clorídrico concentrado. A mistura foi mantida em incubadora com agitação orbital (TE-4200, Tecnal, Brasil) a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 90 rpm e após 2 horas foi retirada uma alíquota de 5 mL, que foi centrifugada (Excelsa I 2206, Fanem, Brasil) a 3500 rpm por 5 minutos.

Para a simulação da fase intestinal, aos 20 mL restantes da fase gástrica foi adicionado pancreatina (4 mg mL^{-1}) e bile (25 mg mL^{-1}) solubilizadas em 4,5 mL de água ultrapura. A mistura teve o pH ajustado para 7,0 com solução aquosa de NaHCO_3 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e foi novamente incubada a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ com agitação a 90 rpm por 2 horas. Após o período de incubação, a mistura foi centrifugada a 3500 rpm por 5 minutos.

Após cada etapa de centrifugação, os sobrenadantes foram filtrados em filtro seringa de PTFE ($25 \text{ mm} \times 0,45 \text{ }\mu\text{m}$; Whatman, Reino Unido) e armazenados sob refrigeração, enquanto os resíduos sólidos foram secos a $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufa com circulação de ar (TE-394/2, Tecnal, Brasil) e acondicionados em dessecador à vácuo.

Os resíduos secos foram pesados (0,2 g) e submetidos à extração com solução de metanol e acetona (8:2) acidificada e ressolubilizados em metanol grau HPLC, conforme descrito na seção 4.3.3, filtrados em filtro seringa de PTFE e armazenados a -20°C . Da mesma forma, em triplicata, a amostra de referência de farinha de quinoa branca foi submetida ao processo de extração.

Os extratos da amostra de farinha de quinoa, os sobrenadantes e extratos dos resíduos das fases gástrica e intestinal, e os brancos da simulação da digestão foram analisados por CLAE-DAD para a determinação do perfil fenólico e por espectrofotometria para a avaliação da atividade antioxidante e a quantificação dos teores totais de compostos fenólicos e flavonoides.

4.9. Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi avaliada através da Concentração Inibitória Mínima (CIM), determinada em ensaios de microdiluição sucessiva em placas de 96 poços, e para avaliar se a atividade observada é microbiostática ou microbicida, foi inoculado em meio de cultura sólido em placas de Petri (Santos et al., 2018). Para estes ensaios, o extrato seco foi dissolvido em DMSO 20% (v v⁻¹) para a concentração de 8000 µg mL⁻¹. Após a diluição em série, a concentração do extrato variou de 15,625 a 2000 µg mL⁻¹.

A microdiluição utiliza placas com 96 poços e em cada placa é usado um controle negativo (água, meio de cultura e diluente do extrato), um controle de crescimento (água, meio de cultura, diluente do extrato e inóculo) e um controle positivo (água, meio de cultura, inóculo, diluente do extrato e antibiótico específico para cada microrganismo). O extrato é adicionado nos primeiros poços e a partir deles são feitas as diluições seriadas e em seguida coloca-se o inóculo em cada poço. No método de difusão o microrganismo é colocado junto com uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e observa-se o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo. As condições de incubação recomendadas são temperatura de 35-37 °C para bactérias durante 24 a 48 horas (Ostrosky et al., 2008).

Foi testada a atividade antibacteriana dos extratos de farinha integral de sementes de chia e de farinha integral de grãos de quinoa branca. O caldo nutriente (Acumedia, EUA) foi utilizado como meio de cultura para o crescimento das bactérias *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Foram utilizados como controle positivo benzilpenicilina (100 µg mL⁻¹) e geramicina (200 µg mL⁻¹), respectivamente. Como controle negativo foi usado DMSO 20% (v v⁻¹). As placas de 96 poços foram mantidas a 36 °C por 24 horas em estufa incubadora (Q316M2, Quimis, Brasil) para o crescimento de bactérias. A CIM foi avaliada pela ausência de turbidez nos poços. Dos poços que não apresentaram turbidez foi retirado aproximadamente 10 µL, inoculado em caldo nutriente sólido em placas de Petri, incubadas a 37 °C por 24 horas, para avaliar se a atividade do extrato é bacteriostática ou bactericida. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extração de compostos fenólicos

5.1.1. Otimização do processo de extração de fenólicos

O planejamento de misturas simplex-centroide indicou que, entre os solventes testados, a condição de máxima extração foi obtida com a mistura de metanol e acetona (Figura 14). Tendo em vista que foi obtido um modelo com $R^2 = 0,6254$, optou-se por avaliar separadamente as proporções de metanol e acetona (Figura 15) para definir a composição adequada do solvente para a máxima extração de compostos fenólicos.

Figura 14: Superfície de resposta do planejamento de misturas simplex-centroide.

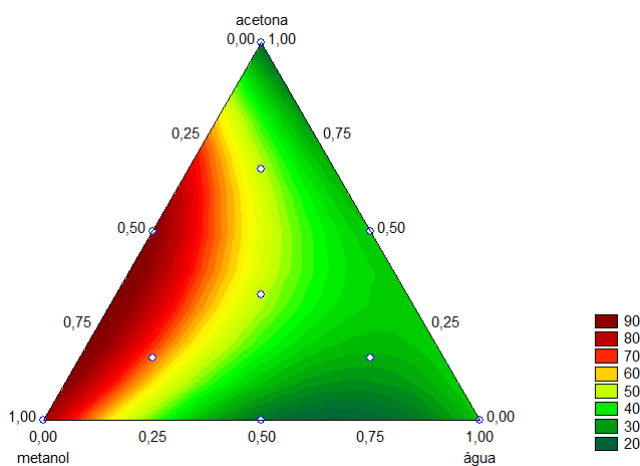
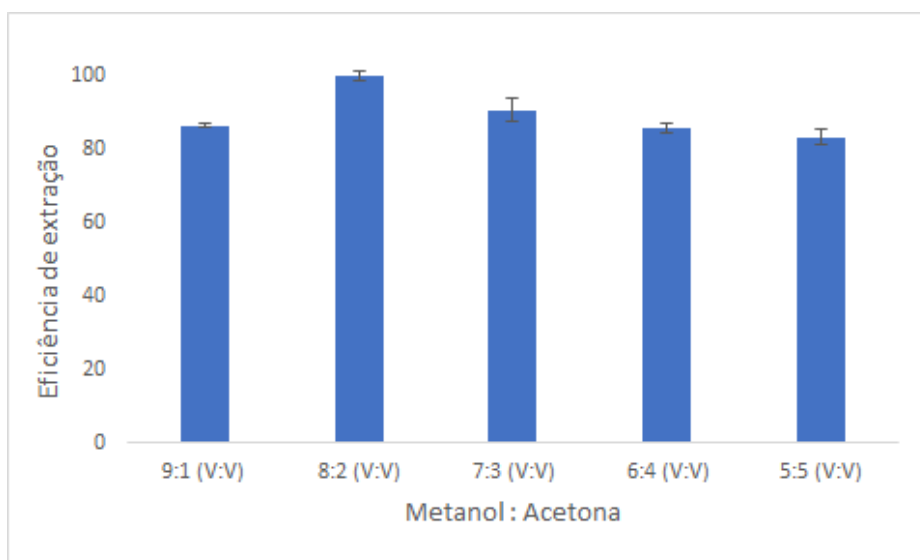


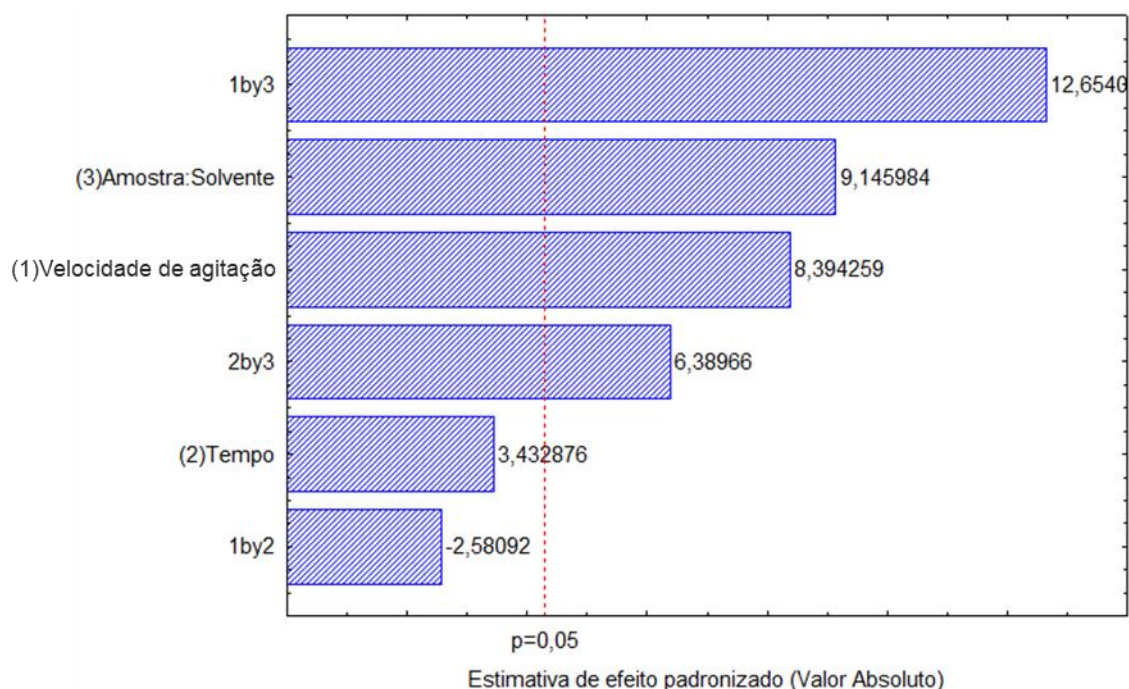
Figura 15: Eficiência de extração (%) variando a proporção de metanol e acetona.



Foi verificada a maior eficiência de extração de compostos fenólicos com a solução de metanol e acetona na proporção de 8:2 (v v⁻¹), sendo esta condição estabelecida para o solvente extrator e então aplicado o planejamento fatorial completo 2³.

Avaliando o gráfico de Pareto (Figura 16) gerado indica-se que, para o nível de confiança de 95%, as variáveis razão amostra:solvente e velocidade de agitação (rotação), bem como a interação entre elas, foram estatisticamente significativas. A interação entre as variáveis razão amostra:solvente e tempo de extração também foi significativa. Em razão disto, todas as variáveis foram estudadas na fase de otimização. Os valores positivos dos efeitos no gráfico de Pareto indicam que, dentro do domínio experimental estudado, a resposta (eficiência da extração) aumenta com o aumento dessas variáveis. Com base nesta observação, o domínio experimental foi modificado para otimização.

Figura 16: Gráfico de Pareto para a avaliação da significância das variáveis do método de extração.

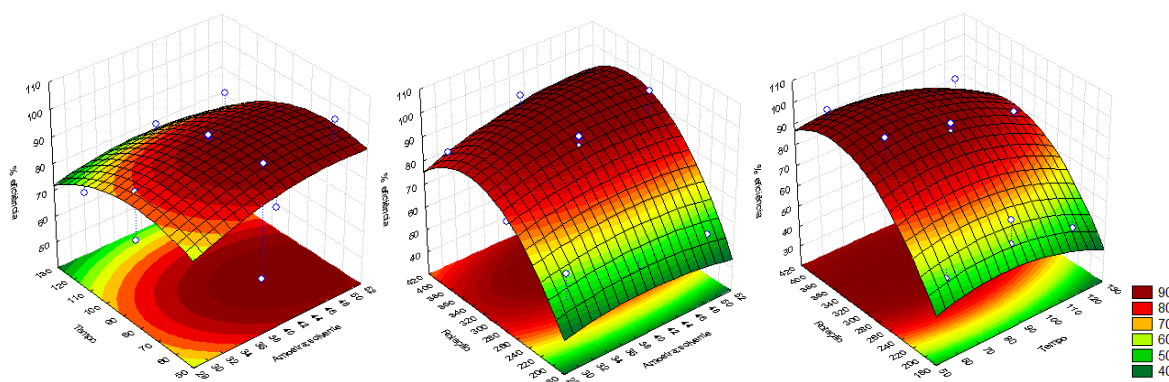


Os dados do planejamento Box Behnken foram processados utilizando os valores reais, gerando o modelo quadrático (Equação 10) que é representado pelas superfícies de resposta (Figura 17), em que se observa condição de máximo.

Os valores críticos (pontos estacionários de máximo) são: 75,40 minutos, 347,39 rpm e razão amostra:solvente 1:89,51.

$$\begin{aligned} \text{Resposta} = & 75,512 + 2,842*(\text{amostra:solvente}) - 4,675*(\text{tempo}) + \\ & 15,917*(\text{rotação}) + 1,494*(\text{amostra:solvente})^2 + 2,402*(\text{tempo})^2 + \\ & 8,397*(\text{rotação})^2 - 1,462*(\text{amostra:solvente})*(\text{tempo}) + \\ & 2,783*(\text{amostra:solvente})*(\text{rotação}) - 1,334*(\text{tempo})*(\text{rotação}) \end{aligned} \quad \text{Eq. 10}$$

Figura 17: Superfícies de resposta do planejamento Box Behnken.



A Análise de Variância (ANOVA) indicou que não há falta de ajuste; foram obtidos baixos erro puro e resíduos, regressão significativa e elevado coeficiente de determinação ($R^2 = 0,8721$), demonstrando que existe uma boa concordância entre os valores reais e previsto pelo modelo. Desta forma, o modelo descreveu bem a região estudada e pode ser usado para inferir conclusões sobre a região ótima.

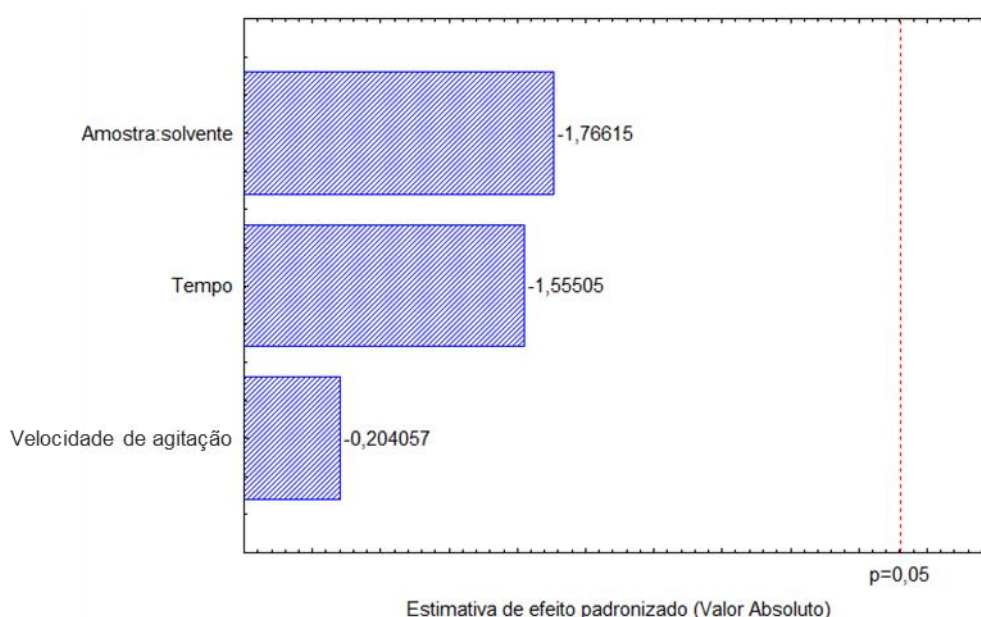
5.1.2. Validação do método de extração

No estudo da precisão, avaliada pelo desvio padrão relativo do teor de fenólicos de 10 extratos independentes de uma mesma amostra de farinha de linhaça dourada, foi obtido o valor de 4,63%, demonstrando que o método é preciso. A exatidão foi estimada em ensaios de recuperação. Para a adição de 65, 100 e 130 mg L⁻¹ de ácido gálico à amostra de farinha integral, foram obtidas porcentagens de recuperação de 106 ± 3 , 104 ± 5 e 88 ± 8 , respectivamente. Os valores obtidos para a recuperação estão dentro da faixa aceitável, indicando a exatidão do método.

A eficiência de extração do método foi avaliada em etapas sucessivas. Após a filtração no final da primeira etapa de extração, o resíduo da massa de amostra foi coletado e novamente submetido ao processo de extração sob as mesmas condições. A partir do conteúdo fenólico total extraído em duas etapas, a primeira etapa foi responsável pela extração de mais de 98% dos compostos fenólicos e o segundo por somente 1,55% dos compostos. Portanto, uma única etapa de extração é eficiente para o método proposto.

A robustez foi avaliada empregando um planejamento fatorial fracionário de dois níveis (2^{3-1}), estabelecendo como ponto central a condição ótima e variando 10% em torno do valor ótimo para cada uma das variáveis. O gráfico de Pareto gerado (Figura 18) indicou que nenhuma das variáveis foi estatisticamente significativa para o nível de confiança de 95%, evidenciando que o método de extração é robusto à variação de 10% na velocidade de agitação, no tempo de extração e na razão amostra:solvente.

Figura 18: Gráfico de Pareto da avaliação da robustez do método de extração.



5.2. Prospecção fitoquímica qualitativa

As plantas produzem diversificados grupos de moléculas classificadas como metabólitos secundários, que são substâncias sintetizadas durante o desenvolvimento normal da planta e em resposta a diferentes situações de estresse, como exposição à radiação UV, ferimentos, ataque de insetos, infecção,

entre outros (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Os metabólitos secundários desempenham vários papéis fisiológicos e ecológicos (contra microrganismos e insetos nocivos), além de benefícios à saúde humana, exibindo atividades como antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética, anticâncer, antimicrobiana, entre outras (Lin et al., 2019). Os resultados da prospecção fitoquímica por CCD dos extratos de farinhas integrais estão organizados na Tabela 9.

Tabela 9: Resultado da prospecção fitoquímica qualitativa de extratos de farinhas integrais.

Classe de Metabólito	Linhaça dourada	Linhaça marrom	Gergelim preto	Gergelim branco	Amaranto	Quinoa	Chia
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-
Antocianinas	+	+	+	+++	+	+	+
Antraquinonas	++	++	++	++	+	++	+++
Compostos fenólicos	++	++	++	++	+	++	+++
Cumarinas	+	+	+	+	+	+	+
Derivados antracênicos	+	+	-	-	-	+	++
Lignanas	+++	++	++	++	-	+	++
Mono, sesqui e diterpenos	+	+	+	++	-	+	+
Naftoquinonas	-	-	-	-	-	+	++
Saponinas	+	+	+	+	+	++	++
Taninos condensados	++	+	+	++	++	+	+
Taninos hidrolisáveis	+	+	+	+	+	+	+
Triterpenos e esteroides	+++	+++	+++	+++	+	+	++
Xantinas	-	-	-	-	-	+	+

(-): negativo; (+): fracamente positivo; (++) : moderadamente positivo; (+++): fortemente positivo.

Os extratos de farinhas de linhaça apresentaram reação negativa para alcaloides, naftoquinonas e xantinas. A reação foi positiva para a presença de compostos fenólicos, lignanas, taninos, antocianinas, saponinas, cumarinas, antraquinonas, derivados antracênicos, mono-, sesqui- e diterpenos, e triterpenos e esteroides. É relatado que os principais componentes da linhaça são lignanas, flavonoides, ácidos fenólicos (Corbin et al., 2015) e taninos (Kasote, 2013; Imran et al., 2014) e o óleo de linhaça é rico em terpenos (Ivanova-Petropulos et al., 2015).

Para os extratos de farinhas de gergelim foi indicada ausência de alcaloides, naftoquinonas, derivados antracênicos e xantinas. A reação foi positiva para a presença de compostos fenólicos, lignanas, taninos, antocianinas, saponinas, cumarinas, antraquinonas, mono-, sesqui- e diterpenos, e triterpenos e esteroides. É sabido que o gergelim contém lignanas, compostos fenólicos, flavonoides, saponinas (Khademian et al., 2019), antraquinonas (Furumoto e Nishimoto, 2016), taninos (Jimoh, Fagbenro e Adeparusi, 2011) e seu óleo é rico em terpenos (Ivanova-Petropulos et al., 2015).

Para a farinha de amaranto branco houve reação positiva apenas para a presença de antocianinas, antraquinonas, compostos fenólicos, cumarinas, saponinas, taninos condensados e hidrolisáveis, triterpenos e esteroides. Estudos realizados com diferentes variedades de amaranto apontam que os grãos são ricos em compostos fenólicos (Peiretti et al., 2017; Paucar-Menacho et al., 2018; Karamac et al., 2019), saponinas (Zehring et al., 2015; Tang e Tsao, 2017) e taninos (Kunyanga et al., 2011; Olawoye e Gbadamosi, 2017), além de conter antocianinas (Paško et al., 2009; Meas, Luengwilai e Thongket, 2020), cumarinas (Castrillón-Arbeláez e Frier, 2016), triterpenos e esteroides (Venskutonis e Kraujalis, 2013; Vélez-Jiménez et al., 2014).

Os extratos de farinhas de quinoa e de chia apresentaram reação negativa apenas para alcaloides e houve reação positiva para as demais classes de metabólitos secundários testadas por CCD: antocianinas, antraquinonas, compostos fenólicos, cumarinas, derivados antracênicos, lignanas, mono-, sesqui- e diterpenos, naftoquinonas, saponinas, taninos condensados, taninos hidrolisáveis, triterpenos e esteroides, e xantinas.

Entre os extratos testados na prospecção fitoquímica por CCD, para as farinhas de quinoa branca e de chia houve reação positiva para a maioria das classes de metabólitos secundários avaliadas. Por esse motivo, a análise fitoquímica para glicosídeos cardiotônicos, realizada em tubo de ensaio, foi realizada apenas com os extratos de farinhas de chia e de quinoa, para os quais não houve reação, indicando a ausência desses compostos.

A quinoa é conhecida por ser rica em polifenóis (Gómez-Caravaca et al., 2012; Carciochi, D'Alessandro e Manrique, 2016; Han et al., 2019). Também são fitoquímicos conhecidos dos grãos de quinoa: lignanas (Smeds et al., 2007), taninos (Saad-Allah e Youssefet al., 2018), saponinas (Tang et al., 2015), antocianinas (Rocchetti et al., 2017a), triterpenos (Tang e Tsao, 2017) e glicosídeos triterpenoides (Verza et al., 2012), mono- e sesquiterpenos, esteroides C27, C28 e C29 (Lin et al., 2019), fitoecdisteroides (Navruz-Varli e Sanlier, 2016) e betaxantinas (Tang et al., 2015; Escribano et al., 2017). As betaxantinas contêm anéis heterocíclicos de nitrogênio em suas estruturas, assim como as xantinas, o que pode explicar a reação positiva para xantinas.

As sementes de chia são conhecidas por serem ricas em compostos fenólicos, especialmente ácidos fenólicos e flavonoides (Falco et al., 2017; Falco e Lanzotti, 2018), além de conter taninos (Silva et al., 2017b), saponinas (Kaur e Bains, 2020), lignanas (Ayerza, 2013) e fitoesteróis (Falco et al., 2017). Wimberley, Cahill e Atamian (2020) relatam a presença de monoterpenos e sesquiterpenos no óleo de folha de chia. Em outras espécies de *Salvia* foi descrita a presença de antocianinas (Suzuki et al. 2004; Veitch e Grayer, 2011), quinonas (Bisio et al., 2019) e triterpenos (Passannanti, Paternostro e Piozzi, 1983; Hung, Thuong e Tung, 2019). Destaca-se que a redescoberta da chia é relativamente recente e seu perfil fitoquímico ainda não é vastamente conhecido, ressaltando a contribuição deste estudo para o entendimento da composição fitoquímica da chia.

Essas análises demonstram que as farinhas integrais testadas apresentam ampla variedade de metabólitos secundários, que possuem diferentes propriedades, que podem justificar os efeitos à saúde relacionados ao consumo destas farinhas, e aplicabilidades diversas, como alimentícia, farmacológica e bioquímica.

Os compostos fenólicos são bem conhecidos pelas diversas propriedades benéficas à saúde, como antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, anticâncer, cardioprotetor, vasodilatador, neuroprotetor, entre outras (Barros et al., 2013; Kabera et al., 2014). As antocianinas possuem propriedades antioxidante, anti-inflamatória e anticâncer, além de prevenir doenças cardiovasculares e atuar no controle da obesidade e do diabetes (He e Giusti, 2010). Atividades antioxidante (Cong-Cong et al., 2017), anti-inflamatória, antimicrobiana (Kabera et al., 2014) e anticâncer e efeito cardioprotetor são relacionados aos taninos (Soares et al., 2015). As lignanas possuem propriedades antioxidante, anti-inflamatório e anticâncer (Cong-Cong et al., 2017) e evidências apontam que compostos derivados de lignanas atuam como protetores contra doenças crônicas (Landete, 2012).

Os terpenos exibem atividades antioxidante e antimicrobiana (Negri et al., 2014). São conhecidos monoterpenos com atividades analgésica e anti-inflamatória, diterpenos com atividades anti-hipertensiva e anticâncer e triterpenos, os terpenos vegetais mais abundantes, com atividade anti-inflamatória (Kashani et al., 2012). Os triterpenos são componentes de compostos bioativos de diferentes classes, como esteroides e saponinas (Ahmed et al., 2017). As saponinas apresentam propriedades inseticidas, antibióticas e fungicidas e são potenciais agentes quimioterapêuticos (Negri et al., 2014). Foram relatados esteroides com atividades antioxidante, inseticida e anti-inflamatória, além de efeito neuroprotetor (Lin et al., 2019).

As cumarinas são amplamente distribuídas nas plantas e suas aplicações farmacológicas, bioquímicas e terapêuticas dependem dos padrões de substituição específicos (Negri et al., 2014), sendo relatadas atividades como antioxidante, anti-inflamatório, anticoagulante, antibacteriano, antifúngico, antiviral, antitumoral e neuroprotetor (Venugopala, Rashmi e Odhav, 2013).

As quinonas exibem atividades como antioxidante, antibacteriana e antitumoral (Eyong, Kuete e Efferth, 2013). A maioria das plantas que contém quinonas são usadas de forma terapêutica por sua atividade laxante (Darroz et al., 2014). As propriedades das antraquinonas e seus derivados têm atraído a atenção nas áreas farmacêutica (atividades biológicas), alimentar (corantes naturais) e têxtil (tingimento de roupas) (Fouillaud et al., 2016). As antraquinonas

possuem propriedades antifúngica (Eyong, Kuete e Efferth, 2013), antimicrobiana e anti-inflamatória (El-Najjar et al., 2011). Plantas que contêm derivados antracênicos, como antraquinonas, são usadas desde a antiguidade para tratar constipação e apresentam potencial anticâncer (Badria e Ibrahim, 2013).

Alcaloides são compostos que contêm anel heterocíclico de nitrogênio, divididos em vários subgrupos, entre eles os alcaloides metilxantinas, que apresentam efeitos neurológicos e estimulantes (Ghaffar e Javad, 2018). As xantinas apresentam propriedades farmacológicas, como relaxante muscular, estimulante do sistema nervoso central e promotor de diurese (Bueno, 2003).

Nesta avaliação fitoquímica foi indicada a presença de alguns metabólitos secundários para os quais não foram encontrados na literatura estudos relatando sua existência nas respectivas espécies. Por outro lado, a prospecção fitoquímica deste estudo indicou a ausência de metabólitos já relatados nessas espécies de plantas, como a ausência de alcaloides em todas as amostras, mas estes compostos já foram identificados em sementes de chia (Kaur e Bains, 2020) e em grãos de quinoa (Saad-Allah e Youssef, 2018) e de amaranto de diferentes variedades (Castrillón-Arbeláez e Frier, 2016).

Cabe destacar que o método de avaliação fitoquímica aplicado é qualitativo. Além disso, a produção de metabólitos secundários é uma resposta a condições de estresse à planta, podendo ser influenciada por diferentes fatores (Gobbo-Neto e Lopes, 2007) em um processo adaptativo que afeta sua composição fitoquímica (Ribeiro et al., 2019), sendo assim, uma amostra pode conter determinado metabólito secundário e outra não, enquanto uma mesma planta pode ter acúmulo ou ausência de determinados fitoquímicos em dado momento (Ribeiro et al., 2020). Adicionalmente, a ausência nos extratos pode estar relacionada ao método de extração e às concentrações dos metabólitos no extrato testado, e não às amostras.

5.3. Determinações espectrofotométricas de teores de compostos fenólicos e capacidade antioxidante

Diferentes métodos espectrofotométricos foram aplicados para a determinação dos teores totais de compostos fenólicos, flavonoides e taninos e da

atividade antioxidante *in vitro* de farinhas integrais de linhaça (marrom e dourada), gergelim (preto e branco), amaranto branco, quinoa branca e chia. Os resultados destes ensaios são discutidos nas seções a seguir.

5.3.1. Farinha de linhaça (*Linum usitatissimum* L.)

A Tabela 10 reúne os resultados das determinações espectrofotométricas para os extratos de farinha integral de sementes de linhaça marrom e dourada.

Tabela 10: Resultados das determinações espectrofotométricas para farinhas de linhaça marrom e dourada.

Amostra	Teor de fenólicos totais (mgEAG g ⁻¹)	Teor de flavonoides totais (mgEQ g ⁻¹)	DPPH (% inibição)	ABTS (%inibição)
YC	1,58 ± 0,01	0,08 ± 0,01	81 ± 1	29 ± 2
YB	1,76 ± 0,06	0,09 ± 0,02	76 ± 2	27 ± 2
YV	1,41 ± 0,15	0,07 ± 0,01	72 ± 1	33 ± 1
YS	2,05 ± 0,03	0,08 ± 0,02	76 ± 2	32 ± 2
YF	2,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	64 ± 1	41 ± 1
BC	1,32 ± 0,11	0,05 ± 0,01	69 ± 2	41 ± 1
BM	1,64 ± 0,20	0,05 ± 0,01	81 ± 1	41 ± 1
BV	1,12 ± 0,08	0,04 ± 0,01	67 ± 2	36 ± 1
BE	1,65 ± 0,05	0,05 ± 0,01	80 ± 1	44 ± 2
BR	1,56 ± 0,10	0,06 ± 0,02	78 ± 2	35 ± 2

Y: linhaça dourada; B: linhaça marrom. A segunda letra da sigla distingue a origem da amostra. Média ± desvio padrão.

Para o extrato de farinha de linhaça dourada, o teor total de compostos fenólicos variou entre 1,41 e 2,09 mgEAG g⁻¹, foi obtido de 0,07 a 0,09 mgEQ g⁻¹ para o teor total de flavonoides e a percentagem de inibição variou de 64 a 81% para DPPH e de 27 a 41% para ABTS. Para a farinha de linhaça marrom, foi obtido o teor de fenólicos de 1,12 para 1,65 mgEAG g⁻¹, o teor total de flavonoides

de 0,04 a 0,06 mgEQ g⁻¹ e a percentagem de inibição variou de 67 a 81% e de 35 a 44% para DPPH e ABTS, respectivamente.

Comparando os extratos de farinha de linhaça, em média, a linhaça dourada apresentou maiores teores de compostos fenólicos, enquanto para os ensaios antioxidantes, maior diferença foi observada na inibição do radical ABTS, sendo verificado que a linhaça marrom apresenta maior potencial antioxidante. Assim como verificado neste trabalho, Waszkowiak et al. (2015) relataram maior atividade antioxidante (para os métodos DPPH e ABTS) para a linhaça marrom e Tavarini et al. (2019) reportaram maiores concentrações de fenólicos totais e flavonoides totais na linhaça dourada.

Para a linhaça marrom, Li et al. (2019) obtiveram concentrações de compostos fenólicos totais (a partir de 156,29 mgEAG 100 g⁻¹) e percentuais de inibição do radical DPPH (de 63,56% a 80,46%) condizentes com os do presente estudo. Para ambas variedades de linhaça (marrom e dourada), Barroso et al. (2014) relataram concentrações muito superiores de compostos fenólicos totais, destacando que a divergência entre os resultados pode estar relacionada ao estágio de desenvolvimento da semente e/ou a diferenças relacionadas à origem.

5.3.2. Farinha de gergelim (*Sesamum indicum* L.)

Os resultados das determinações espectrofotométricas para os extratos de farinha integral de sementes de gergelim preto e branco são apresentados na Tabela 11. Os extratos de farinha de gergelim preto apresentaram maiores teores de compostos fenólicos e potencial antioxidante em comparação à farinha de gergelim branco. Para os extratos de farinha de gergelim branco o teor de compostos fenólicos variou de 1,01 para 2,20 mgEAG g⁻¹, o teor de flavonoides variou de 0,04 a 0,07 mgEQ g⁻¹, e para a atividade antioxidante foram obtidas percentagens de inibição de 71 a 90% para o radical DPPH e de 57 e 83% para o radical ABTS. Quanto aos extratos de farinha de gergelim preto, o teor de compostos fenólicos variou de 2,34 e 3,85 mgEAG g⁻¹, o teor de flavonoides variou de 0,06 a 0,07 mgEQ g⁻¹, e as percentagens de inibição do radical DPPH de 79 a 88% e de 84 a 95% para o radical ABTS.

Tabela 11: Resultados das determinações espectrofotométricas para farinhas de gergelim preto e branco.

Amostra	Teor de fenólicos totais (mgEAG g ⁻¹)	Teor de flavonoides totais (mgEQ g ⁻¹)	DPPH (% inibição)	ABTS (%inibição)
WC	1,01 ± 0,05	0,04 ± 0,01	71 ± 1	66 ± 1
WB	1,36 ± 0,03	0,05 ± 0,01	86 ± 1	73 ± 1
WV	2,20 ± 0,15	0,07 ± 0,02	90 ± 1	83 ± 1
WE	1,07 ± 0,01	0,05 ± 0,01	81 ± 1	57 ± 1
WR	1,37 ± 0,04	0,05 ± 0,01	82 ± 1	78 ± 1
NC	2,39 ± 0,13	0,06 ± 0,01	87 ± 1	94 ± 2
NN	2,72 ± 0,16	0,06 ± 0,02	79 ± 1	84 ± 2
NB	2,56 ± 0,18	0,07 ± 0,01	88 ± 1	95 ± 1
NV	2,34 ± 0,13	0,06 ± 0,01	88 ± 1	93 ± 1
NR	3,85 ± 0,20	0,07 ± 0,02	88 ± 1	95 ± 1

W: branco; N: preto. A segunda letra da sigla distingue a origem da amostra. Média ± desvio padrão.

Assim como no presente estudo, Zhou et al. (2016) e Ruslan, Happyniar e Fidrianny (2018) verificaram que o gergelim preto contém maiores teores de compostos fenólicos e flavonoides do que o gergelim branco. Em contrapartida, Vishwanath et al. (2012) observaram maiores concentrações de compostos fenólicos e flavonoides para gergelim branco do que para sementes pretas. A coloração das sementes de gergelim está associada à atividade antioxidante das sementes (Kermani et al., 2019). A atividade antioxidante é mais elevada para o gergelim preto que para o branco e é concentrada principalmente na casca da semente (Shahidi et al., 2006). O pigmento marrom da semente de gergelim preto apresenta excelente atividade antioxidante (Xu, Chen e Hu, 2005).

Ruslan, Happyniar e Fidrianny (2018) relataram que o gergelim preto possui maior atividade antioxidante (para os métodos de DPPH e ABTS) do que o gergelim branco, da mesma forma que no presente estudo. Para o extrato metanólico de sementes de gergelim, Dravie et al. (2020) obtiveram percentual de inibição de DPPH de 51,26%, valor menor do que os deste estudo, e 89,72% para

inibição de ABTS, coerente com os resultados de várias amostras do presente estudo. Vishwanath et al. (2012) obtiveram menores percentuais de inibição de DPPH do que neste estudo para gergelim preto (55,73%) e branco (61,16%). Othman et al. (2015) relataram 88% de inibição de DPPH para gergelim branco, valor coerente com os obtidos neste trabalho.

5.3.3. Farinha de amaranto (*Amaranthus* spp.)

Na Tabela 12 são apresentados os resultados das determinações espectrofotométricas para os extratos de farinha integral de grãos de amaranto branco.

Tabela 12: Resultados das determinações espectrofotométricas para farinhas de amaranto branco.

Amostra	Teor de fenólicos totais (mgEAG g ⁻¹)	Teor de flavonoides totais (mgEQ g ⁻¹)	DPPH (% inibição)	ABTS (% inibição)
AA	0,87 ± 0,02	0,06 ± 0,02	84 ± 2	10 ± 3
AB	0,86 ± 0,01	0,06 ± 0,01	90 ± 1	5 ± 1
AC	0,62 ± 0,02	0,04 ± 0,01	87 ± 1	6 ± 1
AD	0,73 ± 0,03	0,05 ± 0,01	88 ± 4	7 ± 1
AE	1,28 ± 0,03	0,16 ± 0,03	86 ± 1	6 ± 1

A: Amaranto. A segunda letra da sigla distingue a origem da amostra. Média ± desvio padrão.

Neste estudo o teor total de compostos fenólicos em farinhas de amaranto branco variou de 0,62 ± 0,02 a 1,28 ± 0,03 mg EAG g⁻¹. Karamac et al. (2019) quantificaram em grãos de amaranto branco 0,88 ± 0,07 mg GAE/g, concentração próxima às obtidas para duas das amostras de farinha de amaranto deste estudo. Asao e Watanabe (2010) obtiveram 0,51 mg GAE/g de farinha de amaranto, concentração inferior ao observado para as amostras analisadas neste trabalho. Li et al. (2015) quantificaram em grãos de amaranto *caudatus* 1,55 ± 0,06 mg GAE/g, concentração superior ao verificado nas farinhas de amaranto deste estudo.

O teor total de flavonoides nas amostras de farinhas de amaranto branco variou de $0,04 \pm 0,01$ a $0,16 \pm 0,03$ mg EQ g⁻¹. Li et al. (2015) quantificaram em grãos de amaranto *caudatus* $0,53 \pm 0,06$ miligrama equivalente de catequina por grama de peso seco, concentração superior ao verificado nas farinhas de amaranto deste estudo.

A atividade antioxidante do amaranto foi avaliada em vários estudos (Karamac et al., 2019; Tang e Tsao, 2017; Alvarez-Jubete et al., 2010; Nsimba, Kikuzaki e Konishi, 2008). Neste estudo foram obtidas porcentagens de inibição do radical DPPH de 84 a 90, indicando a elevada capacidade antioxidante da farinha de amaranto branco e confirmando o elevado teor de antioxidantes no grão de amaranto. Entretanto, para o ensaio de inibição do radical ABTS o percentual de inibição variou de 5 a 10%.

Cabe destacar que cada método de avaliação da atividade antioxidante *in vitro* se baseia em mecanismos e fontes de radicais diferentes, o que dificulta a comparação (Haminiuk et al., 2012). Além disso, a estereoseletividade dos radicais afeta a capacidade do extrato de reagir e extinguir diferentes radicais (Gorinstein et al., 2007).

As diferenças destacadas também podem ser atribuídas à origem geográfica, ao tipo de solo, ao estresse hídrico, às condições fisiopatológicas (Zielinski et al., 2014; Fotakis et al., 2016), ambientais e sazonais durante o desenvolvimento da planta, que afetam o perfil fitoquímico e, conseqüentemente, as atividades biológicas, como antioxidante (Ribeiro et al., 2020). As condições de fabricação adotadas pelas empresas também podem contribuir para a variabilidade do perfil fenólico, como armazenamento e tratamentos tecnológicos (Dias et al., 2013).

5.3.4. Farinha de quinoa (*Chenopodium quinoa* W.)

Os resultados das determinações espectrofotométricas para os extratos de farinha integral de grãos de quinoa branca são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Resultados das determinações espectrofotométricas para farinhas de quinoa branca.

Amostra	Teor de fenólicos totais (mgEAG g ⁻¹)	Teor de flavonoides totais (mgEQ g ⁻¹)	DPPH (% inibição)	ABTS (% inibição)
QA	2,95 ± 0,04	0,52 ± 0,10	83 ± 2	26 ± 2
QB	1,79 ± 0,19	0,41 ± 0,08	79 ± 1	6 ± 1
QC	2,31 ± 0,09	0,34 ± 0,01	78 ± 2	9 ± 1
QD	2,66 ± 0,14	0,48 ± 0,02	82 ± 1	13 ± 1
QE	2,60 ± 0,11	0,47 ± 0,01	81 ± 2	17 ± 1

Q: quinoa. A segunda letra da sigla distingue a origem da amostra. Média ± desvio padrão.

O teor de compostos fenólicos totais variou de 1,79 a 2,95 mgEAG g⁻¹. Essas concentrações são superiores às verificadas em estudos de grãos de quinoa: 0,40 ± 0,01 mgEAG g⁻¹ (Carciochi, D'Alessandro e Manrique, 2016); 0,60 ± 0,05 mgEAG g⁻¹ (Gorinstein et al., 2007); 0,72 ± 0,06 mgEAG g⁻¹ (Alvarez-Jubete et al., 2010). Asao e Watanabe (2010) obtiveram o teor de 1,11 mgEAG g⁻¹ para farinha de quinoa, concentração também inferior às observadas neste estudo.

O teor de flavonoides totais variou de 0,34 a 0,52 mgEQ g⁻¹. Essas concentrações inferiores ao determinado por Gorinstein et al. (2007) (1,02 ± 0,11 mg equivalente de catequina por grama de peso seco) e superiores ao verificado por Carciochi, D'Alessandro e Manrique (2016) (0,11 ± 0,003 mgEQ g⁻¹) em grãos de quinoa.

Mesmo se tratando da mesma espécie, a variação do conteúdo fenólico é esperada, uma vez que a produção dos compostos fenólicos é modulada em resposta a situações de estresse e para a adaptação às condições ambientais (Ribeiro et al., 2019). Portanto, a síntese dos compostos fenólicos pode ser influenciada por diferentes fatores, bióticos e abióticos (Călinoiu e Vodnar, 2018).

Em relação à atividade antioxidante, a porcentagem de eficiência da inibição dos radicais livres variou muito em relação ao método. Pelo método DPPH a variação foi de 78 a 83%. Pelo método ABTS a porcentagem de inibição variou de 6 a 26%. A diferença entre os resultados dos métodos aplicados

possivelmente se deve à estereoseletividade dos radicais, que afeta a capacidade do extrato de reagir e extinguir radicais diferentes (Gorinstein et al., 2007).

Diversos estudos indicaram as propriedades antioxidantes da quinoa (Alvarez-Jubete et al., 2010; Asao e Watanabe, 2010; Fischer et al., 2013; Tang et al., 2015; Carciochi, D'Alessandro e Manrique, 2016; Navruz-Varli e Sanlier, 2016; Escribano et al., 2017; Han et al., 2019) e estimaram o potencial antioxidante empregando diversos métodos. Em estudos de grãos de quinoa, Gorinstein et al. (2007) obtiveram 30% de inibição de DPPH^{*}, inferior ao observado neste estudo, e 5,7% de inibição de ABTS^{**}, percentual próximo ao obtido para uma das amostras analisadas neste trabalho.

As diferenças observadas no conteúdo fenólico e na atividade antioxidante entre as amostras analisadas podem estar associadas a diversos fatores, como: composição do solo, estratégias agronômicas, condições ambientais e sazonais durante o desenvolvimento da planta, origem geográfica e condições fisiopatológicas da planta (Haminiuk et al., 2012; Zielinski et al., 2014). Por se tratarem de amostras comerciais, tratamentos tecnológicos e condições de armazenamento também podem contribuir para a variabilidade dos resultados (Dias et al., 2013).

Quanto às diferenças entre os resultados obtidos neste trabalho e em outros estudos, além dos mencionados fatores bióticos e abióticos associados à amostra, deve-se levar em consideração que a disparidade entre os resultados de diferentes estudos também está relacionada à variabilidade nas condições experimentais entre os métodos utilizados (Alvarez-Jubete et al., 2010).

5.3.5. Farinha de chia (*Salvia hispanica* L.)

Os resultados das determinações espectrofotométricas para os extratos de farinha integral de sementes de chia são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Resultados das determinações espectrofotométricas para farinhas de chia.

	Amostra	Fenólicos totais (mgEAG g ⁻¹)	Flavonoides totais (mgEQ g ⁻¹)	Taninos totais (mgEAT g ⁻¹)	DPPH (% inibição)	ABTS (% inibição)
Farinha comercial	CA	5,43 ± 0,10	3,81 ± 0,40	4,44 ± 0,01	93 ± 0,1	90 ± 0,4
	CB	5,89 ± 0,09	5,45 ± 0,03	4,75 ± 0,03	89 ± 0,6	90 ± 0,5
	CC	5,64 ± 0,06	3,46 ± 0,08	4,94 ± 0,03	93 ± 0,2	92 ± 1,1
	CD	5,51 ± 0,02	3,09 ± 0,06	4,00 ± 0,02	93 ± 0,1	93 ± 0,7
	CE	4,72 ± 0,29	2,78 ± 0,08	3,62 ± 0,03	91 ± 0,7	86 ± 1,2
	CF	5,42 ± 0,07	4,31 ± 0,10	4,03 ± 0,02	92 ± 0,5	84 ± 2,3
	CG	5,00 ± 0,05	3,81 ± 0,15	3,65 ± 0,07	92 ± 0,4	82 ± 1,4
	CH	5,15 ± 0,01	3,30 ± 0,13	3,82 ± 0,04	92 ± 0,5	88 ± 1,7
	CI	5,30 ± 0,32	4,68 ± 0,07	3,90 ± 0,20	91 ± 0,3	89 ± 1,2
	CJ	5,16 ± 0,08	4,32 ± 0,19	4,10 ± 0,04	93 ± 0,4	89 ± 0,6
Farinha produzida	CK	4,10 ± 0,07	3,30 ± 0,15	2,43 ± 0,03	82 ± 0,9	64 ± 2,3
	CL	4,57 ± 0,06	3,96 ± 0,09	2,90 ± 0,26	93 ± 0,5	88 ± 1,3
	CM	5,52 ± 0,05	4,67 ± 0,09	4,30 ± 0,07	89 ± 2,3	89 ± 0,8
	CN	5,84 ± 0,17	5,04 ± 0,08	3,94 ± 0,04	92 ± 0,6	85 ± 2,4
	CO	5,46 ± 0,30	5,29 ± 0,14	3,86 ± 0,03	92 ± 0,1	93 ± 0,7
	CP	5,46 ± 0,07	4,89 ± 0,07	3,93 ± 0,19	93 ± 0,2	91 ± 0,7
	CR	4,44 ± 0,20	3,68 ± 0,19	2,99 ± 0,01	93 ± 0,6	83 ± 1,7
	CS	4,15 ± 0,17	3,29 ± 0,12	2,66 ± 0,02	84 ± 0,4	51 ± 0,3
	CT	4,21 ± 0,07	3,82 ± 0,15	3,30 ± 0,05	91 ± 0,7	87 ± 1,4
	CV	4,27 ± 0,06	3,42 ± 0,18	2,38 ± 0,02	84 ± 0,7	87 ± 0,7
	CX (branca)	4,54 ± 0,04	4,27 ± 0,15	3,79 ± 0,04	94 ± 0,3	75 ± 2,0
	CY (preta)	4,57 ± 0,10	4,50 ± 0,04	4,03 ± 0,06	93 ± 0,2	81 ± 0,8

C: chia. A segunda letra da sigla distingue a origem da amostra. Média ± desvio padrão.

O teor de compostos fenólicos totais variou de 4,72 a 5,89 mgEAG g⁻¹ nas amostras de farinha comercial de chia. Para as farinhas produzidas das sementes de chia, o teor de fenólicos totais variou de 4,10 a 5,84 mgEAG g⁻¹. Vários estudos relataram o conteúdo fenólico total de sementes de chia, tendo sido encontrados elevados teores na chia brasileira e mexicana (Kaur e Bains, 2020).

Para a farinha de chia, Costantini et al. (2014) obtiveram concentração de fenólicos totais (16,4 mgEAG g⁻¹) muito superior ao verificado neste trabalho. Coelho e Salas-Mellado (2014) determinaram 6,4 mgEAG g⁻¹ para o teor de fenólicos totais em semente de chia, valor próximo ao obtido para uma das amostras deste estudo. Silva et al. (2017b) determinaram o teor total de fenólicos de sementes de chia cultivadas em Mato Grosso e no Rio Grande do Sul, obtendo 0,97 e 0,99 mgEAG g⁻¹, respectivamente, concentrações muito inferiores ao observado neste trabalho.

Alvites-Misajel et al. (2019) avaliaram o teor total de compostos fenólicos de sementes de chia branca e preta de cultivo convencional e orgânico. Para sementes de chia preta, a de cultivo convencional apresentou 2,18 mgEAG g⁻¹, enquanto a orgânica 2,19 mgEAG g⁻¹, concentrações inferiores ao obtido para a amostra de chia preta deste estudo. As sementes de chia branca orgânica e convencional apresentaram 2,14 e 2,21 mgEAG g⁻¹, respectivamente, concentrações de fenólicos totais também inferiores às obtidas para a amostra de chia branca deste estudo.

Os flavonoides são compostos fenólicos bem conhecidos da semente de chia (Kaur e Bains, 2020), principalmente miricetina, quercetina e kaempferol (Amato et al., 2015; Falco et al., 2017). Neste trabalho o teor de flavonoides totais variou de 3,29 a 5,29 mgEQ g⁻¹ nas farinhas produzidas das sementes de chia. Para as amostras de farinha comercial, o teor de flavonoides variou de 2,78 a 5,45 mgEQ g⁻¹. Essas concentrações são superiores às verificadas em outros estudos. Para o teor total de flavonoides de farinha de chia, Costantini et al. (2014) determinaram 1,1 mg equivalente de rutina por grama. Para sementes de chia preta, Alvites-Misajel et al. (2019) obtiveram os teores de flavonoides de 1,54 mg equivalente de catequina por grama (mgEC g⁻¹) para amostras de cultivo convencional e 1,57 mgEC g⁻¹ para sementes orgânicas. Para a chia branca,

obtiveram 1,56 mgEC g⁻¹ para semente de cultivo convencional e 1,50 mgEC g⁻¹ para as orgânicas.

A presença de taninos nas sementes de chia também é conhecida (Kaur e Bains, 2020). Neste estudo o teor de taninos totais das amostras de farinhas produzidas das sementes de chia variou de 2,38 a 4,30 mgEAT g⁻¹, enquanto nas amostras de farinha comercial variou de 3,62 a 4,94 mgEAT g⁻¹. Os valores obtidos neste estudo foram inferiores aos teores de taninos determinados por Silva et al. (2017b) em sementes de chia cultivadas em Mato Grosso e no Rio Grande do Sul, para as quais foram obtidos 19,08 e 14,93 mgEC g⁻¹, respectivamente.

Mesmo se tratando da mesma espécie, a variação do conteúdo fenólico entre as amostras é justificável, pois a produção dos compostos fenólicos se dá durante o desenvolvimento da planta e é modulada em resposta a diferentes situações de estresse, podendo ser influenciada por fatores bióticos e abióticos (Călinoiu e Vodnar, 2018), como origem geográfica (Silva et al., 2017b), condições fisiopatológicas da planta (Zielinski et al., 2014) e condições ambientais e sazonais (Ribeiro et al., 2019). As condições pós-colheita também podem afetar o conteúdo fenólico (Kaur e Bains, 2020).

Em relação à atividade antioxidante, maiores percentuais de inibição foram obtidos nos ensaios com o radical DPPH em comparação com o radical ABTS. Deve-se considerar que a diferença entre os resultados dos métodos de avaliação de atividade antioxidante é devida à estereoseletividade dos radicais, que afeta a capacidade do extrato de reagir e extinguir radicais diferentes (Gorinstein et al., 2007). Cada um dos métodos aplicados se baseia em um mecanismo e utiliza diferentes fontes de radicais, contra os quais os antioxidantes mostram diferentes potenciais. Dessa forma, um único método não é suficiente para determinar a capacidade antioxidante total, sendo recomendável mais de um método para avaliar a real capacidade antioxidante de uma amostra (Haminiuk et al., 2012).

Para a atividade antioxidante frente ao radical DPPH, a porcentagem de inibição do radical variou de 89 a 93% nas amostras comerciais de farinha de chia, enquanto para as farinhas produzidas a inibição do DPPH variou de 82 a

94%, sendo o maior percentual obtido para a amostra produzida apenas com sementes de chia branca. Em estudos que relatam a atividade antioxidante de sementes de chia pelo método DPPH foram obtidas porcentagens de inibição inferiores: 68,8% (Kaur e Bains, 2020) e 70% (Coelho e Salas-Mellado, 2014).

Pelo método ABTS, a porcentagem de inibição do radical pelas amostras de farinhas produzidas das sementes de chia variou de 86 a 93%, enquanto o percentual de inibição de ABTS pelas amostras de farinha comercial, que variou de 51 a 93. Estes valores estão de acordo com o estudo de Reyes-Caudillo, Tecante e Valdivia-López (2008), que determinaram a inibição do radical ABTS de 87,84% e 95,78% para sementes de chia de diferentes localidades do México.

Os fatores que podem justificar as diferenças observadas no conteúdo fenólico também se aplicam às variações na capacidade antioxidante das amostras analisadas, uma vez que a composição fitoquímica da planta tem influência direta sobre suas propriedades biológicas (Sartor et al., 2013).

5.3.5.1. Farinha de chia adulterada

A adulteração de alimentos caracteriza-se pela adição, substituição ou remoção de um ingrediente alimentar, de forma intencional e sem o conhecimento do comprador, geralmente visando ganho econômico. Vários casos têm sido relatados em todo o mundo sobre a adulteração de diversos alimentos, como farinhas de diferentes produtos. Nesse sentido, a avaliação da fraude alimentar se faz necessária para assegurar a qualidade dos alimentos e, para tanto, devem ser desenvolvidos estudos de investigação da adulteração de alimentos visando a prevenção de fraudes (Rodríguez, Rolandelli e Buera, 2019).

As farinhas de trigo comum, mandioca e milho foram relatadas como adulterantes de farinha de trigo orgânica (Su e Sun, 2017). Rodríguez, Rolandelli e Buera (2019) empregaram farinhas de milho e trigo nas proporções 1, 5 e 10% ($m\ m^{-1}$) para a adulteração de farinha de quinoa. Verdú e colaboradores (2016) utilizaram farinhas de aveia e milho nas proporções 2,5, 5, 7,5 e 10% ($m\ m^{-1}$) como adulterantes de farinha de trigo.

Neste trabalho foi simulada a adulteração da farinha integral de chia, fraudada com amido de milho, farinha de trigo comum, farinha de mandioca,

farinha de aveia e farinha de milho nas proporções de 5 e 10% ($m m^{-1}$). O critério para a escolha dos adulterantes foi o aspecto visual das farinhas, sendo selecionados aqueles que produziram menor alteração visual do produto final. Com amido de milho, farinha de trigo comum e farinha de milho foram produzidas farinhas adulteradas mais parecidas com a farinha de chia autêntica, sendo imperceptível visualmente a adulteração.

Tabela 15: Resultados das determinações espectrofotométricas para farinhas de chia adulteradas e adulterantes.

Amostra	Teor de fenólicos totais (mgEAG g^{-1})	Teor de flavonoides totais (mgEQ g^{-1})	DPPH (% inibição)
FC	5,05 ^a ± 0,02	4,52 ^a ± 0,10	87 ^b ± 0,8
M5	4,53 ^{bc} ± 0,05	4,38 ^a ± 0,12	87 ^b ± 0,3
M10	4,31 ^c ± 0,17	4,08 ^b ± 0,03	90 ^{ab} ± 0,2
FM	0,67 ^d ± 0,04	0,13 ^c ± 0,01	90 ^{ab} ± 0,2
A5	4,62 ^b ± 0,07	4,49 ^a ± 0,12	88 ^{ab} ± 2,4
A10	4,35 ^{bc} ± 0,08	4,32 ^{ab} ± 0,09	88 ^{ab} ± 0,3
AM	0,20 ^e ± 0,01	n.d.	91 ^a ± 0,1
T5	4,49 ^{bc} ± 0,03	4,46 ^a ± 0,06	88 ^{ab} ± 0,4
T10	4,38 ^{bc} ± 0,04	4,34 ^{ab} ± 0,07	90 ^{ab} ± 0,6
FT	0,32 ^e ± 0,01	n.d.	90 ^{ab} ± 0,5

FC: farinha de chia autêntica; M5: farinha de chia adulterada com 5% ($m m^{-1}$) de farinha de milho; M10: farinha de chia adulterada com 10% ($m m^{-1}$) de farinha de milho; FM: farinha de milho; A5: farinha de chia adulterada com 5% ($m m^{-1}$) amido de milho; A10: farinha de chia adulterada com 10% ($m m^{-1}$) amido de milho; AM: amido de milho; T5: farinha de chia adulterada com 5% ($m m^{-1}$) de farinha de trigo; T10: farinha de chia adulterada com 10% ($m m^{-1}$) farinha de trigo; FT: farinha de trigo. Média ± desvio padrão. Letras iguais após a média indicam que não há diferença estatística no nível de 5% de significância pelo teste de Tuckey.

Para o teor de fenólicos totais foi observado que o aumento da proporção de adulterante leva a uma diminuição da concentração de compostos fenólicos, de modo que a farinha de chia autêntica apresentou a maior concentração de fenólicos, enquanto para os adulterantes puros foram observados teores muito inferiores. O teste de Tukey (5% de significância) indica que há diferença

estatística significativa entre o teor de fenólicos da amostra de farinha de chia autêntica, das amostras adulteradas e dos adulterantes puros.

Na determinação de flavonoides totais foram obtidos teores próximos para as farinhas pura e adulteradas, sendo verificado com o teste de Tukey que houve diferença significativa apenas entre a farinha de chia autêntica e a adulterada com 10% ($m\ m^{-1}$) de farinha de milho. Entre os adulterantes, apenas no extrato de farinha de mandioca foi possível quantificar o teor de flavonoides totais, para os outros adulterantes não houve quantificação, pois não ocorreu mudança de coloração da solução para a determinação espectrofotométrica, o que possivelmente está relacionado a ausência e/ou baixa concentração de flavonoides nesses extratos.

Em contraposição ao observado nas determinações de fenólicos totais e flavonoides totais, a atividade antioxidante foi maior para as amostras de farinhas adulteradas e dos adulterantes puros. Estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey, só houve diferença significativa para a atividade antioxidante da farinha de chia autêntica e farinha adulterada com 5% de farinha de milho e amido de milho puro.

O amido de milho é um polímero natural composto por dois polissacarídeos: amilose e amilopectina. Sua estrutura apresenta grande número de hidroxilas (Willfahrt et al., 2019), o que pode justificar o elevado percentual de inibição de radicais DPPH pelo extrato do adulterante amido de milho. A presença de hidroxilas neste adulterante também pode levar a um falso positivo no ensaio de determinação de fenólicos totais, uma vez que o reagente Folin-Ciocalteu não é específico para os compostos fenólicos e pode ser reduzido por outros compostos redutores (Oliveira et al., 2009).

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal rico em compostos fenólicos e antioxidantes. Assim como observado neste estudo, já foi demonstrado que a farinha de milho é uma melhor fonte de compostos fenólicos que a farinha de trigo (Nikolić et al., 2019).

O trigo (*Triticum* spp.) também é um cereal fonte de compostos fenólicos, como flavonoides, e tem propriedades antioxidantes. O teor de compostos fenólicos totais determinado no adulterante farinha de trigo está de acordo com o

determinado por Li e colaboradores (2015b), que também determinaram o teor de flavonoides totais. A não quantificação de flavonoides para a farinha de trigo neste estudo pode estar relacionada com o método de extração e/ou a sensibilidade do método espectrofotométrico aplicado.

Ressalta-se que as determinações espectrofotométricas, amplamente empregadas para a análise de produtos vegetais, possibilitam de maneira simples, rápida e barata, a estimativa total do conteúdo fenólico (Cong-Cong et al., 2017) e da capacidade antioxidante (André et al., 2010). Dessa forma, as determinações espectrofotométricas fornecem uma informação geral que pode nortear os estudos, ao passo que indicam qual amostra/extrato tem maior potencial antioxidante e maiores teores de compostos fenólicos.

Diante dos resultados nas determinações espectrofotométricas, entre as farinhas integrais analisadas, os extratos de farinha de chia se destacaram pelos teores totais de compostos fenólicos e flavonoides superiores e pela elevada capacidade antioxidante frente aos radicais DPPH e ABTS. Para os extratos de farinha de quinoa também foram observados elevados teores de flavonoides totais. Em razão disto, os extratos de farinhas de chia e de quinoa, para os quais também foi indicada maior diversidade de metabólitos secundários na prospecção fitoquímica, foram selecionados para a investigação de atividade antibacteriana.

5.4. Otimização do método cromatográfico CLAE-DAD

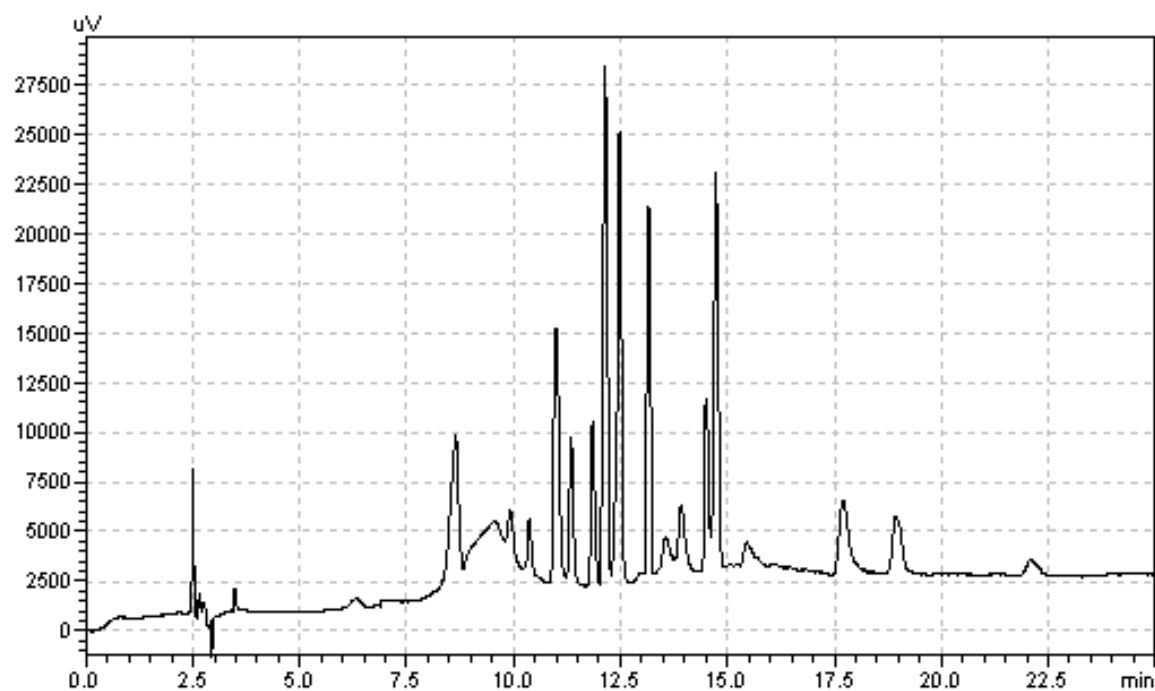
A otimização foi realizada pela injeção da mistura dos padrões (1,0 mg L⁻¹), avaliando-se os tempos de retenção e as resoluções dos picos cromatográficos obtidos. Para facilitar a apresentação dos resultados da otimização da separação, os cromatogramas foram obtidos no modo *max plot*, em que se tem a máxima absorção de cada analito na faixa de comprimento de onda de 260 a 360 nm. Inicialmente foi realizada a tentativa de separação de 24 compostos bioativos de diferentes classes, a maioria deles compostos fenólicos:

- Ácidos fenólicos: protocatecuico, vanílico, siríngico, ferúlico, sinápico, elágico, gálico, p-cumárico, clorogênico e cafeico.
- Flavonoides: (+)-catequina, rutina, quercetina, kaempferol, crisina, naringenina e pelargonidina.

- Aldeídos fenólicos: vanilina e siringaldeído.
- Estilbeno: resveratrol.
- Fenilpropanoide: ácido transcinâmico.
- Metilxantinas: cafeína e teobromina.
- Vitamina: ácido ascórbico (vitamina C).

O primeiro parâmetro ajustado foi o gradiente de eluição, utilizando como componentes da fase móvel metanol e água acidificada com ácido acético 1% (v v⁻¹), mantendo inalteradas as demais condições: temperatura (40 °C) e vazão da fase móvel (1,0 mL min⁻¹). O primeiro gradiente de eluição testado seguiu o método de Santos et al. (2017), utilizado como um método de referência, partindo do qual foi realizada a otimização. O gradiente é descrito na Tabela 16 e o cromatograma resultante é apresentado na Figura 19.

Figura 19: Cromatograma de mistura de padrões resultante do primeiro gradiente de eluição aplicado.



Condições cromatográficas: vazão: 1,0 mL min⁻¹; temperatura: 40 °C; volume de injeção: 20 µL.

Tabela 16: Primeiro gradiente de eluição avaliado.

Tempo (min)	Água acidificada (%)	Metanol (%)
0	100	0
10	30	70
20	25	75
21-25	100	0

Na separação cromatográfica em fase reversa os compostos fenólicos mais polares, como ácido gálico, são eluídos mais facilmente e para substâncias menos polares, como kaempferol, o tempo de retenção é maior (Haminiuk et al., 2012). No cromatograma resultante da aplicação do primeiro gradiente (Figura 19) é verificada essa ordem de eluição.

No cromatograma da Figura 19 é evidente que a separação não foi eficiente, sendo observada uma pequena distância entre alguns picos e a coeluição de alguns analitos, uma vez que foi obtido um número de picos menor que a quantidade de analitos injetados. Confirmando a ineficiência do gradiente aplicado, foram obtidos valores de resoluções menores que 1 para vários analitos.

Para melhorar a resolução dos picos cromatográficos e obter uma separação eficiente, foram testadas sucessivas modificações no gradiente, alterando as proporções dos solventes na fase móvel, os tempos de condicionamento e recondicionamento da coluna e o tempo total da corrida.

Após 20 tentativas de modificação do gradiente, optou-se por retirar alguns analitos afim de garantir uma separação eficiente em um tempo de análise razoável, tendo em vista que para obter resoluções aceitáveis ($R_s > 1,0$) para todos os analitos seriam necessárias corridas de mais de uma hora. Os critérios para a seleção dos analitos foram a maior ocorrência nos alimentos e a preferência por ácidos fenólicos e flavonoides, pois constituem a maioria dos fenólicos dietéticos (Robbins, 2003).

Optou-se por excluir: ácido ascórbico, pois seu tempo de retenção foi anterior ao tempo do pico do solvente (metanol); teobromina, por comprometer a resolução do pico da catequina; ácido vanílico, por prejudicar as resoluções para os ácidos clorogênico e cafeico; siringaldeído, por ocasionar baixa resolução do

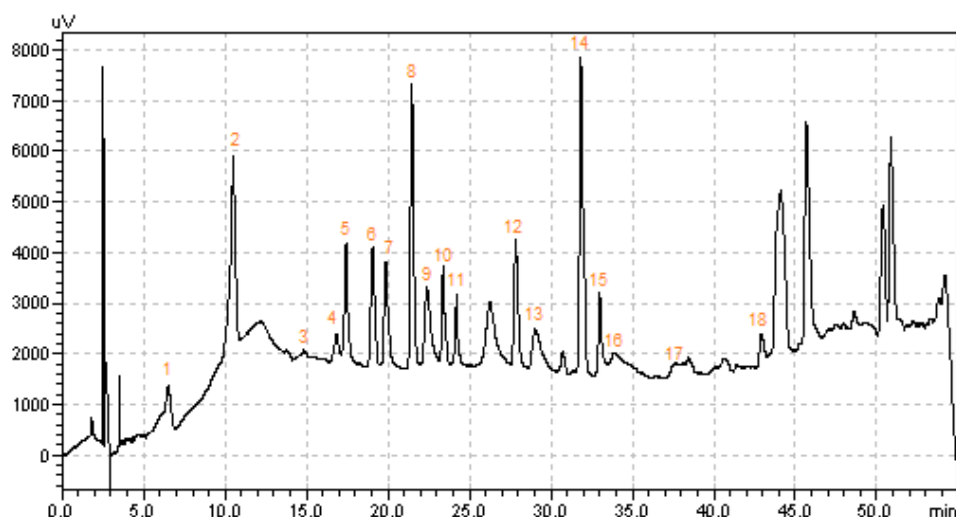
pico de ácido p-cumárico; resveratrol, por levar a menor resolução do pico de rutina; e pelargonidina, por comprometer a resolução do pico de cafeína. A exclusão de teobromina, ácido vanílico, siringaldeído, resveratrol e pelargonidina do método foi necessária pois absorvem em comprimentos de onda iguais aos analitos citados que têm a resolução prejudicada por eles.

Após a seleção dos analitos, foram realizadas mais 5 modificações para o estabelecimento do gradiente de eluição ótimo, descrito na Tabela 17 e cujo cromatograma resultante é apresentado na Figura 20.

Tabela 17: Gradiente de eluição ótimo.

Tempo (min)	Água acidificada	Metanol
0	100	0
10	80	20
23	60	40
36	40	60
49	20	80
50-55	100	0

Figura 20: Cromatograma de mistura de padrões resultante do gradiente de eluição ótimo.



Condições cromatográficas: vazão: 1,0 mL min⁻¹; temperatura: 40 °C; volume de injeção: 20 µL. 1: ácido gálico; 2: ácido protocatecuico; 3: catequina; 4: ácido clorogênico; 5: ácido cafeico; 6: ácido siríngico; 7: vanilina; 8: ácido p-cumárico; 9: cafeína; 10: ácido ferúlico; 11: ácido sinápico; 12: rutina; 13: ácido elágico; 14: ácido trans-cinâmico, 15: Naringenina; 16: quercetina; 17: kaempferol; 18: crisina.

Conforme ilustrado no cromatograma resultante da aplicação do gradiente ótimo (Figura 20), na CLAE de fase reversa, o tempo de retenção é menor para moléculas mais polares (ácido gálico, ácido protocatecuico, catequina), enquanto as moléculas menos polares (quercetina, kaempferol, crisina) são eluídas em maiores tempos de retenção. Na Figura 20 é visível que o pico do kaempferol não está bem definido, o que se deve a coeluição com alguma sujeira impregnada na coluna, que não interfere na determinação do kaempferol por não absorver no mesmo comprimento de onda (360 nm), mas que está visível pois foi utilizado o modo *max plot* para a obtenção do cromatograma.

Comparando-se os cromatogramas do primeiro gradiente avaliado (Figura 19) e o estabelecido como ótimo (Figura 20), pode-se observar a melhor separação dos picos, o que levou a melhores valores de resolução (Tabela 18) para a maioria dos analitos.

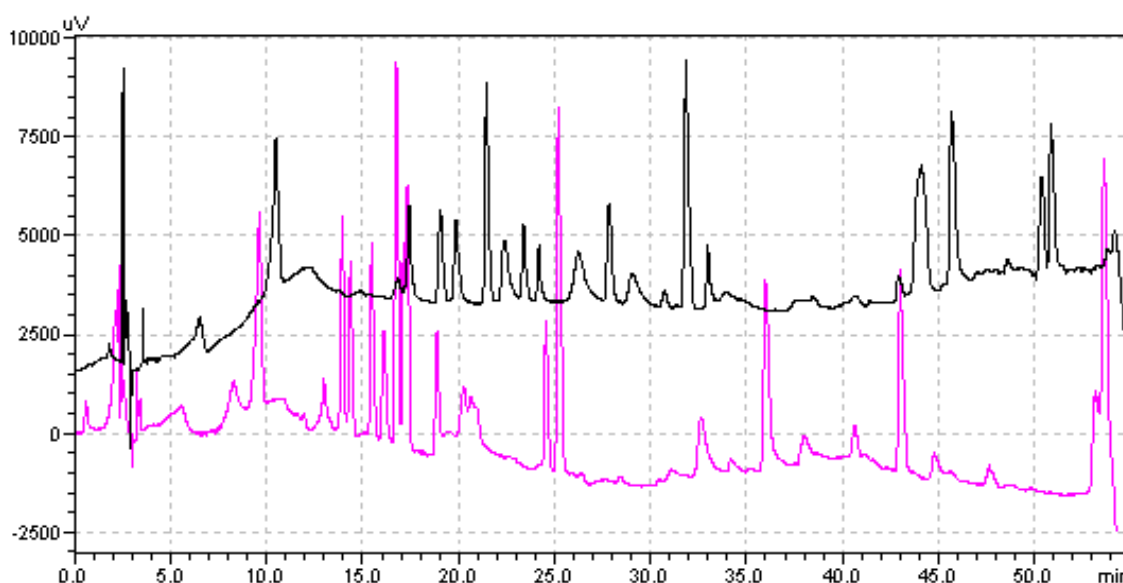
Tabela 18: Resoluções dos picos obtidos no estudo do gradiente de eluição.

Analito	Primeiro gradiente	Gradiente ótimo
Ác gálico	2,420	3,107
Ác protocatecuico	3,016	4,341
Catequina	1,021	2,229
Ác clorogênico	1,043	0,811
Ác cafeico	0,997	2,345
Ác siríngico	1,600	0,900
Vanilina	0,937	1,515
Ác p-cumárico	0,831	0,908
Cafeína	0,040	1,124
Ác ferúlico	0,000	1,114
Ác sinápico	2,490	1,817
Rutina	0,946	1,363
Ác elágico	4,554	5,008
Ác t-cinâmico	0,292	1,422
Naringenina	0,865	0,701
Quercetina	1,149	1,979
Kaempferol	2,607	4,050
Crisina*	2,607	4,050

*Resolução calculada em relação ao pico anterior.

Aplicando o gradiente otimizado, foi avaliada a substituição do solvente orgânico da fase móvel, empregando etanol ao invés de metanol. O cromatograma resultante do emprego de etanol na fase móvel é apresentado na Figura 21. A aplicabilidade do etanol foi avaliada por se tratar de um solvente de menor toxicidade e por seu uso conhecido como componente da fase móvel para separação de fenólicos por CLAE (Pyrzynska e Sentkowska, 2015).

Figura 21: Comparação dos cromatogramas empregando metanol (preto) e etanol (rosa) na fase móvel.



Condições cromatográficas: vazão: 1,0 mL min⁻¹; temperatura: 40 °C; volume de injeção: 20 µL. Preto: metanol; rosa: etanol.

Comparando os cromatogramas com uso de etanol e metanol (Figura 21) ficou evidente que o emprego de etanol prejudicou a separação e causou a coeluição de vários analitos, além da elevação da pressão do sistema, fatores associados à viscosidade do etanol, superior à viscosidade do metanol. A alta pressão de trabalho pode levar a danos na bomba e no injetor, sendo ideal manter a pressão inferior a 15 MPa e no máximo 20 MPa (Collins, Braga e Bonato, 2006), motivo pelo qual foi inviabilizado o estudo do emprego do etanol na composição da fase móvel.

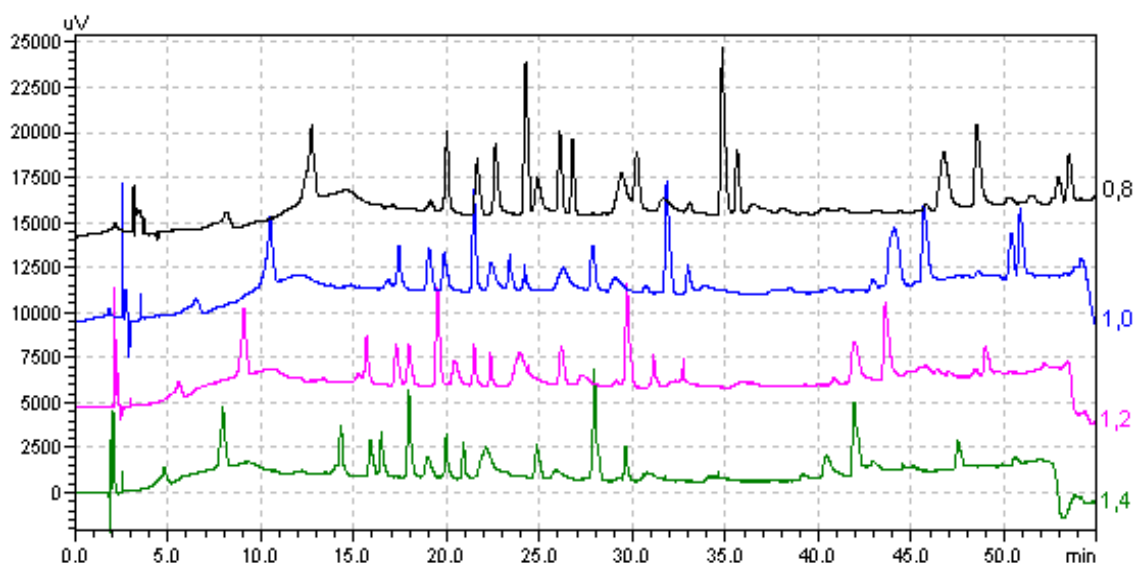
Tendo definido a composição da fase móvel e o gradiente de eluição, foi estudado o efeito da vazão dos solventes sobre a separação. A mistura de

padrões (1,0 mg L⁻¹) foi injetada empregando vazões de 0,8 a 1,4 mL min⁻¹. Vazões elevadas devem ser evitadas porque ocasionam alta pressão de trabalho (Collins, Braga e Bonato, 2006). A comparação dos cromatogramas obtidos empregando as diferentes vazões e as resoluções resultantes são apresentadas na Figura 22 e Tabela 19, respectivamente.

Tabela 19: Resoluções dos picos obtidos no estudo da vazão (mL min⁻¹).

Analito	0,8	1,0	1,2	1,4	Gradiente ótimo
Ác gálico	2,99	3,11	2,94	2,80	3,89
Ác protocatecuico	4,57	4,34	5,49	4,91	8,34
Catequina	2,24	2,23	2,95	2,94	3,14
Ác clorogênico	0,82	0,81	0,63	0,43	1,06
Ác cafeico	1,75	2,34	2,39	2,42	2,62
Ác siríngico	1,02	0,90	0,91	0,81	1,07
Vanilina	1,58	1,51	1,60	1,58	1,62
Ác p-cumárico	0,66	0,91	0,88	1,01	1,33
Cafeína	1,46	1,12	1,18	1,06	1,58
Ác ferúlico	0,96	1,11	1,17	1,14	1,13
Ác sinápico	2,77	1,82	1,13	1,09	4,28
Rutina	0,81	1,36	1,51	2,45	2,36
Ác elágico	5,64	5,01	4,28	3,77	3,44
Ác t-cinâmico	1,02	1,42	1,67	1,97	1,60
Naringenina	0,57	0,70	1,23	0,97	0,98
Quercetina	1,54	1,98	2,54	2,71	2,29
Kaempferol	3,20	4,05	4,04	4,54	4,98
Crisina*	3,20	4,05	4,04	4,54	4,98

*Resolução calculada em relação ao pico anterior.

Figura 22: Comparação de cromatogramas resultantes de diferentes vazões.

Condições cromatográficas: temperatura: 40 °C; volume de injeção: 20 μ L. Vazão: preto: 0,8 mL min^{-1} ; azul: 1,0 mL min^{-1} ; rosa: 1,2 mL min^{-1} ; verde: 1,4 mL min^{-1} .

Conforme ilustrado na Figura 22 e destacado na Tabela 19, com o aumento da vazão houve melhora da resolução para alguns analitos, como ácidos p-cumárico e transcinâmico, enquanto outros tiveram diminuição da resolução, como os ácidos clorogênico e siríngico. Como não houve uma tendência e não foram obtidas melhores resoluções para uma única vazão, optou-se por aplicar um gradiente de vazão. Foram testados 12 gradientes de vazão da fase móvel, sendo obtidos melhores resultados com o programa de eluição apresentado na Tabela 20, cujas resoluções são apresentadas na Tabela 19 como gradiente ótimo.

Tabela 20: Gradiente de vazão ótimo.

Tempo (min)	Vazão (mL min^{-1})
0-12	0,8
24,5	1,0
37	1,2
49	1,4
54-55	0,8

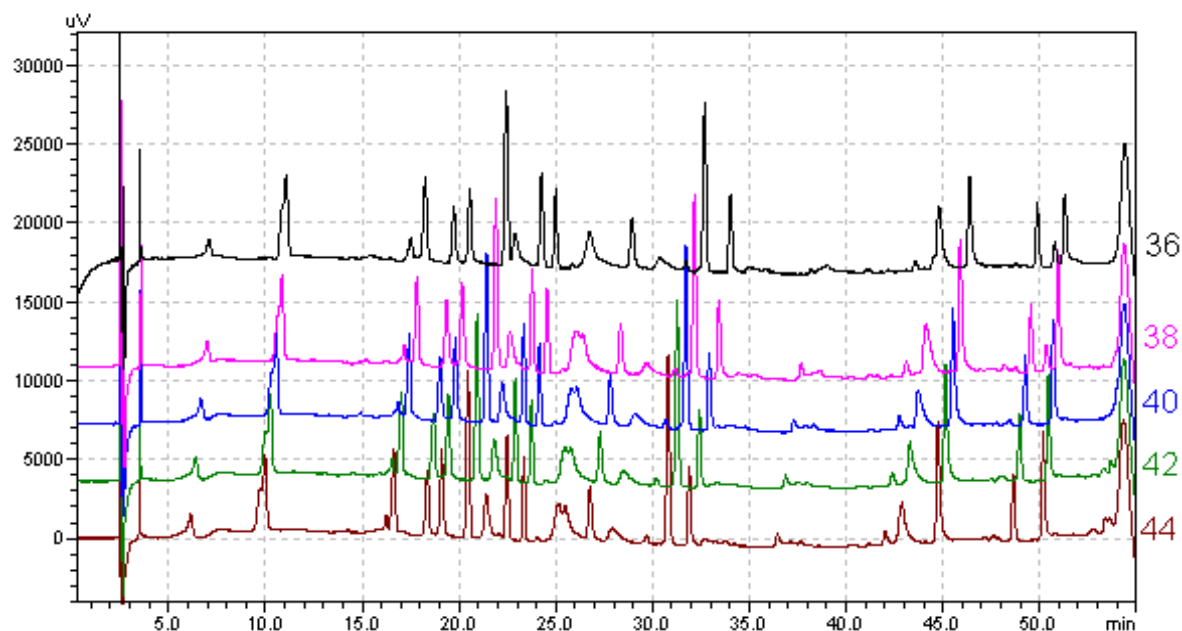
Após a definição do gradiente de vazão da fase móvel, foi realizado o estudo da temperatura da coluna cromatográfica. A mistura de padrões (1,0 mg L⁻¹) foi injetada nas temperaturas de 36 a 44 °C. Os valores de resolução dos picos cromatográficos e a comparação dos cromatogramas obtidos para cada temperatura são apresentados na Tabela 21 e Figura 23, respectivamente.

Tabela 21: Resoluções dos picos obtidos no estudo da temperatura.

Analito	36 °C	38 °C	40 °C	42 °C	44 °C
Ác gálico	4,26	3,83	3,89	4,66	3,71
Ác protocatecuico	9,06	7,90	8,34	8,76	9,09
Catequina	2,88	2,87	3,14	3,25	3,46
Ác clorogênico	1,27	1,15	1,06	1,01	0,89
Ác cafeico	1,74	1,84	2,62	2,33	2,21
Ác siríngico	1,45	1,29	1,07	1,03	0,97
Vanilina	0,83	1,81	1,62	1,25	1,13
Ác p-cumárico	0,87	1,08	1,33	1,30	1,44
Cafeína	2,25	1,92	1,58	1,26	1,09
Ác ferúlico	0,88	0,89	1,13	1,16	1,05
Ác sinápico	4,81	4,43	4,28	4,51	5,50
Rutina	2,46	2,40	2,36	1,30	1,38
Ác elágico	1,29	1,27	3,44	4,14	2,48
Ác t-cinâmico	1,53	1,32	1,60	1,31	0,94
Naringenina	0,78	1,10	0,98	1,33	0,99
Quercetina	1,46	1,78	2,29	1,69	1,25
Kaempferol	2,39	2,87	4,98	4,30	2,45
Crisina*	2,39	2,87	4,98	4,30	2,45

*Resolução calculada em relação ao pico anterior.

Figura 23: Comparação de cromatogramas resultantes de diferentes temperaturas.



Volume de injeção: 20 μ L. Temperatura: preto: 36 $^{\circ}$ C; rosa: 38 $^{\circ}$ C; azul: 40 $^{\circ}$ C; verde: 42 $^{\circ}$ C; vermelho: 44 $^{\circ}$ C.

Comparando-se as resoluções e os cromatogramas para as diferentes temperaturas, optou-se por empregar 42 $^{\circ}$ C, tendo em vista que para esta temperatura todos os analitos apresentaram a resolução mínima de 1,0. Apesar de ter sido observado a melhora da resolução de picos para diferentes temperaturas, neste caso não foi possível avaliar empregar uma rampa de aquecimento tal como foi avaliado um gradiente de vazão, pois o forno do equipamento requer tempo para a estabilização da temperatura, o que implicaria em tempos de análise ainda maiores.

Considerando que o último analito (crisina) é eluído com tempo de retenção de aproximadamente 43 minutos, os gradientes de eluição e de vazão otimizados foram ajustados para reduzir o tempo total da corrida para 48 minutos, mas mantendo a condição original até o tempo de retenção da crisina, conforme descrito a seguir nas Tabelas 22 e 23.

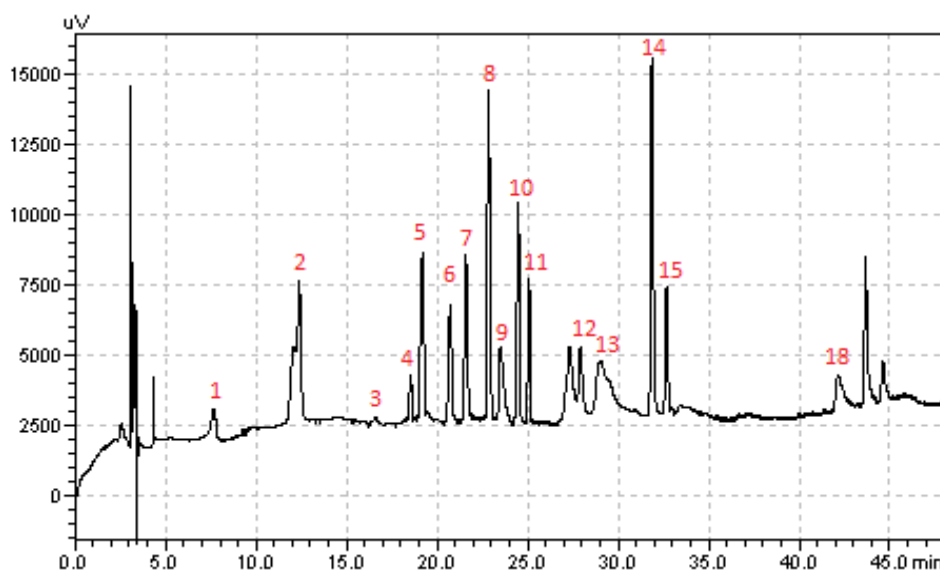
Tabela 22: Gradiente de eluição final (cromatógrafo Prominence LC-20AD).

Tempo (min)	Água acidificada	Metanol
0	100	0
10	80	20
23	60	40
36	40	60
43	29,5	70,5
43,5-48	100	0

Tabela 23: Gradiente de vazão final (cromatógrafo Prominence LC-20AD).

Tempo (min)	Vazão (mL min ⁻¹)
0-12	0,8
24,5	1,0
37	1,2
43	1,3
47-48	0,8

A Figura 24 apresenta os cromatogramas da mistura de padrões (1,0 mg L⁻¹) obtidos empregando as condições cromatográficas otimizadas.

Figura 24: Cromatograma de mistura de padrões empregando as condições cromatográficas ótimas (cromatógrafo Prominence LC-20AD).

Volume de injeção: 20 µL. 1: ácido gálico; 2: ácido protocatecuico; 3: catequina; 4: ácido clorogênico; 5: ácido cafeico; 6: ácido siríngico; 7: vanilina; 8: ácido p-cumárico; 9: cafeína; 10: ácido ferúlico; 11: ácido sinápico; 12: rutina; 13: ácido elágico; 14: ácido t-cinâmico; 15: Naringenina; 18: crisina. Os picos de quercetina (16) e kaempferol (17) não estão visíveis.

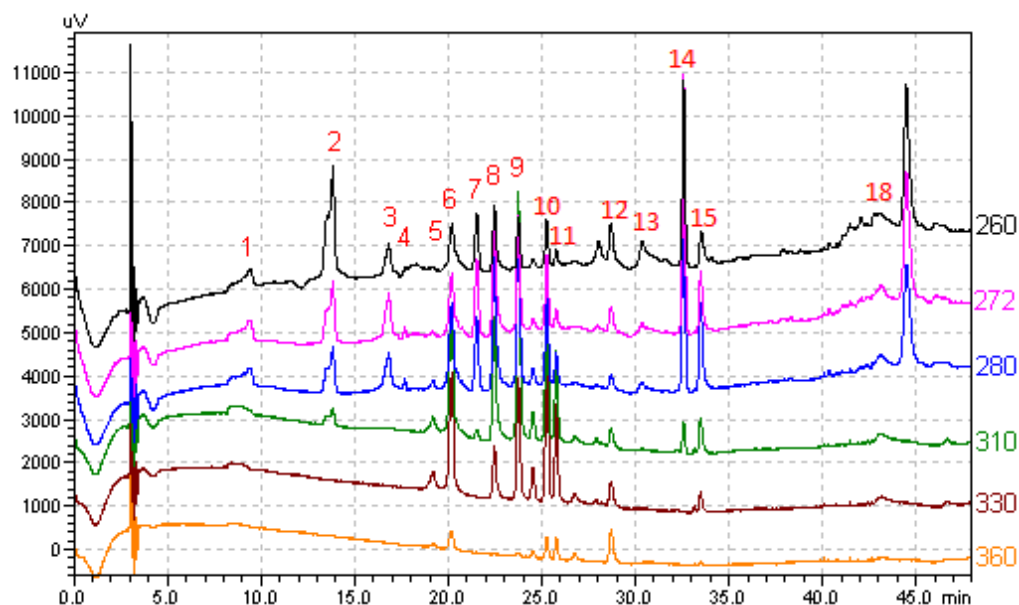
Após a otimização do método de separação, o sistema cromatográfico Proeminence LC20AD apresentou problemas instrumentais e foi necessário trocar a célula de fluxo do DAD. Após a mudança no detector, foi injetada a mistura dos 18 padrões selecionados empregando as condições cromatográficas otimizadas, sendo verificadas mudanças nos tempos de retenção dos analitos e, conseqüentemente, nas resoluções dos picos cromatográficos. A mudança mais significativa ocorreu com a cafeína, que passou a coeluir com o ácido p-cumárico.

Considerando as mudanças na eluição, foi injetada a mistura dos padrões anteriormente excluídos para avaliar seus tempos de retenção e a possibilidade de inclusão no método. Foi verificado que a teobromina deixou de comprometer a resolução do pico de catequina. Os demais compostos continuaram comprometendo a resolução de outros analitos, como discutido anteriormente.

Em vista das circunstâncias discutidas, optou-se por excluir a cafeína e incluir teobromina no método de separação. A Figura 25 apresenta o cromatograma da mistura dos 18 padrões, empregando as condições cromatográficas previamente otimizadas, nos comprimentos de onda de máxima absorção:

- 260 nm: ácidos protocatecuico e elágico.
- 272 nm: ácidos gálico e siríngico, teobromina e crisina.
- 280 nm: catequina, vanilina, naringenina e ácido transcinâmico.
- 310 nm: ácido p-cumárico.
- 330 nm: ácidos clorogênico, cafeico, ferúlico e sinápico.
- 360 nm: rutina, quercetina e kaempferol.

Figura 25: Cromatograma de mistura de 18 padrões empregando as condições cromatográficas ótimas (cromatógrafo Prominence LC-20AD).



Volume de injeção: 20 μ L. Preto: 260 nm; Rosa: 272 nm; Azul: 280 nm; Vermelho: 310 nm; Verde: 330 nm; Laranja: 360 nm. 1: ácido gálico; 2: ácido protocatecuico; 3: teobromina; 4: catequina; 5: ácido clorogênico; 6: ácido cafeico; 7: ácido siríngico; 8: vanilina; 9: ácido p-cumárico; 10: ácido ferúlico; 11: ácido sinápico; 12: rutina; 13: ácido elágico; 14: ácido t-cinâmico; 15: Naringenina; 18: crisina. Os picos de quercetina (16) e kaempferol (17) não estão visíveis.

Comparando-se as Figuras 24 e 25 é possível observar as mudanças nos tempos de retenção. Para avaliar a eficiência da separação cromatográfica, a mistura de padrões ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) foi injetada empregando as condições otimizadas e foram calculados os parâmetros: resolução, fator de retenção, fator de separação e número de pratos teóricos, apresentados na Tabela 24.

Tabela 24: Parâmetros de avaliação da eficiência da separação cromatográfica (cromatógrafo Prominence LC-20AD).

Analito	Tr	Wb	Rs	K	α	N
Ác gálico	9,40	0,82	4,67	0,67	1,155	2102
Ác protocatecuico	13,83	1,08	3,26	0,78	1,051	2624
Teobromina	16,83	0,76	1,62	0,82	1,011	7843
Catequina	17,68	0,29	2,77	0,83	1,016	59455
Ác clorogênico	19,18	0,79	1,25	0,84	1,010	9427
Ác cafeico	20,19	0,83	1,80	0,85	1,011	9467
Ác siríngico	21,53	0,66	1,26	0,86	1,007	17022
Vanilina	22,47	0,83	1,61	0,86	1,009	11722
Ác p-cumárico	23,75	0,76	2,35	0,87	1,009	15621
Ác ferúlico	25,24	0,51	1,15	0,88	1,003	39182
Ác sinápico	25,79	0,45	5,87	0,88	1,014	52549
Rutina	28,70	0,54	3,23	0,89	1,007	45183
Ác elágico	30,36	0,49	4,22	0,90	1,008	61427
Ác t-cinâmico	32,58	0,56	1,52	0,91	1,003	54143
Naringenina	33,48	0,63	2,76	0,91	1,007	45187
Quercetina	35,91	1,13	3,56	0,91	1,010	16156
Kaempferol	40,09	1,22	2,82	0,92	1,006	17279
Crisina	43,11	0,92	2,82*	0,93	1,006*	35137

*Cálculo em relação ao pico anterior. Tr: tempo de retenção do pico; Wb: largura da base do pico; Rs: resolução; K: fator de retenção; α : fator de separação; N: número de pratos teóricos.

Para o fator de retenção (K) foram obtidos valores de 0,67 a 0,93, que são satisfatórios, uma vez que a faixa ideal para a análise de múltiplos componentes é $0,5 \leq k \leq 20$ (Collins, Braga e Bonato, 2006). Os maiores valores de K indicam a maior retenção do soluto na fase estacionária. Valores de 1,003 a 1,155 foram obtidos para o fator de separação (α), de acordo com o recomendável, que é $\alpha > 1,0$ (Lanças, 2009). O número de pratos teóricos variou de 2102 a 61427, acima do valor mínimo aceitável, que é 2000 (Ribani et al., 2004).

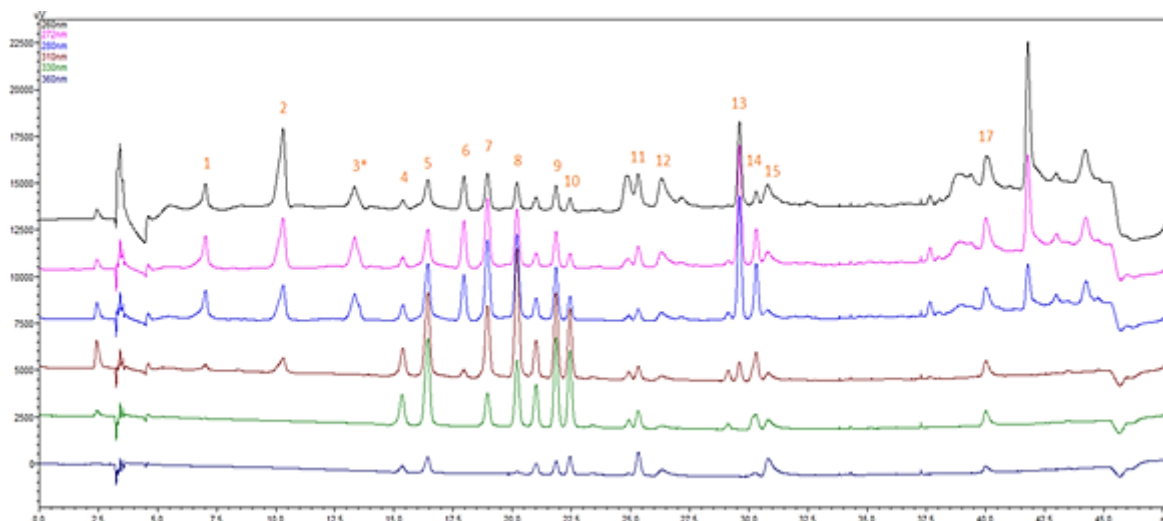
Picos bem resolvidos devem apresentar um valor de resolução superior a 1,0 (Cass e Degani, 2011). A análise quantitativa robusta requer $R_s > 1,5$ (Collins, Braga e Bonato, 2006), mas para uma separação suficiente para fins quantitativos, é necessário $R_s > 1,25$ (Azevedo et al., 2019). Para a maioria dos analitos, 15 deles, foram obtidas resoluções superiores 1,5. Dos 18 analitos, dois apresentaram resoluções $1,5 > R_s \geq 1,25$. Apenas um analito (ácido ferúlico) apresentou resolução inferior a 1,25, mas acima do valor mínimo de 1,0. Desta forma, os valores de resolução obtidos são aceitáveis. Também deve-se considerar que foi desenvolvido um método para múltiplos componentes, de estruturas químicas similares.

Tendo em vista que os valores obtidos para os parâmetros de avaliação da eficiência da separação cromatográfica estão de acordo com os valores ideais, demonstra-se que o método é seletivo e que a separação é eficiente. Então, o método otimizado foi submetido à validação.

Após a validação do método de separação no cromatógrafo Prominence LC-20AD o detector passou a apresentar falhas de conexão com o módulo de comunicação, o que possivelmente teve relação com o desgaste das lâmpadas, para as quais o número de horas de uso à época ultrapassava o máximo recomendado. Essa situação inviabilizou o uso do cromatógrafo Prominence LC-20AD para a análise das amostras, tendo sido necessário utilizar outro equipamento CLAE-DAD para a continuidade da pesquisa.

O método de separação otimizado foi aplicado no cromatógrafo Prominence-i LC-2030C. Foi injetada a mistura dos 18 padrões selecionados ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) sob as condições ótimas estabelecidas previamente. Como pode ser observado no cromatograma da Figura 26, houve mudança significativa nos tempos de retenção e ocorreu a coeluição de teobromina e catequina, para os quais se observou apenas um pico.

Figura 26: Cromatograma de mistura de 18 padrões empregando as condições cromatográficas ótimas (cromatógrafo Prominence-i LC-2030C).



Volume de injeção: 20 μ L. Preto: 260 nm; Rosa: 272 nm; Azul claro: 280 nm; Vermelho: 310 nm; Verde: 330 nm; Azul escuro: 360 nm. 1: ácido gálico; 2: ácido protocatecuico; 3*: teobromina e catequina coeluídos; 4: ácido clorogênico; 5: ácido cafeico; 6: ácido siríngico; 7: vanilina; 8: ácido p-cumárico; 9: ácido ferúlico; 10: ácido sinápico; 11: rutina; 12: ácido elágico; 13: ácido t-cinâmico; 14: Naringenina; 15: quercetina; 17: crisina. O pico de kaempferol (16) não está visível.

Devido à coeluição com a catequina, optou-se por retirar a teobromina do método de separação. Como houve mudanças na eluição, a mistura dos padrões ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) anteriormente excluídos (ácido vanílico, siringaldeído, resveratrol, pelargonidina e cafeína) foi injetada, tendo sido verificada a impossibilidade de inclusão no método devido a ocorrência de coeluição, da mesma forma discutida anteriormente.

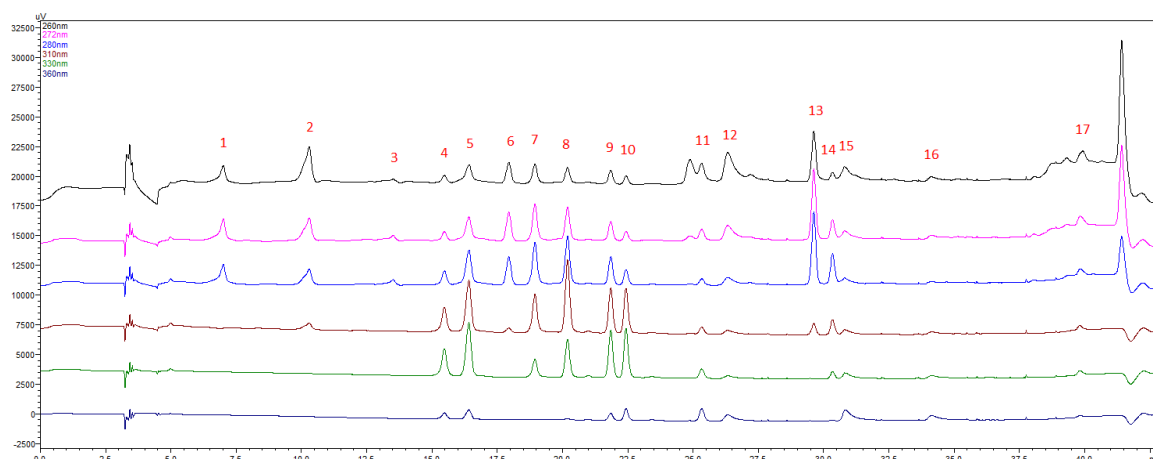
Como o último analito (crisina) passou a ser eluído com tempo de retenção anterior a 40 minutos, os gradientes de eluição e de vazão foram ajustados para reduzir o tempo total da corrida. Após cinco tentativas de modificação, o tempo de corrida foi reduzido para 43 minutos e foram mantidas as condições originais de eluição até 36 minutos e de vazão até 37 minutos, como apresentado nas Tabelas 25 e 26. O cromatograma resultante da injeção da mistura dos 17 padrões ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) sob as condições cromatográficas mencionadas é apresentado na Figura 37.

Tabela 25: Gradiente de eluição final (cromatógrafo Prominence-i LC-2030C).

Tempo (min)	Água acidificada	Metanol
0	100	0
10	80	20
23	60	40
36	40	60
39	30	70
39,5-43	100	0

Tabela 26: Gradiente de vazão final (cromatógrafo Prominence-i LC-2030C).

Tempo (min)	Vazão (mL min ⁻¹)
0-12	0,8
24,5	1,0
37	1,2
39	1,3
42-43	0,8

Figura 27: Cromatograma de mistura de 17 padrões injetada após ajuste das condições cromatográficas (cromatógrafo Prominence-i LC-2030C).

Volume de injeção: 20 μ L. Preto: 260 nm; Rosa: 272 nm; Azul claro: 280 nm; Vermelho: 310 nm; Verde: 330 nm; Azul escuro: 360 nm. 1: ácido gálico; 2: ácido protocatecuico; 3: catequina; 4: ácido clorogênico; 5: ácido cafeico; 6: ácido siríngico; 7: vanilina; 8: ácido p-cumárico; 9: ácido ferúlico; 10: ácido sinápico; 11: rutina; 12: ácido elágico; 13: ácido t-cinâmico; 14: Naringenina; 15: quercetina; 16: kaempferol; 17: crisina.

Com base no cromatograma de mistura de 17 padrões injetada, os parâmetros resolução (R_s), fator de retenção (K), fator de separação (α) e número de pratos teóricos (N), apresentados na Tabela 27, foram calculados para avaliar a eficiência da separação cromatográfica.

Tabela 27: Parâmetros de avaliação da eficiência da separação cromatográfica (cromatógrafo Prominence LC-20AD).

Analito	Tr	Wb	R_s	K	α	N
Ác gálico	7,18	0,64	4,14	0,54	1,260	2014
Ác protocatecuico	10,30	0,87	4,94	0,68	1,113	2243
Catequina	13,51	0,43	3,31	0,75	1,041	15796
Ác clorogênico	15,48	0,76	1,29	0,79	1,016	6638
Ác cafeico	16,42	0,69	2,37	0,80	1,022	9058
Ác siríngico	17,95	0,60	1,47	0,82	1,012	14315
Vanilina	18,95	0,76	1,63	0,83	1,013	9943
Ác p-cumárico	20,20	0,77	2,51	0,84	1,015	11007
Ác ferúlico	21,85	0,55	1,06	0,85	1,005	25257
Ác sinápico	22,44	0,55	5,09	0,85	1,020	26625
Rutina	25,34	0,59	1,30	0,87	1,006	29502
Ác elágico	26,33	0,94	4,46	0,87	1,016	12554
Ác t-cinâmico	29,63	0,54	1,48	0,89	1,003	48169
Naringenina	30,35	0,43	1,18	0,89	1,003	79687
Quercetina	31,02	0,72	4,35	0,89	1,011	29705
Kaempferol	34,14	0,71	9,34	0,90	1,015	36983
Crisina	39,83	0,51	9,34*	0,92	1,015*	97589

*Cálculo em relação ao pico anterior.

Os valores obtidos para os parâmetros de avaliação da eficiência da separação no cromatógrafo Prominence-i LC-2030C foram satisfatórios, segundo os valores ideais recomendados (Cass e Degani, 2011; Collins, Braga e Bonato,

2006; Lanças, 2009): fator de retenção entre 0,5 e 20; fator de separação superior a 1,0; e número de pratos teóricos superior a 2000.

A maioria dos analitos (11) apresentou resoluções superiores 1,50, valor ideal para uma análise quantitativa robusta (Collins, Braga e Bonato, 2006). Para quatro analitos (rutina e ácidos clorogênico, siríngico e trans-cinâmico) foram obtidas resoluções entre 1,50 e 1,25, que é considerando suficiente para uma separação para fins quantitativos (Azevedo et al., 2019). Apenas para ácido ferúlico e naringenina foram calculadas resoluções inferiores a 1,25, porém acima do valor mínimo (1,0) recomendado para obtenção de picos bem resolvidos (Cass e Degani, 2011).

De acordo com os resultados da avaliação dos parâmetros da eficiência da separação cromatográfica, o método pode ser considerado eficiente e seletivo. Diante disso, o método foi validado no cromatógrafo Prominence-i LC-2030C. Destaca-se que a mudança de equipamento CLAE-DAD proporcionou melhorias em relação ao menor consumo de solvente orgânico, conseqüentemente menor geração de resíduos e impacto ambiental, além do aumento da frequência analítica em decorrência da redução do tempo total de corrida cromatográfica.

5.5. Validação do método CLAE-DAD otimizado

5.5.1. Cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence LC-20AD

Foram construídas as curvas analíticas de cada composto no intervalo de concentração de 0,5 a 2,5 mg L⁻¹ para quercetina e kaempferol e de 0,1 a 2,5 mg L⁻¹ para os demais analitos, cada ponto em triplicata. As equações da curva analítica, os parâmetros da linearidade (coeficiente de correlação *r* e *F* experimental) e os limites de detecção e quantificação (LD e LQ) são apresentados na Tabela 28.

Tabela 28: Parâmetros das curvas analíticas (cromatógrafo Prominence LC-20AD).

Analito	Equação de regressão ($y = ax + b$)*	r	F	LD (mg L^{-1})	LQ (mg L^{-1})
Ác gálico	$y = 42286x - 8499,3$	0,9957	458	0,23	0,71
Ác protocatecuico	$y = 44449x - 5362,2$	0,9993	2832	0,09	0,28
Teobromina	$y = 74862x - 11731$	0,9919	182	0,37	1,12
Catequina	$y = 5282,6x + 31,043$	0,9977	883	0,17	0,51
Ác clorogênico	$y = 54808x - 4364,3$	0,9993	2876	0,09	0,28
Ác cafeico	$y = 112315x - 8355,8$	0,9995	3992	0,08	0,24
Ác siríngico	$y = 65740x - 4108,3$	0,9996	4677	0,07	0,22
Vanilina	$y = 80596x - 1894,5$	0,9998	8549	0,05	0,16
Ác p-cumárico	$y = 168192x - 10091$	0,9995	4149	0,08	0,24
Ác ferúlico	$y = 102059x - 6229$	0,9995	4031	0,08	0,24
Ác sinápico	$y = 73727x - 4349,8$	0,9991	2259	0,11	0,32
Rutina	$y = 26865x - 2088,2$	0,9997	6151	0,06	0,19
Ác elágico	$y = 92857x - 1047,2$	0,9937	313	0,28	0,86
Ác t-cinâmico	$y = 143367x - 7965$	0,9996	4733	0,07	0,22
Naringenina	$y = 63893x - 1550,2$	0,9956	451	0,24	0,71
Quercetina	$y = 32114x - 14095$	0,9925	198	0,39	1,18
Kaempferol	$y = 20790x - 7152,3$	0,9941	251	0,35	1,05
Crisina	$y = 40390x - 4851,6$	0,9995	3817	0,08	0,25

*y é a área integrada do pico (mAU) e x é a concentração do analito (mg L^{-1}).

A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação e pelo teste F para o nível de confiança de 95%. Para todos os analitos foram obtidos valores de r superiores a 0,99, atendendo às recomendações da ANVISA e da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*). Os valores de F experimental foram superiores ao valor de F crítico tabelado. Portanto, indica-se que existe uma relação linear entre concentração e sinal (área integrada do pico) para todos os analitos.

A precisão foi avaliada em dois níveis, repetitividade e precisão intermediária (Tabela 29), expressa como o desvio padrão relativo das áreas integradas dos picos para cada analito. A medida de repetitividade do método reflete a concordância entre os resultados de medições sucessivas, realizadas sob as mesmas condições (Cass e Degani, 2011). Para a precisão intra-dia foram realizadas 10 injeções consecutivas da mistura de padrões (1,0 mg L⁻¹). A precisão intermediária permite avaliar o efeito das variações dentro do laboratório, como em análises em dias diferentes (Cass e Degani, 2011). Para a precisão inter-dia foi realizada três injeções da mistura de padrões (1,0 mg L⁻¹) em três dias não consecutivos, sob as mesmas condições.

Tabela 29: Repetitividade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia) (cromatógrafo Prominence LC-20AD).

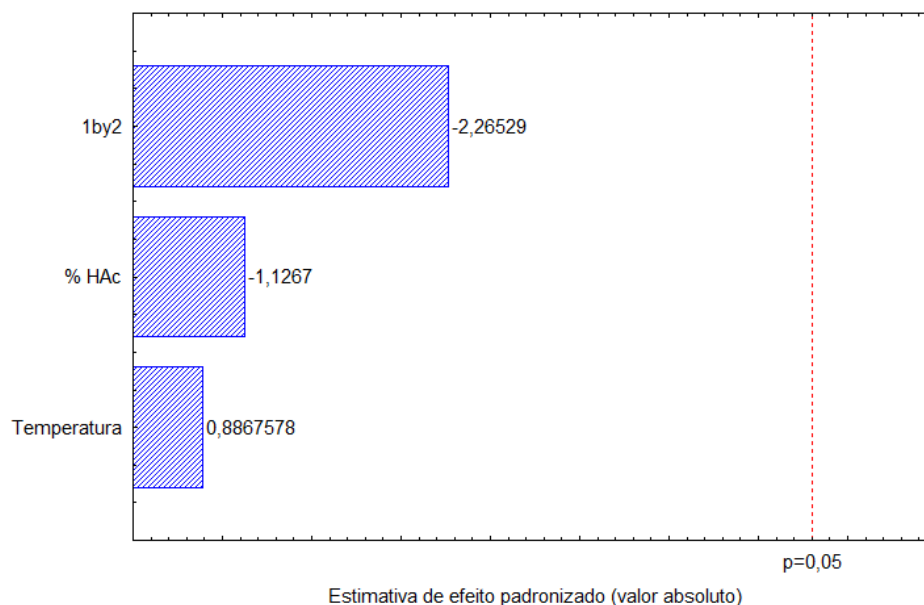
Analito	Desvio padrão relativo (%)	
	Intra-dia	Inter-dia
Ác gálico	4,77	7,58
Ác protocatecuico	1,84	3,98
Teobromina	3,11	6,89
Catequina	5,81	8,62
Ác clorogênico	4,17	7,93
Ác cafeico	1,22	2,67
Ác siríngico	0,33	2,13
Vanilina	3,58	4,57
Ác p-cumárico	0,56	2,55
Ác ferúlico	1,62	2,63
Ác sinápico	3,27	4,58
Rutina	2,45	3,04
Ác elágico	4,43	7,38
Ác t-cinâmico	0,43	2,30
Naringenina	1,66	4,57
Quercetina	8,70	14,03
Kaempferol	7,44	10,87
Crisina	5,03	8,73

Considera-se aceitável valores de desvio padrão relativo de até 20% para os métodos que quantificam compostos bioativos na ordem de ppm (Azevedo, 2019). Foram obtidos valores de desvio padrão relativo de 0,33% a 8,70% para a repetitividade, enquanto para a precisão intermediária foram obtidos valores de 2,13% a 14,03%. Tendo sido verificados valores de desvio padrão relativo dentro do limite aceitável, pode-se afirmar que o método é preciso e há concordância entre os resultados de medições sucessivas realizadas sob as mesmas condições e entre os resultados de um mesmo laboratório.

Para a avaliação da robustez de um método cromatográfico, as variações estudadas devem refletir alterações que podem ocorrer quando o método for aplicado em condições diferentes, como em outros equipamentos ou laboratórios (Ribani, 2004). Em vista disso, a robustez do método otimizado foi avaliada variando-se a composição da fase móvel, quanto ao percentual de ácido acético no solvente, e a temperatura da coluna cromatográfica. A vazão não foi avaliada pois não foi fixada, tendo sido otimizado um gradiente de vazão, de modo que não é viável o uso da condição ótima como ponto central neste caso.

Em razão do número de analitos, foi aplicada a função resposta múltipla, que visa obter uma condição experimental de compromisso entre os fatores investigados e todas as respostas obtidas (Ferreira, 2015). Portanto, as resoluções dos picos dos analitos em cada experimento não foram avaliadas individualmente, foram avaliadas as respostas múltiplas e o resultado do planejamento experimental aplicado é expresso pelo gráfico de Pareto (Figura 28).

Figura 28: Gráfico de Pareto da avaliação da robustez do método de separação (cromatógrafo Prominence LC-20AD).



O gráfico de Pareto demonstrou que, para o nível de confiança de 95%, os fatores avaliados não foram estatisticamente significativos, assim como a interação entre eles. Desta forma demonstra-se que o método é robusto, dentro do domínio experimental estudado, para a variação de 10% na concentração de ácido acético ($1,0 \pm 0,1\%$) na fase móvel e de $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ na temperatura da coluna cromatográfica.

5.5.2. Cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence-i LC-2030C 3D Plus

As curvas analíticas foram construídas na faixa de $0,5$ a $3,0\text{ mg L}^{-1}$, cada ponto em triplicata, para todos os analitos. As equações das curvas analíticas, os coeficientes de correlação (r), os valores de F experimental (nível de confiança de 95%) e os limites (LD e LQ) são apresentados na Tabela 30. Foram obtidos valores de r superiores a $0,99$ e valores de F experimental superiores ao valor de F crítico tabelado, indicando a relação linear entre concentração e sinal (área integrada do pico).

Tabela 30: Parâmetros das curvas analíticas (cromatógrafo Prominence-i LC-2030C).

Analito	Equação de regressão ($y = ax + b$)*	r	F	LD (mg L^{-1})	LQ (mg L^{-1})
Ác gálico	$y = 69058x - 987,92$	0,9988	1628	0,16	0,48
Ác protocatecuico	$y = 132697x - 8605$	0,9997	6821	0,08	0,24
Catequina	$y = 11344x + 3841,1$	0,9979	955	0,21	0,63
Ác clorogênico	$y = 65056x + 5481,7$	0,9973	2215	0,14	0,41
Ác cafeico	$y = 149675x - 15785$	0,9999	20907	0,04	0,13
Ác siríngico	$y = 73260x - 8065,3$	0,9999	32109	0,04	0,11
Vanilina	$y = 92846x - 620,8$	1,0000	71684	0,02	0,07
Ác p-cumárico	$y = 173234x - 16450$	1,0000	44015	0,03	0,09
Ác ferúlico	$y = 106019x - 10833$	0,9998	13240	0,06	0,17
Ác sinápico	$y = 107178x - 10354$	0,9998	12118	0,06	0,18
Rutina	$y = 31435x - 3903$	1,0000	207266	0,01	0,04
Ác elágico	$y = 180471x - 6206,8$	0,9992	2537	0,13	0,39
Ác t-cinâmico	$y = 156741x - 16963$	1,0000	63973	0,03	0,08
Naringenina	$y = 63685x - 6429,1$	0,9995	4436	0,10	0,29
Quercetina	$y = 45981x - 10078$	0,9985	1290	0,18	0,54
Kaempferol	$y = 23417x - 4108,7$	0,9925	263	0,40	1,20
Crisina	$y = 23736x - 10191$	0,9903	153	0,44	1,34

*y é a área integrada do pico (mAU) e x é a concentração do analito (mg L^{-1}).

Comparando os limites de detecção e quantificação apresentados nas Tabelas 28 e 30 observa-se que houve uma melhora de sensibilidade para a maioria dos analitos, tendo sido obtidos menores limites no cromatógrafo Prominence-i LC-2030C, com exceção de ácido clorogênico, catequina, kaempferol e crisina, para os quais foram obtidos melhores limites de detecção e quantificação no cromatógrafo Prominence LC-20AD.

A mistura de padrões ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) foi injetada 10 vezes consecutivas para avaliar a repetitividade (precisão intra-dia) e injetada três vezes em três dias não

consecutivos para avaliar a precisão intermediária (precisão inter-dia). O desvio padrão relativo das áreas integradas dos picos de cada analito são apresentados na Tabela 31. Os valores de desvio padrão relativo estão de acordo com o recomendável, de até 20% para os métodos que quantificam compostos bioativos na ordem de ppm (Azevedo, 2019).

Tabela 31: Repetitividade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia) (cromatógrafo Prominence-i LC-2030C).

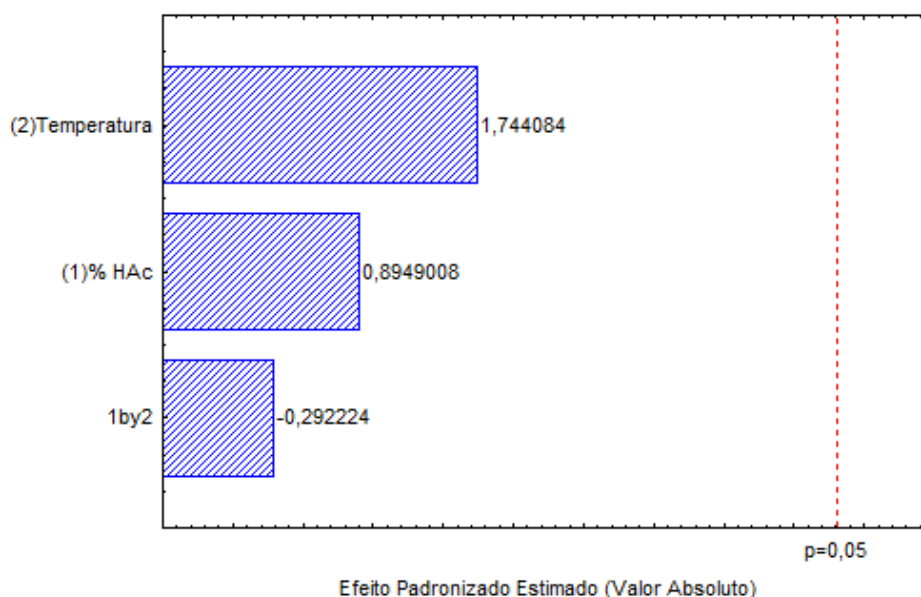
Analito	Desvio padrão relativo (%)	
	Intra-dia	Inter-dia
Ác gálico	3,01	1,46
Ác protocatecuico	0,48	1,37
Catequina	3,17	4,92
Ác clorogênico	1,16	0,38
Ác cafeico	0,51	1,18
Ác siríngico	0,39	0,62
Vanilina	0,60	0,69
Ác p-cumárico	0,58	1,11
Ác ferúlico	0,42	1,12
Ác sinápico	0,45	4,49
Rutina	0,60	1,71
Ác elágico	2,34	1,78
Ác t-cinâmico	0,32	0,21
Naringenina	0,55	4,89
Quercetina	2,22	3,44
Kaempferol	6,82	5,68
Crisina	2,04	2,12

Ao comparar os resultados da precisão nos dois sistemas cromatográficos, apresentados nas Tabelas 29 e 31, verifica-se que o método de separação no cromatógrafo Prominence-i LC-2030C é mais preciso, uma vez que

os valores de desvio padrão relativo foram menores para todos os analitos em relação à precisão intermediária e para a maioria dos analitos quanto à repetitividade. No cromatógrafo Prominence LC-20AD apenas para os ácidos siríngico e p-cumárico foi verificada melhor precisão intra-dia, mas seus respectivos valores de desvio padrão relativo foram próximos ao obtido no cromatógrafo Prominence-i LC-2030C.

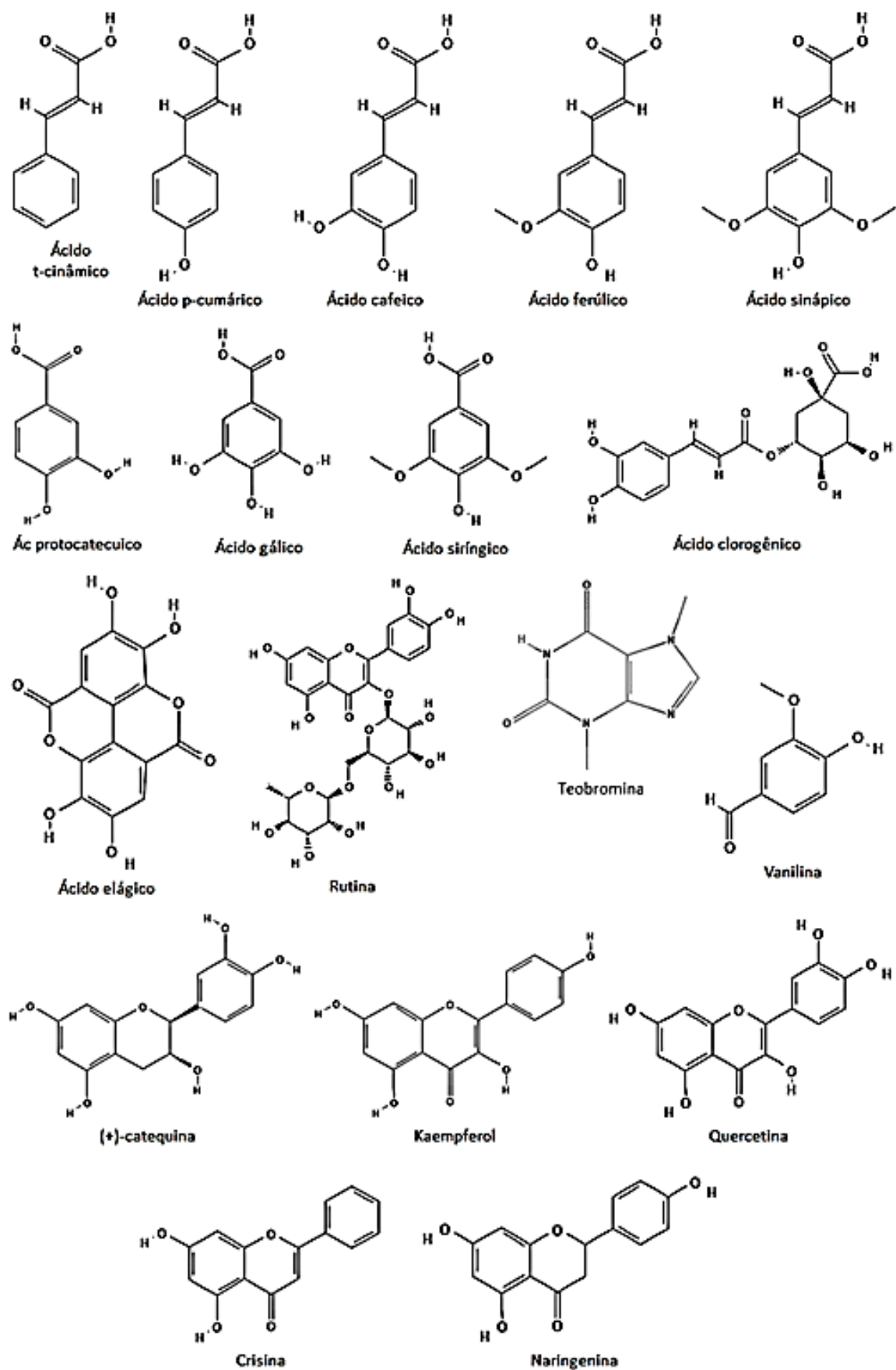
A robustez do método de separação cromatográfica foi avaliada aplicando um planejamento fatorial completo (2^2) e avaliando a resposta múltipla aplicada às resoluções dos picos dos analitos em cada experimento. Foram variadas a composição da fase móvel (percentual de ácido acético) e a temperatura da coluna cromatográfica. O resultado da avaliação da robustez é apresentado pelo gráfico de Pareto (Figura 29), que indica que o método é robusto para a variação de 10% na concentração de ácido acético na fase móvel e de 1 °C na temperatura da coluna cromatográfica, uma vez que os fatores avaliados não foram estatisticamente significativos para o nível de confiança de 95%.

Figura 29: Gráfico de Pareto da avaliação da robustez do método de separação (cromatógrafo Prominence-i LC-2030C).



O processo de validação do método cromatográfico foi realizado com as soluções padrão dos compostos bioativos, fazendo deste método aplicável para a separação, identificação e quantificação destes analitos em diversas matrizes que os contenham. As estruturas químicas dos analitos estão reunidas na Figura 30.

Figura 30: Estruturas químicas dos analitos do método CLAE-DAD otimizado.



Fonte: PubChem, 2020 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A forma trans é a mais comum do ácido cinâmico, tendo sido relatado muitos efeitos benéficos à saúde (Yilmaz, Sova e Ergun, 2018). Os ácidos cinâmicos e seus derivados homólogos são bem conhecidos por suas propriedades antioxidante, antitumoral, antimicrobiana e antibacteriana (Das, Goud e Das, 2019).

O ácido cumárico é um derivado do ácido hidroxicinâmico que ocorre naturalmente em três isômeros (orto-, meta- e para-). O ácido p-cumárico é um dos mais comuns na natureza, encontrado nas plantas como um componente de ligninas e taninos (Boz, 2015), e possui atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória (Ferreira et al., 2019), anticâncer, antidiabética e anti-hiperlipidêmica (Amalan et al., 2016).

O ácido cafeico é um derivado do ácido hidroxicinâmico que possui atividades biológicas, como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticâncer, entre outras (Yilmaz, 2019). O ácido clorogênico possui em sua estrutura química uma porção de ácido cafeico e uma porção de ácido quinínico. O ácido clorogênico é abundante nas plantas e um dos principais polifenóis dietéticos, que possui atividades antioxidante, anti-inflamatória, anticâncer, antidiabéticas, anti-hipertensivas, antilipidêmicas (Limwachiranon et al., 2020), antimicrobiana, neuroprotetora, cardioprotetora e hepatoprotetora (Naveed et al., 2018).

O ácido ferúlico está presente principalmente nas sementes e folhas das plantas, nas formas livre e ligada covalentemente aos polissacarídeos da parede celular, glicoproteínas, poliaminas, lignina e ácidos graxos. O ácido ferúlico é um ácido hidroxicinâmico que possui papel na formação de outros compostos, como vanilina e ácido sinápico, e apresenta atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticâncer, antitrombótica, hepatoprotetora e outras (Kumar e Pruthi, 2014).

O ácido sinápico é um derivado do ácido hidroxicinâmico encontrado em várias plantas comestíveis, nas formas livre e esterificada. Este fitoquímico possui atividades antioxidante, anti-inflamatória e anticâncer, além de ter sido relatado contra várias condições patológicas, como infecções, diabetes e ansiedade (Chen, 2016).

O ácido protocatecuico é um derivado do ácido benzoico encontrado nas plantas, principalmente nas frutas e vegetais. Possui atividades biológicas como antioxidante, antibacteriana, antiviral, anticâncer, antifibrótico (Okai et al., 2016), anti-inflamatória, anti-hiperglicêmica, anti-hipertensiva e cardioprotetora (Masodsai et al., 2019).

O ácido gálico é um ácido hidroxibenzoico que existe principalmente nas formas livre e como parte de taninos. Este fitoquímico possui atividades antifúngica, antiviral (Athankar et al., 2016), antioxidante, anti-inflamatório e anticâncer. É amplamente encontrado nas plantas e em frutas (Zhu, Gu e Shen, 2019). O ácido elágico é um dímero de ácido gálico, que possui atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral, anticâncer (Ceci et al., 2020), antidiabética e cardioprotetora (Alfei et al., 2019).

O ácido siríngico é um derivado do ácido hidroxibenzoico, ao qual foram relacionadas diversas propriedades biológicas, com destaque suas atividades antioxidante, antimicrobiano, antitumoral, antihiperglicêmico (Srinivasan et al., 2014), anticâncer e anti-inflamatória (Srinivasulu et al., 2018).

As catequinas são um grupo de flavonoides, classificadas como flavanois, que não apresentam grupo carbonila no anel heterocíclico. As principais catequinas são: (+)-catequina, (+)-galocatequina, (-)-epicatequina, (-)-epigalocatequina, (-)-epicatequina galato e (-)-epigalocatequina galato. A (+)-catequina apresenta capacidade de inibição da oxidação do LDL (Shahidi e Ambigaipalan, 2015). Entre as propriedades biológicas das catequinas, destacam-se as atividades antioxidante, anti-inflamatória e anticâncer (Musial, Kuban-Jankowska e Gorska-Ponikowska, 2020).

Kaempferol é um flavonoide pertencente a classe flavonol relacionado a diversas atividades biológicas, entre elas: antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral, antidiabética, neuroprotetor e cardioprotetor (Calderon- Montano et al., 2011; Imran et al., 2019).

A rutina é um flavonoide bem conhecido por suas atividades biológicas, como antioxidante, anti-inflamatória, hepatoprotetora (Kalinová, Vrchotová e Tříška, 2018), antimicrobiana, anticâncer e antidiabética. A rutina é um flavonol glicosídeo e a quercetina é uma aglicona formada após a degradação enzimática

da rutina pela rutinosidase. Ambas estão amplamente distribuídas nas plantas (Luthar et al., 2020). A quercetina apresenta atividades antioxidante, anticâncer, anti-inflamatória, antibacteriana e antiviral, além de exibir efeitos antialérgico e de redução da pressão arterial (Kelly, 2011).

Crisina é um flavonoide do grupo das flavonas presente abundantemente em diversas plantas e apresenta muitas atividades farmacológicas. Foram relatadas propriedades antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena, neuroprotetora, antiviral, antibacteriana, antidiabética, antidepressiva, antiasmática e antiartrítica (Mani e Natesan, 2018).

Naringenina é um flavonoide da classe das flavanonas, amplamente presente em espécies cítricas. Foram relatadas propriedades biológicas e farmacológicas, como antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética, imunomoduladora, hepatoprotetora e nefroprotetora (Hartogh e Tsiani, 2019).

Vanilina é um aldeído fenólico amplamente utilizado nas indústrias de alimentos, bebidas e cosméticos como agente aromatizante (Zhao et al., 2018). A vanilina, principal componente da baunilha e presente em pequenas quantidades em outras plantas, apresenta propriedades antioxidante, antimicrobiana (Walton, Mayer e Narbad, 2003), antiangiogênica, antimutagênica, antitumoral e anticâncer (Bezerra, Soares e Sousa, 2016).

Teobromina é um alcaloide metilxantina, de estrutura semelhante ao ácido úrico, conhecida por sua atividade antioxidante (Azam et al., 2003). Trata-se da principal metilxantina do cacau, também presente em seus produtos, como chocolate, além de ser encontrada em chás. Estudos têm associado a teobromina a vários benefícios à saúde, exibindo atividades antitumoral, anti-inflamatória, antitussígena, quimiopreventiva e diurética (Santin, Gargano e Oliveira, 2015).

Conforme a breve discussão apresentada, destaca-se que os compostos bioativos do método cromatográfico validado exibem ampla variedade de propriedades, com potenciais aplicabilidades, como tecnológicas (nas áreas de alimentos e saúde) e farmacológicas. Portanto, há interesse em determinar esses metabólitos secundários em materiais vegetais, especialmente em alimentos, pois podem justificar os efeitos à saúde relacionados ao seu consumo. Nesse sentido, a composição de farinhas integrais foi investigada, como apresentado a seguir.

5.6. Separação, identificação e quantificação de compostos bioativos por CLAE-DAD

5.6.1. Aplicação do método CLAE-DAD desenvolvido

O método CLAE-DAD otimizado e validado foi aplicado para a separação, identificação e quantificação de compostos bioativos e fenólicos presentes em farinhas integrais de grãos de quinoa branca (*Chenopodium quinoa* W.) e de sementes de chia (*Salvia hispanica* L.).

Foram construídas curvas analíticas com adição da mistura de padrões aos extratos de farinha, para a faixa de 1,0 a 3,0 mg L⁻¹, além do 0 que é a amostra sem adição, com triplicata de cada ponto. As equações de regressão, os coeficientes de correlação, valores de F experimental e os limites de detecção e quantificação das curvas são apresentados nas Tabelas 32 e 33.

Tabela 32: Parâmetros das curvas com adição de padrão a extrato de quinoa.

Analito	Equação de regressão ($y = ax + b$)*	r	F	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Ác gálico	$y = 56014x - 8664,9$	0,9934	299	0,37	1,12
Ác protocatecuico	$y = 118161x - 12086$	0,9963	537	0,28	0,84
Catequina	$y = 10121x - 1647,6$	0,9924	260	0,40	1,20
Ác clorogênico	$y = 52807x + 5936,5$	0,9948	285	0,32	0,97
Ác cafeico	$y = 133092x - 8652,2$	0,9958	475	0,29	0,89
Ác siríngico	$y = 60650x + 3730,1$	0,9984	1217	0,18	0,56
Vanilina	$y = 84575x + 577,21$	0,9996	4531	0,09	0,29
Ác p-cumárico	$y = 152251x + 34211$	0,9993	2753	0,12	0,37
Ác ferúlico	$y = 96231x + 4707,4$	0,9992	2587	0,13	0,38
Ác sinápico	$y = 101007x + 5672,8$	0,9991	2279	0,13	0,41
Rutina	$y = 28286x + 12879$	0,9995	3732	0,10	0,32
Ác elágico	$y = 151717x - 23051$	0,9878	161	0,50	1,53
Ác t-cinâmico	$y = 138747x - 2281,1$	0,9994	3352	0,11	0,33
Naringenina	$y = 56985x + 1462,7$	0,9991	2132	0,14	0,42
Quercetina	$y = 37765x - 5118,4$	0,9941	335	0,35	1,06
Kaempferol	$y = 24849x - 1043,1$	0,9977	857	0,22	0,66
Crisina	$y = 24992x - 1970,1$	0,9920	247	0,41	1,23

*y é a área integrada do pico (mAU) e x é a concentração do analito (mg L⁻¹).

Tabela 33: Parâmetros das curvas com adição de padrão a extrato de chia.

Analito	Equação de regressão ($y = ax + b$)*	r	F	LD (mg L^{-1})	LQ (mg L^{-1})
Ác gálico	$y = 63365x + 3482,1$	0,9860	122	0,58	1,75
Ác protocatecuico	$y = 124723x + 9484,2$	0,9903	203	0,45	1,36
Catequina	$y = 9499,7x - 1230,9$	0,9942	344	0,34	1,04
Ác clorogênico	$y = 64807x - 2642,8$	0,9959	488	0,29	0,88
Ác cafeico	$y = 135754x + 35160$	0,9971	679	0,25	0,74
Ác siríngico	$y = 77902x + 12109$	0,9890	178	0,48	1,45
Vanilina	$y = 96043x + 12243$	0,9929	278	0,38	1,16
Ác p-cumárico	$y = 164479x + 7949,1$	0,9882	166	0,50	1,50
Ác ferúlico	$y = 102266x + 5871$	0,9930	282	0,38	1,15
Ác sinápico	$y = 99094x + 9248,8$	0,9913	227	0,42	1,28
Rutina	$y = 29541x + 1047,2$	0,9958	472	0,29	0,89
Ác elágico	$y = 153390x - 9678,4$	0,9871	153	0,52	1,57
Ác t-cinâmico	$y = 147886x + 150764$	0,9926	267	0,39	1,18
Naringenina	$y = 60132x + 802,17$	0,9892	182	0,47	1,43
Quercetina	$y = 38879x - 2322,1$	0,9950	397	0,32	0,97
Kaempferol	$y = 23670x - 3958,6$	0,9917	237	0,42	1,26
Crisina	$y = 19630x + 3728,1$	0,9893	91	0,57	1,73

*y é a área integrada do pico (mAU) e x é a concentração do analito (mg L^{-1}).

Para todos os analitos foram obtidos $r \geq 0,99$ e F experimental $>$ F crítico tabelado, indicando a linearidade das curvas na faixa de concentração estudada. Comparando-se as inclinações das curvas com adição de padrão às amostras (Tabelas 32 e 33) e das curvas dos padrões (Tabela 30) foi avaliada a ocorrência de efeito matriz.

Foi observado que as curvas são paralelas e as razões entre as inclinações são em torno de 1, variando entre 0,80 a 1,06 para a matriz farinha de quinoa e com variação de 0,83 e 1,06 no caso da farinha de chia. O efeito matriz (C%) calculado para a farinha de quinoa foi de -6,1 a 19,9, enquanto para a farinha de chia foi de -6,3 a 15,4. Para a faixa de $-20\% < C\% < 20\%$ o efeito matriz é considerado baixo (Cerqueira et al., 2011). Assim, demonstra-se que o

método é seletivo e não há interferência das matrizes avaliadas na determinação dos analitos. O estudo da seletividade permite garantir que o sinal medido não é influenciado por interferentes (Ribani et al., 2004). Desta forma, as curvas de calibração externa podem ser aplicadas para a quantificação dos compostos bioativos nos extratos das farinhas integrais de chia e de quinoa.

Para a avaliação da exatidão, as amostras foram enriquecidas com o padrão de ácido gálico em três concentrações conhecidas, em triplicata, e submetidas à extração. Para as concentrações finais de 1,25, 3 e 6 mg L⁻¹ de ácido gálico foram obtidas porcentagens de recuperação, respectivamente, de 75 ± 6, 81 ± 6 e 74 ± 2 para a farinha de quinoa e de 88 ± 7, 78 ± 4 e 81 ± 1 para a farinha de chia. Sendo assim, indica-se que o método é exato, pois para a análise de amostras complexas é aceitável o intervalo de recuperação entre 50 e 120% (Ribani et al., 2004).

Tendo sido confirmada a aplicabilidade do método otimizado para a separação, identificação e quantificação dos analitos em farinhas integrais de grãos de quinoa branca e de sementes de chia, foi realizada a investigação da composição de diversas amostras destas farinhas.

5.6.1.1. Farinha integral de quinoa (*Chenopodium quinoa* W.)

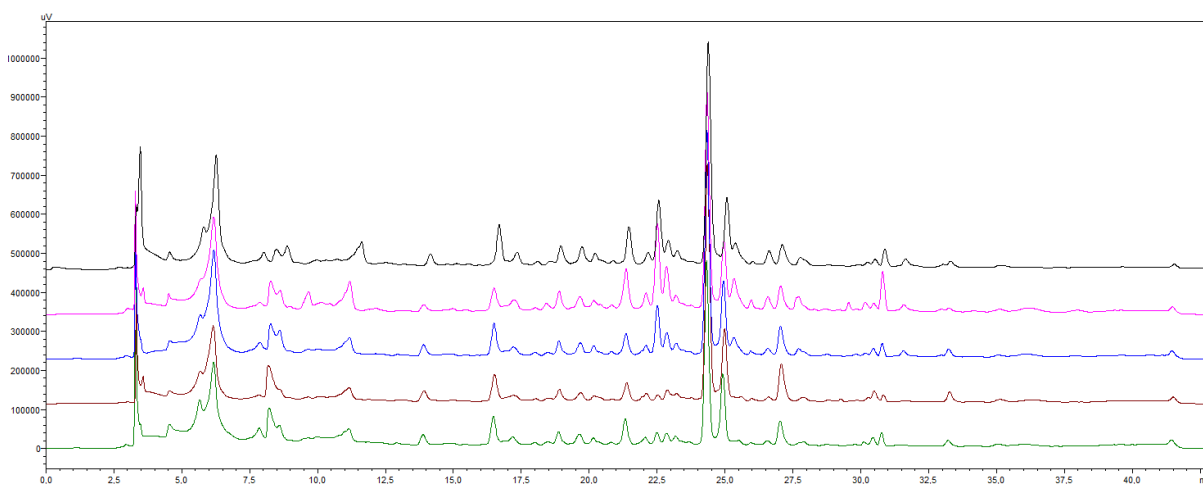
Na Tabela 34 são apresentadas as concentrações dos compostos bioativos identificados em amostras de farinha integral de grãos de quinoa branca, cujos cromatogramas são exibidos na Figura 31. Os cromatogramas evidenciaram que o perfil cromatográfico das amostras de farinha de quinoa analisadas é semelhante.

Tabela 34: Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) dos compostos bioativos em amostras farinha de quinoa branca.

Analito	QA	QB	QC	QD	QE
Ác protocatecuico	$1,61 \pm 0,19$	$1,27 \pm 0,15$	$1,19 \pm 0,04$	$0,91 \pm 0,04$	$1,59 \pm 0,10$
Ác clorogênico	$1,21 \pm 0,06$	$1,49 \pm 0,01$	$0,85 \pm 0,07$	$1,26 \pm 0,02$	$0,67 \pm 0,04$
Ác cafeico	$0,73 \pm 0,13$	$0,49 \pm 0,09$	$0,39 \pm 0,01$	$0,53 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,02$
Ác siríngico	$2,19 \pm 0,11$	$2,39 \pm 0,28$	$2,73 \pm 0,26$	$3,10 \pm 0,01$	$3,34 \pm 0,25$
Vanilina	$0,16 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,02$	n.d.	n.d.	n.d.
Ác p-cumárico	$2,88 \pm 0,02$	$3,07 \pm 0,26$	$2,77 \pm 0,28$	$2,68 \pm 0,05$	$3,42 \pm 0,11$
Ác ferúlico	$1,82 \pm 0,13$	$1,90 \pm 0,13$	$3,55 \pm 0,11$	$3,16 \pm 0,03$	$4,94 \pm 0,31$
Ác sinápico	$19,81 \pm 1,06$	$15,03 \pm 0,91$	$7,15 \pm 1,79$	$22,89 \pm 1,28$	$28,63 \pm 1,07$
Rutina	$34,91 \pm 5,15$	$14,32 \pm 0,04$	$13,04 \pm 0,30$	$44,07 \pm 2,18$	$52,83 \pm 3,92$
Ác elágico	$4,26 \pm 0,06$	$2,84 \pm 0,11$	$2,21 \pm 0,18$	$2,99 \pm 0,16$	$6,55 \pm 0,72$
Ác t-cinâmico	$0,47 \pm 0,07$	$0,55 \pm 0,04$	$0,55 \pm 0,01$	$0,58 \pm 0,01$	$0,58 \pm 0,03$
Naringenina	$3,35 \pm 0,32$	$3,85 \pm 0,56$	$4,40 \pm 0,02$	$3,29 \pm 0,02$	$2,68 \pm 0,01$
Quercetina	$2,33 \pm 0,25$	$1,65 \pm 0,12$	$1,16 \pm 0,02$	$1,26 \pm 0,01$	$1,45 \pm 0,08$
Kaempferol	$1,13 \pm 0,09$	$0,75 \pm 0,01$	$0,80 \pm 0,03$	n.d.	n.d.
Crisina	n.d.	$0,45 \pm 0,09$	$0,47 \pm 0,05$	$0,47 \pm 0,02$	n.d.

Q: quinoa. A segunda letra da sigla distingue a origem da amostra. n.d.: não detectado ou abaixo do LD. Média \pm desvio padrão.

Figura 31: Cromatogramas de amostras de farinha integral de grãos de quinoa branca.



Max plot 260-360 nm. Preto: QE; Rosa: QA; Azul: QD; Vermelho: QB; Verde: QC.

Entre os compostos bioativos identificados nas amostras analisadas de farinha de quinoa branca, maiores concentrações foram determinadas para ácido sinápico (7,15 a 28,63 $\mu\text{g g}^{-1}$) e rutina (13,04 a 52,83 $\mu\text{g g}^{-1}$). Não foram detectados ácido gálico e catequina, embora a presença desses compostos fenólicos tenha sido relatada em sementes de quinoa (Tang et al., 2016; Hemalatha et al., 2016). Alguns dos compostos fenólicos (vanilina, kaempferol e crisina) não foram detectados em algumas das amostras analisadas.

É sabido que cada espécie de planta sintetiza uma mistura característica de metabólitos secundários, entretanto, essa produção depende das necessidades particulares de cada planta, principalmente do que se refere à adaptação ao ambiente (Kabera et al., 2014). Desta forma justifica-se que produtos vegetais de uma mesma espécie de planta e de diferentes origens, como as farinhas de grãos de quinoa branca analisadas neste trabalho, apresentem diferenças na sua composição, devido à influência das condições ambientais, dentre outros fatores.

Rutina, quercetina e kaempferol são flavonoides bem conhecidos dos grãos de quinoa (Lin et al., 2019). Hemalatha e colaboradores (2016) também verificaram a rutina como principal flavonoide da quinoa, em concentrações superiores aos demais flavonoides quantificados, como quercetina, naringenina e kaempferol, tal como nas amostras de farinha analisadas neste trabalho. Crisina foi um dos flavonoides determinados em farinha de quinoa por Hanan, Nahla e Abdelaleem (2019), que, assim como neste estudo, também não detectaram catequina nas amostras analisadas.

A presença de ácido cinâmico e seus derivados (ácidos clorogênico, cafeico, p-cumárico, ferúlico e sinápico) e de derivados de ácido benzoico (vanilina e ácidos protocatecuico e siríngico) na composição de grãos de quinoa já foi relatada em diversos estudos, conforme destacado por Lin e colaboradores (2019) em artigo de revisão sobre os metabólitos secundários da quinoa. O ácido elágico, quantificado em todas as amostras analisadas, foi descrito por Sohaimy e colaboradores (2018) como o principal composto fenólico do extrato metanólico de farinha de quinoa.

5.6.1.2. Farinha integral de chia (*Salvia hispanica* L.)

As concentrações dos compostos bioativos em amostras de farinha integral de sementes de chia são apresentadas nas Tabelas 35 e 36. Não foi detectada a presença de vanilina nas amostras analisadas. Os compostos detectados já foram relatados como componentes de sementes de chia em outros estudos: quercetina, kaempferol, ácido cinâmico, ácido clorogênico, ácido cafeico (Kaur e Bains, 2020), ácido p-cumárico, crisina (Abdel-Aty et al., 2021), naringenina (Amato et al., 2015), ácido elágico, ácido protocatecuico, ácido ferúlico, ácido sinápico, rutina, (Rahman, Camargo e Shahidi, 2017), ácido gálico (Martínez-Cruz e Paredes-López, 2014) e catequina (Ghafoor et al., 2021).

Entre os compostos bioativos identificados, a catequina (30,95 a 263,71 $\mu\text{g g}^{-1}$), o ácido trans-cinâmico (19,64 a 238,56 $\mu\text{g g}^{-1}$) e o ácido ferúlico (1,16 a 39,12 $\mu\text{g g}^{-1}$) apresentaram maiores concentrações. Parte dos compostos fenólicos (quercetina, kaempferol, naringenina, crisina e ácidos elágico, clorogênico, sinápico, gálico e siríngico) não foi identificada em algumas das amostras. Além disso, a concentração dos compostos quantificados variou muito entre as amostras analisadas, com destaque à variação das concentrações de catequina e ácido trans-cinâmico.

A produção de metabólitos secundários é regulada por processos adaptativos, atendendo a demandas específicas da planta e em resposta a vários fatores bióticos e abióticos, que podem influenciar qualitativa e quantitativamente sua composição, levando ao acúmulo ou ausência de certos metabólitos em todas as partes da planta (Ribeiro et al., 2019; Ribeiro et al., 2020). Portanto, devido à forte influência do ambiente ao qual a planta pertence em sua produção de metabólitos secundários (Gobbo-Neto e Lopes 2007), justifica-se o fato de amostras vegetais da mesma espécie, mas de diferentes origens, apresentarem variações em sua composição, tal qual observado para as farinhas de chia analisadas. Dessa forma também pode ser explicada a diferença entre os resultados deste trabalho e os divulgados em outros estudos.

Tabela 35: Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) de ácidos fenólicos em amostras de farinha integral de chia.

Amostra	Ác. proto-catecuico	Ácido elágico	Ácido gálico	Ácido siríngico	Ácido <i>p</i> -cumárico	Ác. cloro-gênico	Ácido cafeico	Ácido ferúlico	Ácido sinápico	
Farinha comercial	CA	7,35 ± 0,20	0,47 ± 0,07	0,67 ± 0,01	1,19 ± 0,07	2,91 ± 0,35	1,09 ± 0,04	2,23 ± 0,20	33,95 ± 0,93	n.d.
	CB	3,70 ± 0,08	n.d.	0,71 ± 0,09	1,03 ± 0,02	3,27 ± 0,37	1,12 ± 0,01	2,13 ± 0,15	26,33 ± 0,51	n.d.
	CC	7,42 ± 0,06	0,80 ± 0,06	1,98 ± 0,03	2,31 ± 0,35	1,39 ± 0,03	1,43 ± 0,12	2,50 ± 0,02	3,47 ± 0,17	n.d.
	CD	6,43 ± 0,33	5,96 ± 0,73	1,41 ± 0,01	2,22 ± 0,09	1,65 ± 0,15	1,38 ± 0,05	1,70 ± 0,02	2,23 ± 0,02	1,00 ± 0,03
	CE	4,68 ± 0,10	n.d.	n.d.	1,02 ± 0,07	5,50 ± 0,06	1,12 ± 0,01	1,45 ± 0,01	7,44 ± 0,08	0,90 ± 0,01
	CF	3,16 ± 0,07	0,44 ± 0,05	1,34 ± 0,06	1,24 ± 0,07	2,78 ± 0,21	0,88 ± 0,06	2,68 ± 0,17	39,12 ± 6,65	n.d.
	CG	3,08 ± 0,04	n.d.	0,91 ± 0,03	1,15 ± 0,01	0,95 ± 0,01	0,91 ± 0,08	1,97 ± 0,12	31,75 ± 1,98	n.d.
	CH	2,58 ± 0,07	0,67 ± 0,06	0,58 ± 0,01	1,00 ± 0,03	2,42 ± 0,13	n.d.	1,71 ± 0,03	24,69 ± 0,29	n.d.
	CI	2,70 ± 0,17	0,50 ± 0,07	0,48 ± 0,02	0,97 ± 0,02	3,02 ± 0,13	0,89 ± 0,07	1,73 ± 0,14	19,72 ± 0,43	n.d.
	CJ	3,45 ± 0,03	0,47 ± 0,03	0,67 ± 0,04	1,09 ± 0,05	2,78 ± 0,51	n.d.	2,00 ± 0,38	20,45 ± 0,75	n.d.
Farinha produzida	CK	3,69 ± 0,19	0,99 ± 0,35	0,81 ± 0,16	n.d.	1,53 ± 0,36	4,18 ± 0,19	24,94 ± 0,16	1,16 ± 0,11	1,02 ± 0,04
	CL	2,12 ± 0,06	0,44 ± 0,01	0,49 ± 0,02	0,96 ± 0,02	2,14 ± 0,02	n.d.	1,66 ± 0,01	20,91 ± 0,97	n.d.
	CM	3,65 ± 0,23	n.d.	0,62 ± 0,08	1,12 ± 0,04	3,82 ± 0,15	n.d.	1,88 ± 0,13	20,22 ± 1,17	0,96 ± 0,03
	CN	2,45 ± 0,11	n.d.	0,63 ± 0,03	0,99 ± 0,03	2,25 ± 0,14	0,90 ± 0,06	1,82 ± 0,03	14,86 ± 2,04	1,15 ± 0,11
	CO	3,30 ± 0,09	1,06 ± 0,14	n.d.	n.d.	1,86 ± 0,20	n.d.	1,79 ± 0,18	6,36 ± 0,18	1,34 ± 0,05
	CP	8,39 ± 0,57	0,47 ± 0,10	0,78 ± 0,01	1,09 ± 0,15	3,32 ± 0,07	5,25 ± 0,62	1,65 ± 0,16	5,72 ± 0,18	1,08 ± 0,01
	CR	3,76 ± 0,38	1,60 ± 0,19	0,68 ± 0,04	1,43 ± 0,06	3,34 ± 0,24	1,44 ± 0,16	1,95 ± 0,08	17,29 ± 0,05	n.d.
	CS	2,72 ± 0,26	0,92 ± 0,10	0,88 ± 0,18	n.d.	4,12 ± 0,93	0,88 ± 0,02	2,32 ± 0,07	2,32 ± 0,06	1,02 ± 0,02
	CT	1,37 ± 0,05	n.d.	1,37 ± 0,06	n.d.	2,22 ± 0,17	1,06 ± 0,02	1,74 ± 0,15	19,19 ± 4,33	n.d.
	CV	5,90 ± 0,01	3,05 ± 0,52	1,23 ± 0,17	1,06 ± 0,02	0,92 ± 0,04	6,91 ± 0,39	1,79 ± 0,01	2,49 ± 0,14	n.d.
CX (branca)	3,94 ± 0,19	0,42 ± 0,01	0,58 ± 0,05	1,02 ± 0,02	2,77 ± 0,16	1,53 ± 0,19	2,24 ± 0,17	17,46 ± 1,48	n.d.	
CY (preta)	3,75 ± 0,06	n.d.	0,58 ± 0,03	1,10 ± 0,02	3,32 ± 0,28	1,32 ± 0,09	2,27 ± 0,09	18,54 ± 0,67	n.d.	

n.d.: não detectado ou abaixo do LD. Média ± desvio padrão.

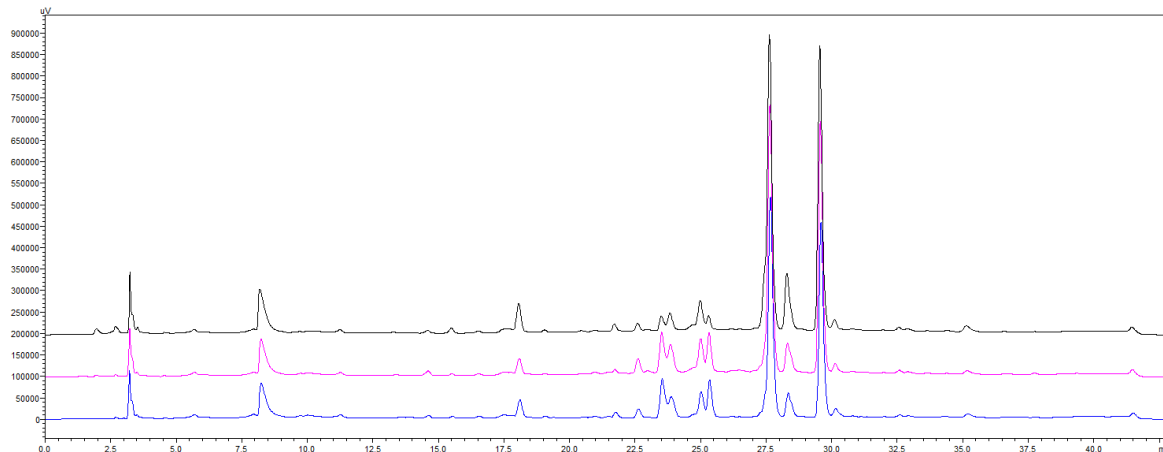
Tabela 36: Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) de ácido trans-cinâmico e flavonoides em amostras de farinha integral de chia.

Amostra	Ác t-cinâmico	Catequina	Rutina	Quercetina	Kaempferol	Naringenina	Crisina	
Farinha comercial	CA	197,50 ± 9,21	210,75 ± 4,19	5,47 ± 0,12	n.d.	2,67 ± 0,09	1,75 ± 0,13	5,48 ± 0,23
	CB	136,29 ± 0,10	145,27 ± 2,08	10,27 ± 0,22	3,39 ± 0,05	2,79 ± 0,04	0,99 ± 0,02	12,81 ± 1,40
	CC	45,03 ± 0,08	93,06 ± 3,88	5,51 ± 0,01	n.d.	7,10 ± 0,13	n.d.	46,23 ± 0,10
	CD	33,33 ± 0,06	32,12 ± 0,58	9,61 ± 0,08	n.d.	32,95 ± 0,91	n.d.	8,48 ± 0,73
	CE	32,06 ± 2,62	30,95 ± 1,60	7,84 ± 0,29	3,18 ± 0,08	26,10 ± 0,93	1,26 ± 0,08	14,15 ± 0,78
	CF	168,89 ± 3,00	170,54 ± 2,51	3,41 ± 0,09	1,82 ± 0,01	2,10 ± 0,08	1,90 ± 0,18	n.d.
	CG	137,53 ± 2,26	140,72 ± 1,19	3,17 ± 0,02	n.d.	2,37 ± 0,10	1,37 ± 0,17	n.d.
	CH	166,50 ± 0,61	139,66 ± 1,05	2,94 ± 0,03	1,98 ± 0,03	n.d.	1,38 ± 0,27	n.d.
	CI	153,66 ± 7,80	154,38 ± 1,51	3,06 ± 0,02	1,84 ± 0,03	2,56 ± 0,13	5,71 ± 0,18	n.d.
Farinha produzida	CJ	238,56 ± 6,96	120,68 ± 3,10	3,08 ± 0,25	n.d.	n.d.	5,18 ± 0,30	n.d.
	CK	19,64 ± 1,52	44,04 ± 0,36	1,63 ± 0,11	2,80 ± 0,39	2,98 ± 0,25	1,15 ± 0,02	n.d.
	CL	129,29 ± 0,66	131,13 ± 3,01	2,35 ± 0,01	1,85 ± 0,03	n.d.	1,20 ± 0,12	n.d.
	CM	147,13 ± 4,09	103,06 ± 5,45	4,03 ± 0,65	n.d.	4,26 ± 0,29	1,59 ± 0,32	n.d.
	CN	136,51 ± 4,80	153,75 ± 7,58	3,53 ± 0,13	1,84 ± 0,03	11,89 ± 0,12	2,94 ± 0,41	n.d.
	CO	149,66 ± 9,10	67,99 ± 4,00	2,60 ± 0,23	2,01 ± 0,04	1,95 ± 0,01	6,69 ± 1,49	n.d.
	CP	124,71 ± 3,30	96,02 ± 2,22	3,64 ± 0,17	2,97 ± 0,35	2,06 ± 0,28	2,13 ± 0,76	7,38 ± 0,19
	CR	178,82 ± 2,89	84,89 ± 0,90	3,21 ± 0,29	2,79 ± 0,20	2,08 ± 0,07	1,91 ± 0,20	n.d.
	CS	39,64 ± 2,96	49,89 ± 1,17	1,57 ± 0,06	3,65 ± 0,21	2,25 ± 0,09	n.d.	n.d.
	CT	135,84 ± 3,31	263,71 ± 14,54	3,14 ± 0,23	n.d.	2,45 ± 0,01	n.d.	n.d.
CV	39,10 ± 1,79	79,77 ± 0,16	1,96 ± 0,05	2,25 ± 0,09	3,26 ± 0,02	n.d.	19,03 ± 4,55	
CX (branca)	146,75 ± 8,19	76,35 ± 2,63	3,68 ± 0,18	n.d.	n.d.	1,68 ± 0,03	n.d.	
CY (preta)	178,05 ± 1,02	85,78 ± 3,15	3,82 ± 0,15	n.d.	n.d.	1,85 ± 0,06	n.d.	

n.d.: não detectado ou abaixo do LD. Média ± desvio padrão.

A Figura 32 reúne cromatogramas de amostras de farinha de chia, comparando as farinhas preparadas com a mistura de sementes, somente com sementes pretas e apenas com sementes brancas. Essa figura destaca que o perfil cromatográfico das amostras é semelhante. E como pode ser verificado nas Tabelas 37 e 38, não há grande variação entre os compostos bioativos determinados na farinha de semente de chia branca e na farinha de chia preta. Diante disto, sugere-se que a proporção de sementes de chia pretas e brancas na mistura para a produção da farinha integral não deve influenciar sua composição fenólica.

Figura 32: Cromatogramas de amostras de farinha integral de sementes de chia.



Max plot 260-360 nm. Volume de injeção: 20 μ L. Preto: extrato de farinha de sementes de chia preta e branca (mistura); Rosa: extrato de farinha de sementes de chia preta; Azul: extrato de farinha de sementes de chia branca.

5.6.1.3. Farinha de chia adulterada

As amostras de farinha de chia intencionalmente adulteradas, bem como as amostras de adulterantes, foram analisadas para a determinação do teor de compostos bioativos (Tabela 37). Vanilina não foi detectada nas amostras analisadas. Catequina (14,09 a 83,20 μ g g^{-1}) e ácido trans-cinâmico (1,73 a 103,14 μ g g^{-1}) foram os compostos predominantes nas amostras. A composição das sementes e da farinha de chia foi discutida na seção anterior.

Tabela 37: Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) de compostos bioativos em amostras adulteradas de farinha de chia e seus adulterantes.

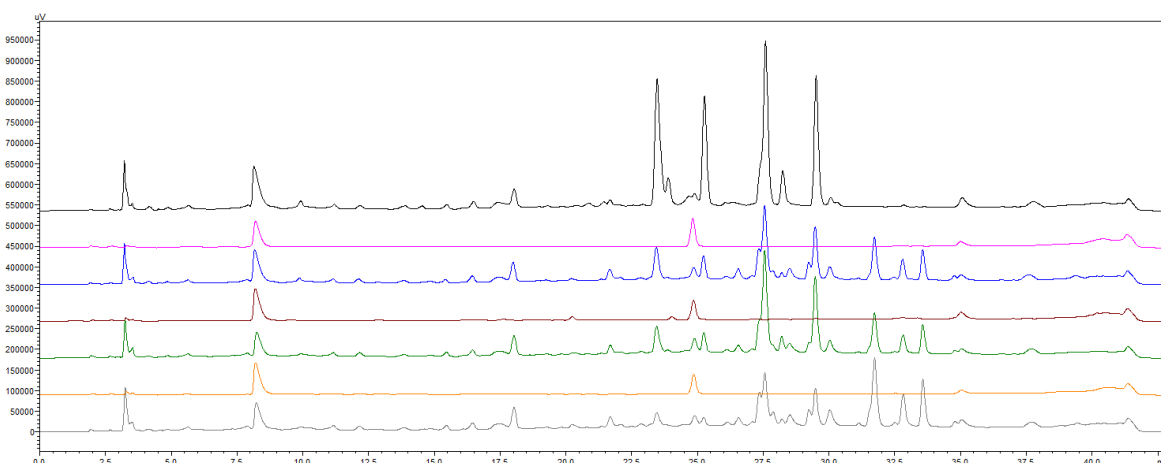
Analito	FC	M5	M10	FM	A5	A10	T5	T10	FT
Ác gálico	0,79 ± 0,02	0,65 ± 0,05	0,53 ± 0,04	n.d.	0,72 ± 0,15	0,54 ± 0,06	0,68 ± 0,05	0,60 ± 0,01	n.d.
Ác protocatecuico	9,00 ± 0,82	7,76 ± 0,40	7,70 ± 0,28	0,75 ± 0,01	9,00 ± 0,53	8,00 ± 0,40	7,95 ± 0,29	8,14 ± 0,57	n.d.
Catequina	83,20 ± 2,62	62,38 ± 3,54	58,94 ± 4,34	n.d.	63,52 ± 7,96	14,09 ± 0,95	25,70 ± 1,57	21,96 ± 4,13	n.d.
Ác clorogênico	4,50 ± 1,00	2,31 ± 0,34	2,03 ± 0,21	n.d.	3,02 ± 0,27	2,83 ± 0,26	3,12 ± 0,64	3,30 ± 0,25	n.d.
Ác cafeico	1,70 ± 0,14	1,56 ± 0,20	1,66 ± 0,08	n.d.	1,77 ± 0,09	1,71 ± 0,02	1,68 ± 0,04	1,64 ± 0,01	n.d.
Ác siríngico	1,09 ± 0,10	0,99 ± 0,05	1,16 ± 0,01	1,81 ± 0,18	1,20 ± 0,07	0,99 ± 0,04	1,20 ± 0,16	1,06 ± 0,03	1,32 ± 0,05
Ác p-cumárico	3,32 ± 0,05	1,35 ± 0,35	1,83 ± 0,39	n.d.	1,78 ± 0,28	1,30 ± 0,09	1,17 ± 0,21	1,58 ± 0,34	1,19 ± 0,01
Ác ferúlico	4,45 ± 0,52	4,96 ± 1,41	5,86 ± 1,12	1,25 ± 0,02	5,86 ± 0,75	3,47 ± 0,38	3,91 ± 0,29	4,58 ± 0,91	n.d.
Ác sinápico	1,07 ± 0,01	1,06 ± 0,10	1,27 ± 0,32	n.d.	1,09 ± 0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Rutina	4,62 ± 0,17	5,52 ± 0,69	4,76 ± 0,97	n.d.	6,26 ± 0,71	6,00 ± 0,48	5,70 ± 0,48	5,88 ± 0,42	n.d.
Ác elágico	1,28 ± 0,06	1,18 ± 0,16	2,62 ± 0,22	0,69 ± 0,04	1,37 ± 0,57	1,55 ± 0,24	1,33 ± 0,32	1,93 ± 0,33	0,51 ± 0,01
Ác t-cinâmico	103,14 ± 4,12	50,32 ± 4,35	85,37 ± 3,20	2,02 ± 0,31	91,01 ± 6,79	40,30 ± 1,60	47,28 ± 2,40	56,78 ± 5,43	1,73 ± 0,15
Naringenina	2,00 ± 0,59	1,00 ± 0,08	2,60 ± 0,41	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetina	2,68 ± 0,42	2,41 ± 0,12	1,54 ± 0,34	n.d.	2,18 ± 0,49	2,84 ± 0,35	2,48 ± 0,24	2,74 ± 0,55	n.d.
Kaempferol	2,04 ± 0,20	2,37 ± 0,39	2,36 ± 0,14	n.d.	2,50 ± 0,39	2,68 ± 0,24	2,61 ± 0,21	2,66 ± 0,22	n.d.
Crisina	8,40 ± 1,37	2,73 ± 0,42	3,51 ± 0,72	1,65 ± 0,30	3,62 ± 0,79	3,86 ± 0,45	3,83 ± 0,14	4,71 ± 1,20	n.d.

FC: farinha de chia autêntica; M5: farinha de chia com 5% (m m^{-1}) de farinha de milho; M10: farinha de chia com 10% (m m^{-1}) de farinha de milho; FM: farinha de milho; A5: farinha de chia com 5% (m m^{-1}) amido de milho; A10: farinha de chia com 10% (m m^{-1}) amido de milho; T5: farinha de chia com 5% (m m^{-1}) de farinha de trigo; T10: farinha de chia com 10% (m m^{-1}) farinha de trigo; FT: farinha de trigo; n.d.: não detectado ou abaixo do LD. Média ± desvio padrão.

Conforme esperado, não foi identificado nenhum metabólito secundário no extrato de amido de milho. No extrato de farinha de milho foram identificados cinco compostos bioativos, dos quais os ácidos protocatecuico, ferúlico, elágico e trans-cinâmico apresentaram menores concentrações em relação à farinha de chia, e o ácido siríngico em concentração superior ao observado nas demais amostras analisadas. Apenas quatro bioativos foram determinados no extrato de farinha de trigo: os ácidos p-cumárico, elágico, trans-cinâmico (em concentrações inferiores comparadas a farinha de chia) e siríngico, este último em maior concentração relacionada às farinhas de chia.

Sendo assim, indica-se que a composição fenólica da farinha de chia difere significativamente da composição dos adulterantes, como pode ser visualizado na Figura 33, que compara os cromatogramas das amostras de farinha de chia pura, das farinhas de chia fraudadas pela adição de 10% ($m\ m^{-1}$) de adulterante e dos adulterantes puros (farinha de trigo comum, farinha de milho e amido de milho).

Figura 33: Cromatogramas de amostras adulteradas de farinha de chia e seus adulterantes.



Max plot 260-360 nm. Volume de injeção: 20 μ L. Preto: extrato de farinha de chia autêntica; Rosa: extrato de amido de milho; Azul: extrato de farinha de chia adulterada com amido de milho (10% $m\ m^{-1}$); Vermelho: extrato de farinha de milho; Verde: extrato de farinha de chia adulterada com farinha de milho (10% $m\ m^{-1}$); Laranja: extrato de farinha de trigo; Cinza: extrato de farinha de chia adulterada com farinha de trigo (10% $m\ m^{-1}$).

A Figura 33 também evidencia que o perfil cromatográfico da farinha de chia autêntica difere das amostras adulteradas. Diante do exposto, aponta-se para a possibilidade de avaliação da autenticidade de farinha de chia com base

em sua composição bioativa, a partir de seu perfil cromatográfico. Para tanto, ressalta-se a relevância da aplicação de métodos quimiométricos no estudo de autenticidade.

5.6.2. Aplicação de método CLAE-DAD de referência

O método adotado como referência, de Santos et al. (2017), foi empregado para a análise do perfil fenólico de farinhas integrais de linhaça marrom e dourada (*Linum usitatissimum* L.) e gergelim preto e branco (*Sesamum indicum* L.). Foram construídas curvas analíticas (0,1 a 2,5 mg L⁻¹), cujos parâmetros e limites de detecção e quantificação (estimados usando as recomendações da IUPAC com base nos erros dos tipos I e II, falsos positivos e falsos negativos) são apresentados na Tabela 38.

Tabela 38: Parâmetros das curvas analíticas para determinação de ácidos fenólicos e flavonoides em farinhas de linhaça e gergelim.

Analito	Equação de regressão ($y = ax + b$)*	r	F	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Ác protocatecuico	$y = 122913x + 453,06$	0,9950	3957	0,39	0,57
Ác clorogênico	$y = 54804x - 809,04$	0,9996	4922	0,32	0,48
Ác vanílico	$y = 89113x - 1553,1$	0,9993	2771	0,41	0,62
Ác cafeico	$y = 106892x - 655,21$	0,9997	5873	0,31	0,47
Ác siríngico	$y = 66621x - 1175,1$	0,9997	5794	0,31	0,46
Ác p-cumárico	$y = 162544x + 812,95$	0,9997	6692	0,31	0,46
Ác ferúlico	$y = 54238x + 1847,9$	0,9998	8142	0,30	0,46
Quercetina	$y = 36322x - 3352$	0,9983	1176	0,43	0,64
Kaempferol	$y = 32537x - 1657,3$	0,9986	1399	0,27	0,40

*y é a área integrada do pico (mAU) e x é a concentração do analito (mg L⁻¹).

A linearidade foi avaliada com base na ANOVA, de acordo com coeficiente de correlação (r) e teste F. Foram obtidos coeficientes de correlação superiores a 0,99 e valores experimentais de F superiores ao F crítico tabelado (7,71), portanto, indica-se que existe uma relação linear entre concentração e sinal para todos os analitos. As concentrações obtidas para ácidos fenólicos e flavonoides são apresentadas na Tabela 39 e os resultados foram expressos em micrograma por grama de farinha (µg g⁻¹).

Tabela 39: Concentração de ácidos fenólicos e flavonoides ($\mu\text{g g}^{-1}$) em farinhas de linhaça e de gergelim.

Amostra	Ác protocatecuico	Ác clorogênico	Ác vanílico	Ác cafeico	Ác siríngico	Ác p-cumárico	Ác ferúlico	Quercetina	Kaempferol
YC	n.d.	8,36 ± 0,62	1,20 ± 0,27	0,91 ± 0,12	n.d.	8,34 ± 0,48	0,12 ± 0,06	n.d.	0,19 ± 0,02
YB	n.d.	8,82 ± 0,91	0,28 ± 0,11	1,08 ± 0,20	n.d.	5,76 ± 0,39	0,17 ± 0,01	n.d.	0,17 ± 0,01
YV	n.d.	6,66 ± 0,73	0,85 ± 0,10	0,93 ± 0,03	n.d.	5,71 ± 0,66	0,40 ± 0,08	n.d.	0,18 ± 0,03
YS	n.d.	4,66 ± 0,13	1,49 ± 0,04	1,02 ± 0,04	n.d.	14,23 ± 0,48	2,75 ± 0,45	n.d.	n.d.
YF	n.d.	8,12 ± 0,83	0,35 ± 0,05	0,87 ± 0,02	n.d.	4,41 ± 0,58	0,19 ± 0,04	n.d.	0,24 ± 0,01
BC	3,54 ± 0,01	3,32 ± 0,06	0,74 ± 0,15	1,47 ± 0,06	n.d.	1,28 ± 0,34	1,29 ± 0,02	n.d.	0,81 ± 0,06
BM	5,34 ± 0,08	3,00 ± 0,32	1,06 ± 0,21	1,08 ± 0,11	n.d.	1,40 ± 0,17	2,52 ± 0,20	n.d.	0,28 ± 0,01
BV	3,63 ± 0,62	3,12 ± 0,26	0,35 ± 0,02	1,29 ± 0,05	n.d.	1,08 ± 0,08	2,57 ± 0,18	n.d.	0,31 ± 0,08
BE	0,37 ± 0,05	1,96 ± 0,40	0,14 ± 0,02	1,92 ± 0,45	n.d.	2,39 ± 0,58	0,11 ± 0,03	n.d.	0,24 ± 0,01
BR	0,32 ± 0,07	2,64 ± 0,86	0,75 ± 0,13	2,81 ± 0,11	n.d.	2,50 ± 0,89	1,98 ± 0,10	n.d.	0,18 ± 0,01
WC	30,24 ± 1,20	29,45 ± 2,30	6,10 ± 0,40	0,95 ± 0,10	0,92 ± 0,04	0,74 ± 0,09	0,23 ± 0,03	0,81 ± 0,03	n.d.
WB	47,02 ± 2,45	56,34 ± 1,09	9,83 ± 0,38	0,89 ± 0,25	1,96 ± 0,20	1,36 ± 0,13	15,82 ± 2,48	0,65 ± 0,04	n.d.
WV	24,32 ± 0,96	30,32 ± 1,66	8,56 ± 0,85	6,76 ± 0,93	5,23 ± 0,51	4,14 ± 0,28	5,50 ± 0,78	0,78 ± 0,12	n.d.
WE	17,71 ± 0,55	4,75 ± 0,18	4,63 ± 0,15	0,23 ± 0,02	1,23 ± 0,10	n.d.	1,15 ± 0,36	0,41 ± 0,02	n.d.
WR	44,48 ± 1,48	39,94 ± 1,80	8,95 ± 0,41	0,67 ± 0,03	1,54 ± 0,19	0,67 ± 0,05	13,36 ± 1,28	0,49 ± 0,03	n.d.
NC	26,31 ± 0,28	7,53 ± 0,88	14,88 ± 0,92	1,80 ± 0,22	3,55 ± 0,45	2,07 ± 0,20	2,79 ± 0,11	0,35 ± 0,02	0,33 ± 0,02
NN	12,87 ± 0,75	2,97 ± 0,28	6,05 ± 0,73	0,47 ± 0,04	2,37 ± 0,14	0,72 ± 0,11	0,27 ± 0,18	6,09 ± 1,04	0,96 ± 0,23
NB	31,25 ± 1,10	9,43 ± 0,54	11,54 ± 0,83	2,54 ± 0,15	3,29 ± 0,20	1,57 ± 0,12	2,07 ± 0,27	0,39 ± 0,03	0,36 ± 0,04
NV	23,00 ± 0,70	7,39 ± 0,34	11,85 ± 0,32	1,94 ± 0,09	2,71 ± 0,07	1,80 ± 0,08	2,23 ± 0,14	0,43 ± 0,05	0,30 ± 0,03
NR	27,58 ± 0,85	10,32 ± 0,42	18,50 ± 0,86	2,87 ± 0,15	5,25 ± 0,65	3,22 ± 0,08	3,21 ± 0,14	n.d.	n.d.

W: branco; N: preto. A segunda letra da sigla distingue a origem da amostra. n.d.: não detectado ou abaixo do LD. Média ± desvio padrão.

Foram observadas diferenças nas concentrações dos compostos fenólicos para o mesmo tipo de amostra. Conforme discutido anteriormente, o conteúdo fenólico é afetado pela origem geográfica da planta, condições ambientais e sazonais (Ribeiro et al., 2019).

Para o extrato da farinha de linhaça, as maiores concentrações foram verificadas para os ácidos clorogênico (1,96 a 8,82 $\mu\text{g g}^{-1}$) e p-cumárico (1,08 a 14,23 $\mu\text{g g}^{-1}$). Em ambos os casos a concentração variou significativamente entre os tipos de linhaça, obtendo-se maiores concentrações nos extratos de linhaça dourada. Para o extrato da farinha de gergelim, as maiores concentrações foram verificadas para ácido clorogênico (2,97 a 56,34 $\mu\text{g g}^{-1}$) e ácido protocatecuico (12,87 a 47,02 $\mu\text{g g}^{-1}$). O ácido protocatecuico não foi detectado nos extratos da farinha de linhaça dourada, apenas para a linhaça marrom. Só foi possível detectar o kaempferol nos extratos da farinha de gergelim preto, não detectado no gergelim branco. Não foram detectados ácido serínico e quercetina no extrato da farinha de linhaça, mas foi possível detectá-los nos extratos da farinha de gergelim.

É conhecida a presença dos ácidos ferúlico, cafeico, p-cumárico (Corbin et al., 2015; Silva et al., 2017b), clorogênico, gálico, protocatecuico (Herchi et al., 2014), o-cumárico, vanílico, sirínico, p-hidroxibenzoico, salicílico, gentísico e sinápico nas sementes de linhaça. Também foi relatada a presença dos ácidos p-cumárico, ferúlico, cafeico e p-hidroxibenzoico em sementes de gergelim (Shahidi e Ambigaipalan, 2015).

Os compostos fenólicos são de grande interesse para as áreas da saúde e indústrias farmacêutica e alimentícia devido a ampla variedade propriedades funcionais, incentivando a busca por fontes naturais, notadamente de origem vegetal (Pyrzynska e Sentkowska, 2015; Kafkas et al., 2018). Nesse sentido, esclarecer o conteúdo fenólico dos alimentos, como apresentado neste estudo, torna-se relevante para melhor compreender os efeitos à saúde relacionados aos alimentos.

Ademais, a investigação de compostos bioativos de alimentos também demonstra relevância ao revelar potenciais fontes naturais de princípios ativos para

fármacos e ingredientes bioativos para o desenvolvimento de novos produtos cosméticos e alimentos funcionais, por exemplo. Além disso, a elucidação do perfil fenólico fornece subsídios para o controle de qualidade e investigação de autenticidade de alimentos, uma vez que metabólitos secundários são biomarcadores de materiais vegetais (Erban et al., 2019) e o perfil cromatográfico pode ser adotado como uma impressão digital do alimento (Manning e Soon, 2014).

5.7. Análises multivariadas

5.7.1. Análise do perfil fenólico de farinhas de linhaça e gergelim

Para PCA, foram selecionadas as componentes principais (CP) cujos autovalores são iguais ou maiores que 1,0. Para a análise das componentes, foi utilizada a matriz não rotacionada, verificando-se que não há redundância e que cada variável original é significativa apenas para uma das CP. CP1 explica 42,06%, CP2 explica 21,20% e CP3 explica 16,11% da variação total dos dados experimentais. Os resultados para PCA são apresentados pela projeção das amostras e das variáveis originais no fator-plano CP1 x CP2 (Figura 34 e 35), que explica 63,26% da variabilidade dos dados experimentais, sendo satisfatório para extrair informações.

Para avaliar a separação das amostras por PCA, uma elipse de confiança foi plotada (Figura 34). A região elíptica envolvendo amostras com 95% de confiança separou as amostras NN das demais. A projeção das variáveis (Figura 35) possibilita identificar quais analitos mais influenciam na separação das amostras. As amostras NN formaram um grupo separado devido à sua maior concentração de kaempferol.

Figura 34: Projeção das amostras de farinha de linhaça e gergelim no plano CP1 x CP2.

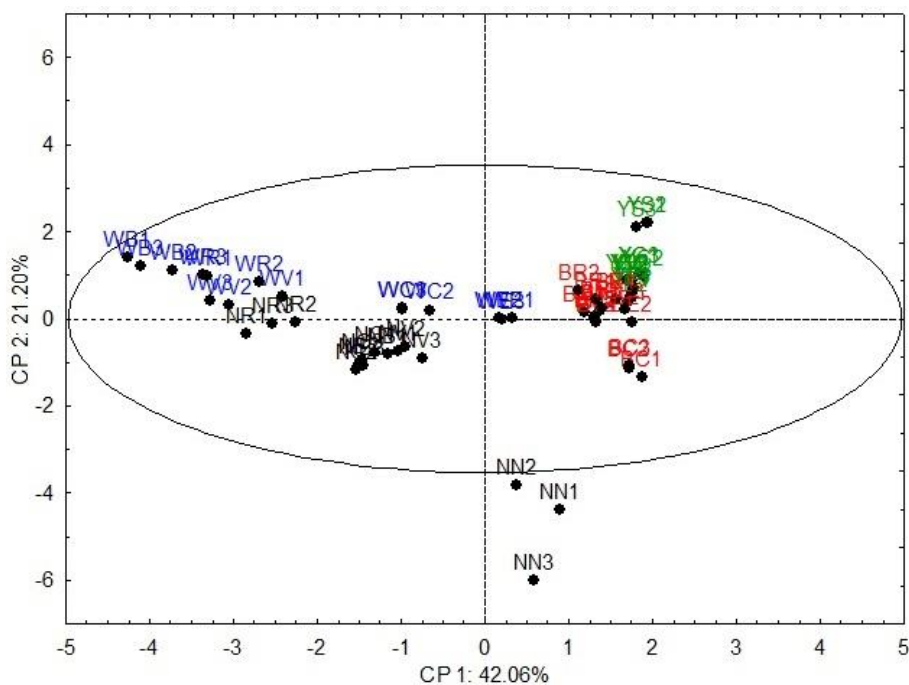
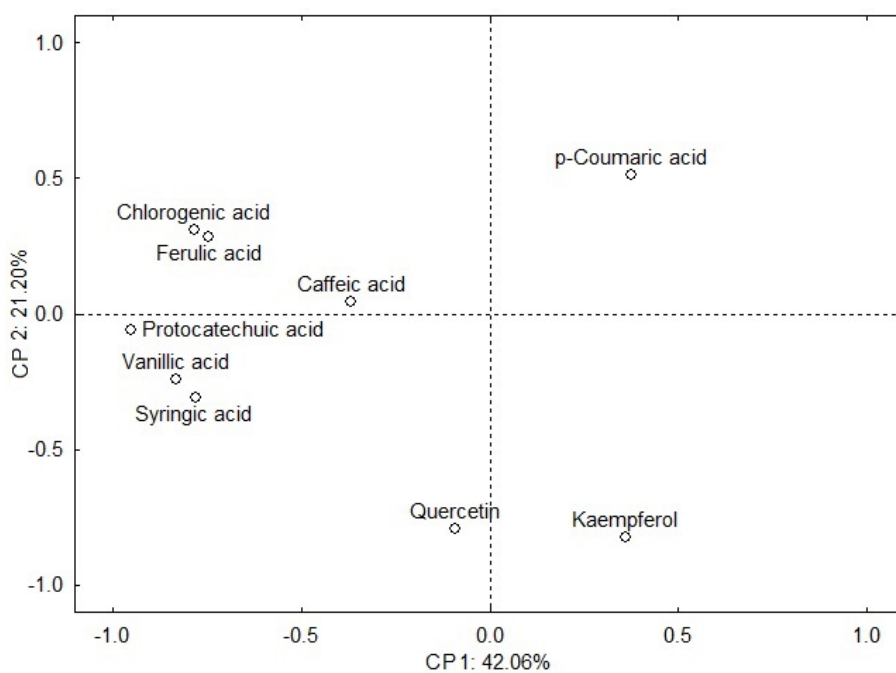


Figura 35: Projeção das variáveis no plano CP1 x CP2 para as farinhas de gergelim e linhaça.

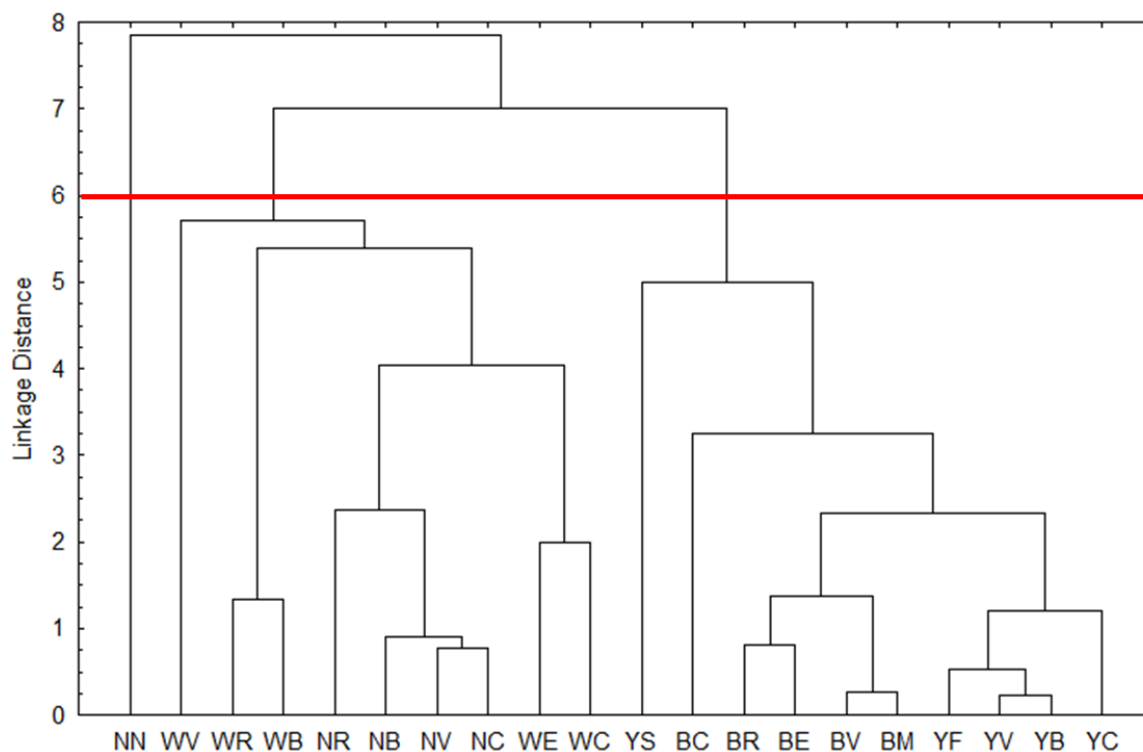


Analisando comparativamente as Figuras 34 e 35 evidencia-se que as amostras de gergelim preto, negativamente relacionadas a CP1 e CP2 (exceto NN), estão separadas devido às variáveis ácido protocatecuico, ácido vanílico e ácido siríngico. Amostras de gergelim branco, negativamente relacionadas com CP1 e positivamente com CP2, são separadas devido às variáveis ácido clorogênico, ácido ferúlico e ácido cafeico, exceto para a amostra WE que está positivamente relacionada com CP1 devido ao ácido p-cumárico. Portanto, PCA se mostrou eficiente para distinguir as farinhas de gergelim de acordo com o tipo de semente, de forma que todas as amostras de gergelim branco estão positivamente relacionadas com CP2, enquanto todas as de gergelim preto apresentam relação negativa com essa CP.

Com PCA evidencia-se também que as amostras de farinha de linhaça apresentaram a maior similaridade (distribuídas mais próximas no fator-plano) do que as farinhas de gergelim. As amostras de linhaça de diferentes tipos estão principalmente relacionadas positivamente com CP1 e CP2. A amostra BC, negativamente relacionada ao CP2, difere das demais devido ao seu maior teor de kaempferol.

Com HCA foi gerado um dendrograma (Figura 36) utilizando a distância Euclidiana para a medida de distância e ligação completa como regra de ligação. A linha de corte no dendrograma corresponde a um determinado valor de distância que revela a solução do agrupamento a este nível de distância e o pertencimento das amostras a diferentes agrupamentos (Lattin, Carroll e Green, 2003). A escolha do número de clusters pode ser baseada em diferentes critérios, sendo um deles a análise do comportamento do nível de similaridade. São detectados pontos onde há uma diminuição acentuada na similaridade dos conglomerados e é escolhido o intervalo de similaridade em busca da solução de separação do conjunto de dados analisado (Mingoti, 2013).

Figura 36: Dendrograma para as amostras de farinha de gergelim e linhaça.



Com HCA foi revelada a distinção das amostras de farinha de oleaginosa de acordo com o tipo de semente, o que corrobora os resultados obtidos com a rede perceptron multicamadas. A linha de corte destacada no dendrograma indica a separação de três grupos: a amostra NN, as farinhas de gergelim e as farinhas de linhaça. A separação da amostra NN era esperada de acordo com os resultados de PCA. Nos outros dois grupos também é possível observar a separação de subgrupos de amostras de acordo com a cor das sementes.

Os mapas auto-organizáveis de Kohonen foram usados de forma não supervisionada, com uma grade de dimensões 8x7 neurônios. Foram necessárias 1000 iterações para chegar a resultados satisfatórios (erro de quantização: 0,0712 e erro topográfico: 0). Os limites dos grupos foram determinados usando o algoritmo K-means e o número de grupos foi obtido pelo método *elbow*. Pela análise visual dos mapas de calor é possível confirmar as tendências geradas pelo K-means combinado com o método *elbow*. Foram obtidos 4 grupos (Figura 37) e os mapas de calor indicam quais variáveis foram responsáveis por separar esses grupos (Figura 38).

Figura 37: Demarcação dos grupos de farinha de gergelim e linhaça no mapa auto-organizável de Kohonen.

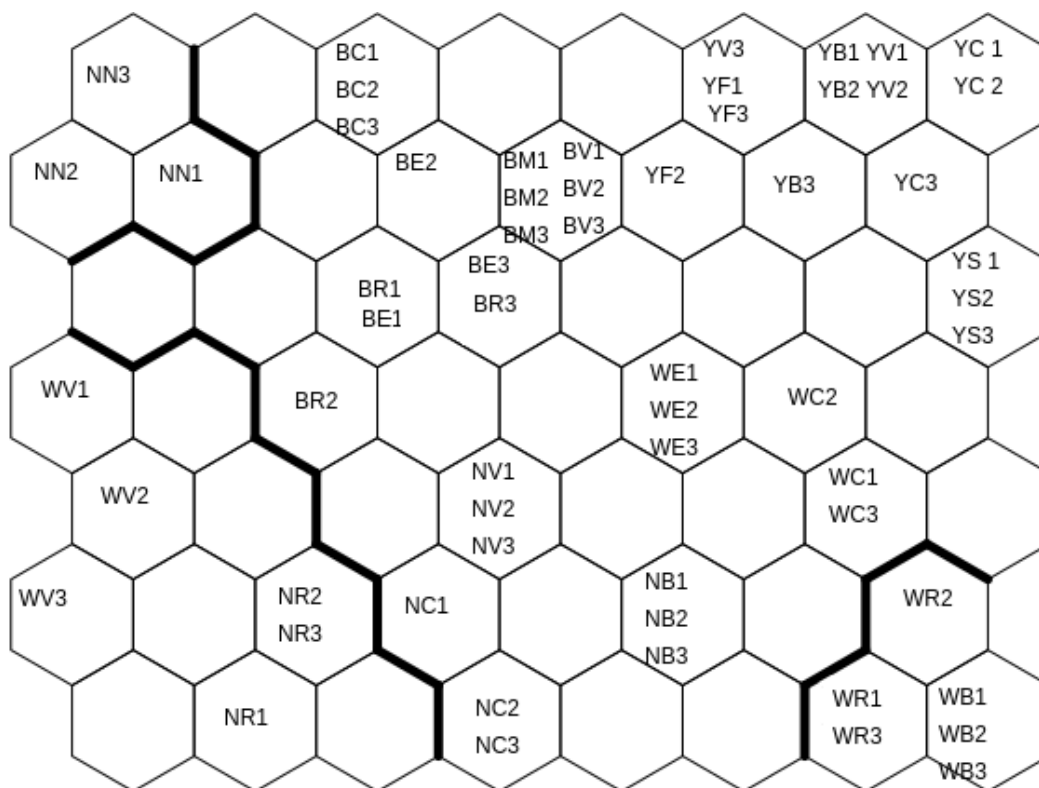
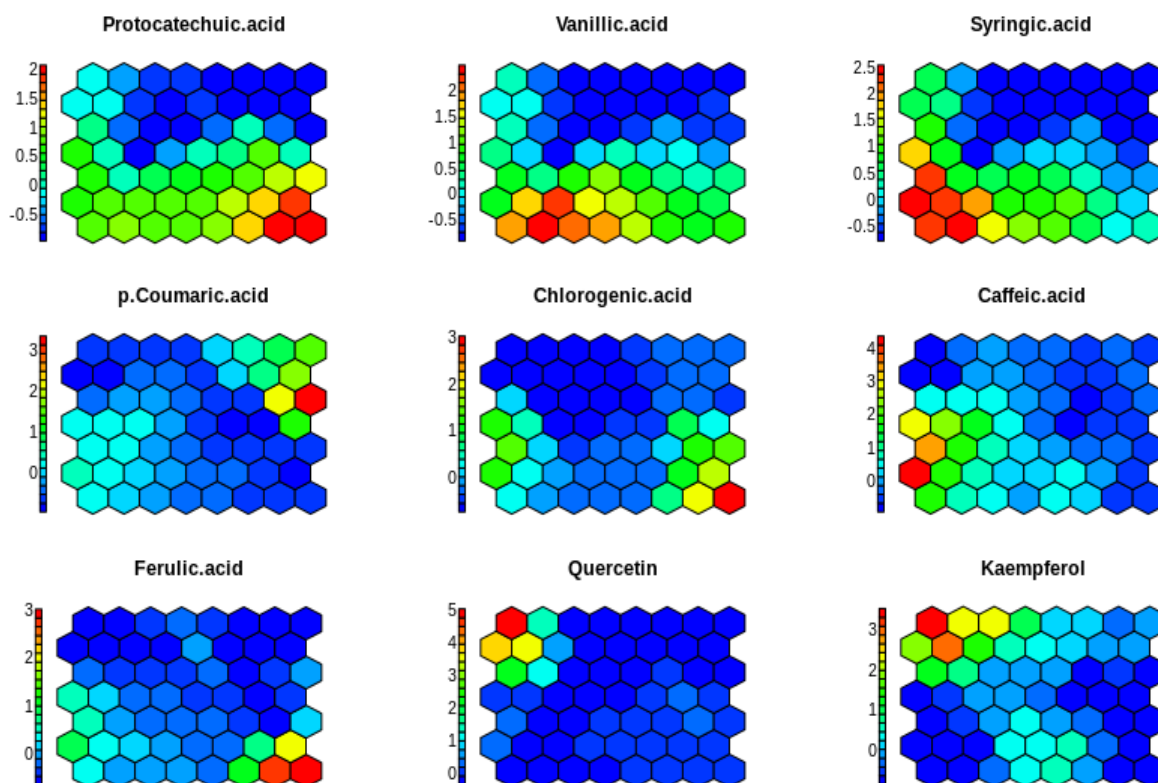


Figura 38: Mapas de calor para as variáveis estudadas.



O primeiro grupo é formado apenas por amostras NN, ricas em quercetina e kaempferol, cuja separação era esperada de acordo com os resultados de PCA e HCA. O segundo grupo contém amostras WV e NR, que apresentam altas concentrações de ácidos vanílico e siríngico. O terceiro é formado pelas amostras WR e WB, ricas em ácidos ferúlico, clorogênico e protocatecuico. O maior grupo consiste em amostras com concentrações baixas e muito próximas de quercetina e ácidos ferúlico e clorogênico, incluindo todas as amostras de farinha de linhaça (amarela e marrom) e algumas amostras de farinha de gergelim (WE, WC, NC, NV e NB). Portanto, para as diferentes colorações das sementes, as amostras de farinha de linhaça (todas pertencentes ao mesmo grupo) apresentam maior similaridade do que as amostras de farinha de gergelim (distribuídas em diferentes grupos).

A rede perceptron multicamadas é uma técnica supervisionada que foi aplicada para a discriminação das amostras de farinha de acordo com o tipo de semente. Foi utilizada uma rede com 3 camadas: 9 neurônios de entrada (analitos), 3 neurônios na camada oculta e 1 neurônio de saída (resposta). O número de camadas ocultas e o número ideal de neurônios nessa camada foram determinados no modo *multistart*. A soma dos quadrados do erro foi usada como função de perda. A função sigmóide (logística) foi usada como função de ativação. O algoritmo de retropropagação foi empregado para o treinamento de rede.

Para construir um modelo de predição, são necessárias uma fase de treinamento e uma fase de previsão (validação). O conjunto de amostra de treinamento é utilizado para o desenvolvimento do modelo, enquanto o conjunto de validação possui novas amostras, não incluídas no conjunto de treinamento (Roggo et al., 2007). O conjunto de treinamento é usado para extrair parâmetros para a classificação dos membros do conjunto de previsão. O conjunto de treinamento (80% das amostras) consistiu em 48 amostras selecionadas aleatoriamente e o restante das amostras (20%) constituiu o conjunto de validação, com 12 amostras de farinhas, sendo 6 de linhaça e 6 de gergelim.

Com a rede Perceptron foram necessárias 6.514 iterações para obter um modelo bem ajustado, considerando o baixo valor da soma do erro quadrático

(0,0116). A Figura 39 mostra a estrutura da rede juntamente com os coeficientes que compõem o modelo: os coeficientes lineares estão acima das setas que partem de círculos com 1 circunscrito e os coeficientes angulares estão dispostos acima das outras setas. A Figura 40 mostra os pesos generalizados para cada analito, mostrando a influência das variáveis na classificação. Nesse caso, verificou-se que as variâncias diferiram de 0 e ao comparar os pesos generalizados não foram observadas tendências, indicando que cada covariável interfere no modelo. A resposta obtida foi a classificação para os grupos estabelecidos: farinha de linhaça e farinha de gergelim. Os resultados da predição (Tabela 40) indicam que o modelo foi capaz de classificar corretamente as amostras com precisão superior a 97%.

Figura 39: Estrutura da rede Perceptron multicamadas.

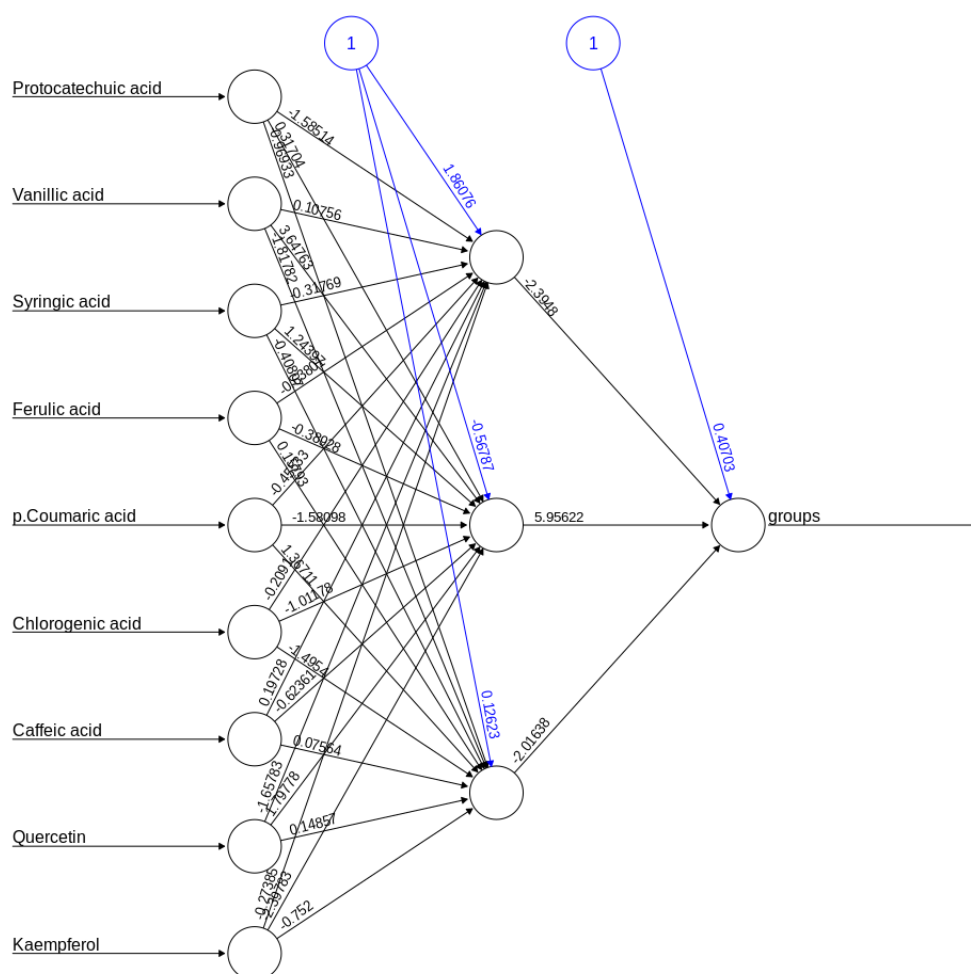


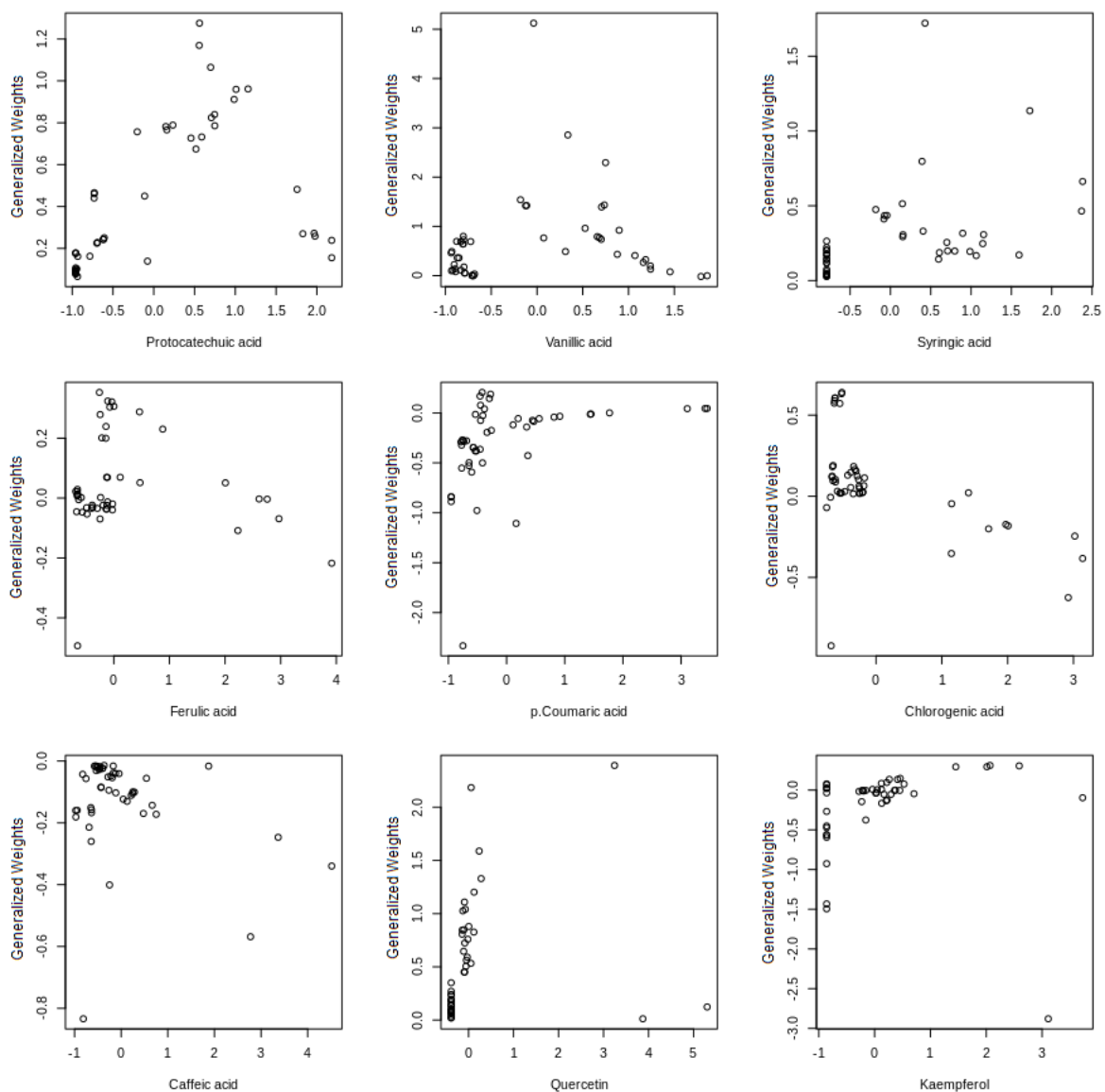
Figura 40: Pesos generalizados do modelo gerado com a rede Perceptron.

Tabela 40: Percentual de classificação das amostras de validação de acordo com os grupos (F: farinha de linhaça; S: farinha de gergelim).

	F	S
F	98,06	1,94
F	98,07	1,93
F	98,06	1,94
F	98,05	1,95
F	98,00	2,00
F	97,79	2,21
S	1,16	98,84
S	1,62	98,38
S	1,10	98,90
S	0,93	99,07
S	1,20	98,80
S	1,09	98,91

Os resultados das análises multivariadas são concordantes e evidenciaram que o teor de fenólicos depende da espécie e da variedade da planta, ao passo que foi possível distinguir as farinhas de acordo com o tipo de semente, mostrando o potencial da quimiometria para verificação da autenticidade e qualidade das farinhas integrais e demonstrando sua eficiência no controle de qualidade de alimentos.

5.7.2. Avaliação da autenticidade de farinhas de sementes de chia

A chia é vista como um superalimento, utilizado na fabricação de diversos produtos alimentícios, sendo crescente o interesse dos consumidores em todo o mundo. Portanto, a chia é um ingrediente alimentar de alto valor, que pode se tornar alvo de adulteração (Erban et al., 2019). Até a data deste trabalho, não foram encontrados estudos sobre autenticidade de farinhas integrais de chia com base no perfil fenólico, por isso estas amostras foram selecionadas para o estudo.

O perfil cromatográfico de alimentos pode ser adotado como uma impressão digital para a detecção da adulteração de alimentos (Manning e Soon, 2014), mas as informações precisam ser extraídas, o que é possível empregando métodos quimiométricos (Ellis et al., 2012). Nesse sentido, os modelos baseados em amostras homogêneas (com características semelhantes) são úteis para a descoberta de potenciais biomarcadores para a avaliação da autenticidade de alimentos (Riedl, Esslinger e Fauhl-Hassek, 2015). Quanto aos biomarcadores, os metabólitos secundários têm papel de destaque, pois através do perfil metabólico é possível identificar até a variedade de uma planta (Erban et al., 2019), o que decorre do fato de cada família, gênero e espécie de planta sintetizar uma mistura característica de metabólitos secundários (Kabera et al., 2014).

Nesse sentido, a análise de componentes principais foi aplicada para investigar os metabólitos secundários biomarcadores da farinha de chia e verificar a autenticidade da farinha de chia comercial. Para tanto, foi empregada PCA a dois conjuntos de dados: as amostras de farinha produzidas a partir das sementes de chia e as amostras comerciais de farinha de chia pronta; e as amostras de farinha de chia autênticas e as farinhas intencionalmente adulteradas para a simulação de fraude. Devido ao número de amostras, optou-se por analisar as médias das concentrações de compostos bioativos determinados por CLAE-DAD. Para os compostos não detectados nas amostras foi atribuído o valor 0 e foi realizada a padronização dos dados centrada na média.

Na análise das amostras de farinha de chia produzidas e prontas, utilizando a matriz não rotacionada foram extraídas 16 componentes principais (CP), das quais cinco apresentaram autovalores acima 1,0, mas apenas três dessas são capazes de explicar mais que 10% da variância total dos dados. Os autovalores e os percentuais de variância explicada são, respectivamente: 4,74 e 29,62% para CP1; 3,17 e 19,80% para CP2; e 2,23 e 13,97% para CP3. Como CP1 e CP2 explicam quase 50% da variação total dos dados experimentais, foi considerado suficiente para extrair informações, as interpretações foram baseadas nos gráficos de escores (projeções das amostras) e de pesos (projeções das variáveis) no plano CP1 × CP2, a seguir nas Figuras 41 e 42.

Figura 41: Gráfico de escores (CP1 × CP2) para as farinhas de chia produzidas e comerciais.

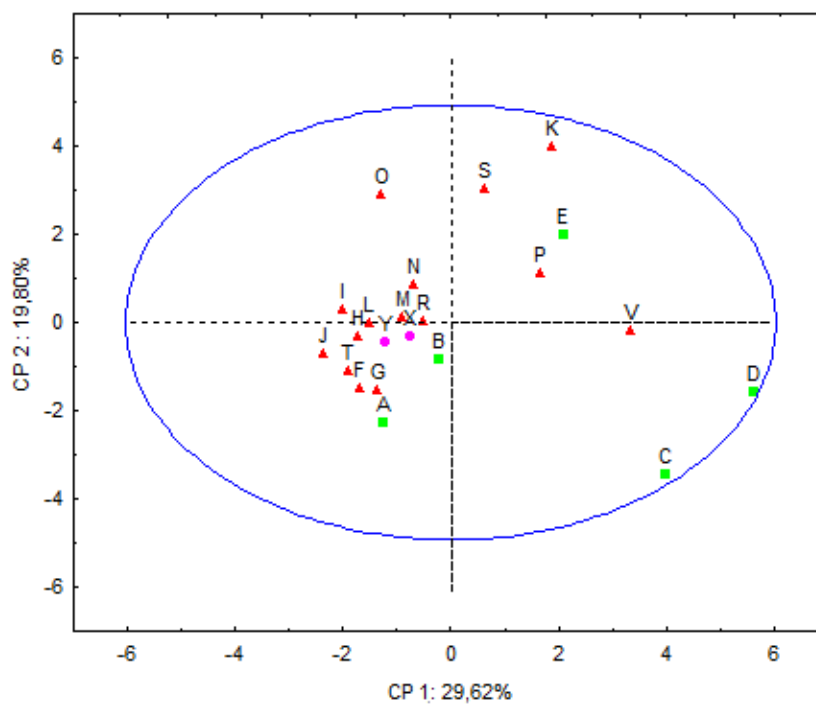
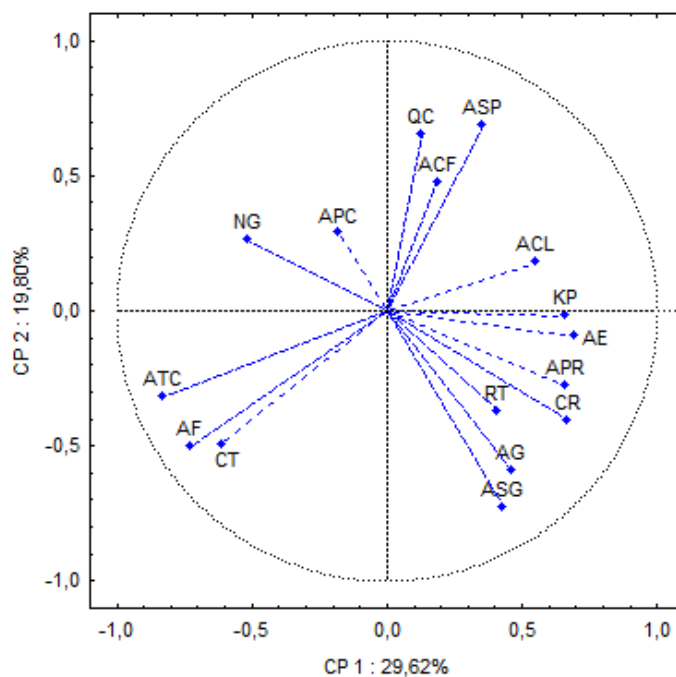


Figura 42: Gráfico de pesos (CP1 × CP2) para as farinhas de chia produzidas e comerciais.



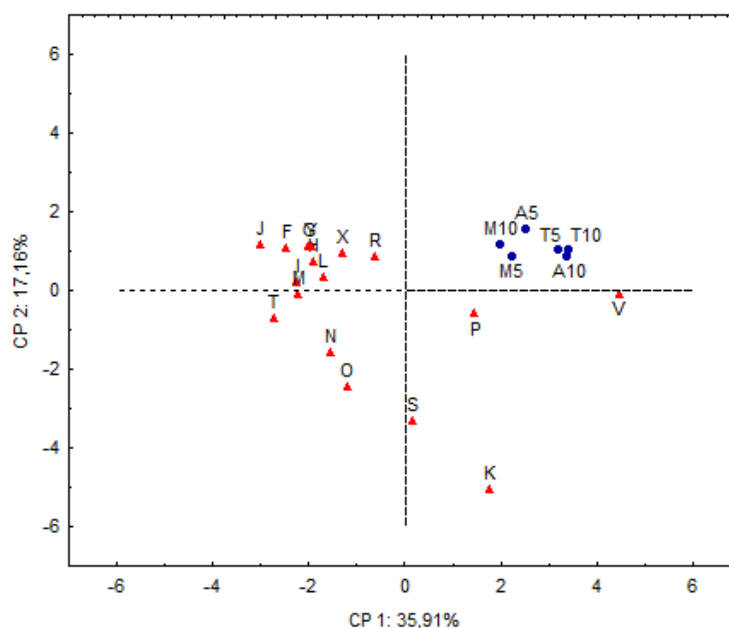
AG: ácido gálico; APR: ácido protocatecuico; ACF: ácido cafeico; ACL: ácido clorogênico; APC: ácido p-cumárico; AE: ácido elágico; ASG: ácido siríngico; AF: ácido ferúlico; ASP: ácido sinápico; ATC: ácido trans-cinâmico; CT: catequina; CR: crisina; RT: rutina; NG: naringenina; QC: quercetina; KP: kaempferol.

Foi plotada uma elipse de 95% de confiança (destacado em azul) no gráfico de escores, com a qual foi verificado que não houve diferença significativa entre a composição das amostras de farinha de chia produzidas para garantia da autenticidade (marcadas com triângulos vermelhos) e as amostras comerciais adquiridas prontas (marcadas com quadrados verdes). Também fica evidenciado que as farinhas produzidas com sementes de chia separadas por cor (marcadas no gráfico com círculos rosas) não diferem significativamente entre si quanto à composição, de modo que estão dispostas próximas no mesmo quadrante, assim como também não diferem em relação às farinhas produzidas com mistura de sementes (pretas e brancas).

É notável a separação das amostras de farinha de chia comercial C e D, que estão à margem da demarcação da elipse de 95% de confiança e ficam fora da elipse quando o nível de confiança é de 90%. Essas amostras são as únicas dispostas no quadrante, correlacionadas positivamente com a CP1 e negativamente com a CP2. Avaliando conjuntamente os gráficos de escores e de pesos é observado que as variáveis responsáveis por essa separação são kaempferol, rutina, crisina e os ácidos gálico, protocatecuico, siríngico e elágico, entre as quais é o ácido siríngico que exerce maior influência na separação, considerando que é a variável com maior distância da origem do gráfico de pesos.

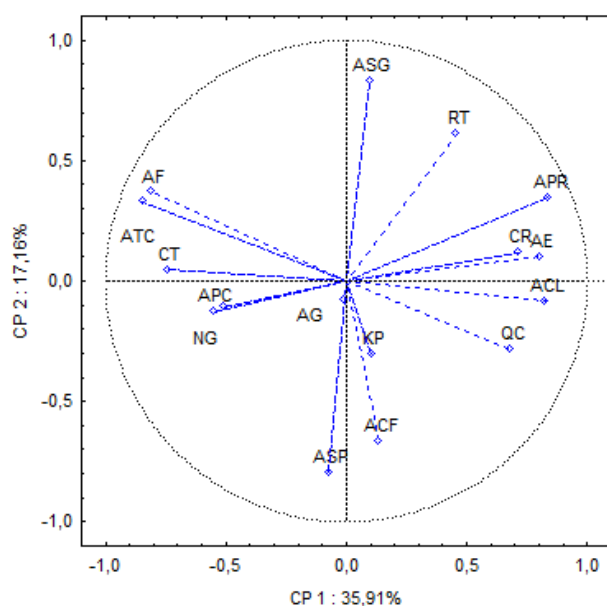
Para as amostras de farinha de chia autênticas (produzidas) e adulteradas (simulação de fraude pela adição de farinha de trigo, farinha de milho e amido de milho) também foram extraídas 16 CP. Foi utilizada a matriz não rotacionada, sendo verificado que cinco CP apresentaram autovalores acima 1,0, das quais três explicam ao menos 10% da variabilidade dos dados experimentais. Os autovalores das CP e os percentuais de variância que estas explicam são, respectivamente: 5,75 e 35,91% para CP1; 2,75 e 17,16% para CP2; e 2,04 e 12,77% para CP3. CP1 e CP2 explicam 53,07% da variação total dos dados, logo foi considerado suficiente para as interpretações, baseadas nas projeções das amostras e das variáveis no plano CP1 x CP2 (Figuras 43 e 44).

Figura 43: Projeção das amostras de farinha de chia autênticas e adulteradas no plano CP1 x CP2.



M5: farinha de chia adulterada com 5% (m m^{-1}) de farinha de milho; M10: farinha de chia adulterada com 10% (m m^{-1}) de farinha de milho; A5: farinha de chia adulterada com 5% (m m^{-1}) amido de milho; A10: farinha de chia adulterada com 10% (m m^{-1}) amido de milho; T5: farinha de chia adulterada com 5% (m m^{-1}) de farinha de trigo; T10: farinha de chia adulterada com 10% (m m^{-1}) farinha de trigo.

Figura 44: Projeção das variáveis no plano CP1 x CP2 para as farinhas de chia autênticas e adulteradas.



AG: ácido gálico; APR: ácido protocatecuico; ACF: ácido cafeico; ACL: ácido clorogênico; APC: ácido p-cumárico; AE: ácido elágico; ASG: ácido siríngico; AF: ácido ferúlico; ASP: ácido sinápico; ATC: ácido trans-cinâmico; CT: catequina; CR: crisina; RT: rutina; NG: naringenina; QC: quercetina; KP: kaempferol.

No gráfico de escores é evidente a separação das amostras de farinha de chia autênticas (marcadas com triângulos vermelhos) das farinhas adulteradas (marcadas com círculos azuis). As farinhas de chia adulteradas foram as únicas amostras dispostas no primeiro quadrante, positivamente correlacionadas com CP1 e CP2. A avaliação do gráfico de escores revela que as variáveis que exerceram influência na separação das amostras adulteradas foram rutina, crisina e os ácidos elágico, siríngico e protocatecuico, este último, mais distante da origem do gráfico de pesos, é o que mais influencia nessa separação.

Diante dos resultados obtidos nas duas análises de farinhas de chia por PCA, sugere-se que os compostos fenólicos ácido siríngico, ácido protocatecuico, ácido elágico, rutina e crisina são potenciais biomarcadores da chia, considerando que foram responsáveis pela separação de amostras de farinha de chia sobre as quais estava sendo investigada a autenticidade.

5.8. Avaliação da bioacessibilidade de bioativos antioxidantes de farinha integral de quinoa branca

A quinoa é um pseudocereal rico em metabólitos secundários com reconhecidas atividades biológica, amplamente consumida em grãos *in natura*, farinha e flocos (Lin et al., 2019) e usada na produção de alimentos funcionais (Calderelli et al., 2010; Gewehr et al., 2017). A bioacessibilidade de compostos fenólicos de grãos de quinoa (Pellegrini et al., 2017; Balakrishnan e Schneider, 2020) e em alimentos contendo quinoa (Rocchetti et al., 2017b; Valenzuela-González et al., 2022) foi abordada em diferentes estudos, no entanto, até a data deste trabalho, não há relatos sobre a avaliação da bioacessibilidade de compostos fenólicos de farinhas integrais de quinoa, motivo pelo qual esta amostra foi selecionada para este estudo.

Após a simulação *in vitro* da digestão de farinha de quinoa branca, foram determinados espectrofotometricamente os teores totais de compostos fenólicos e de flavonoides e a capacidade antioxidante das frações coletadas ao final da simulação das fases gástrica e intestinal, além do extrato da amostra de farinha utilizada, conforme disposto na Tabela 41.

Nota-se a interferência do meio reacional da simulação da digestão nas determinações colorimétricas, haja vista os resultados dos brancos. Diante disto, para calcular a fração bioacessível deve-se considerar o valor obtido para o branco para evitar a superestimação dos resultados. Portanto, os valores do branco foram abatidos dos valores da respectiva fase aquosa sobrenadante.

Tabela 41: Resultados das determinações espectrofotométricas para frações da bioacessibilidade de farinha de quinoa.

Amostra	Teor de fenólicos totais (mgEAG L ⁻¹)	Teor de flavonoides totais (mgEQ L ⁻¹)	DPPH (% inibição)	ABTS (% inibição)	
QF	121 ^b ± 12	154 ^a ± 6	70 ^b ± 2	14 ^c ± 4	
Fase gástrica	A	123 ^b ± 14	70 ^b ± 2	40 ^b ± 1	
	R	68 ^c ± 3	139 ^a ± 4	7 ^{cd} ± 1	
	B	13 ^d ± 4	34 ^c ± 2	20 ^c ± 0	4 ^d ± 0
Fase intestinal	A	175 ^a ± 6	63 ^b ± 2	29 ^c ± 1	64 ^a ± 4
	R	173 ^a ± 7	136 ^a ± 6	85 ^a ± 1	7 ^{cd} ± 2
	B	25 ^d ± 3	31 ^c ± 1	4 ^d ± 0	3 ^d ± 0

QF: extrato de farinha de quinoa; A: fase aquosa sobrenadante; R: extrato do resíduo; B: branco. Média ± desvio padrão. Letras iguais após a média indicam que não há diferença estatística no nível de 5% de significância.

A fase aquosa sobrenadante abrange a fração bioacessível dos compostos, que foram liberados da matriz alimentar durante e após a digestão e são disponibilizados para a absorção (Palafox-Carlos et al., 2011). De acordo com os resultados obtidos, a maior parte dos compostos fenólicos da farinha integral de quinoa branca se tornou bioacessível durante e após a digestão gástrica, tendo havido um aumento de apenas 36%, aproximadamente, no teor total de compostos fenólicos bioacessíveis após a digestão intestinal. Em relação aos flavonoides, conforme verificado pelo teste de Tukey (nível de 5% de significância), não houve diferença significativa para o teor total de flavonoides nas fases aquosas, indicando que os flavonoides da farinha de quinoa são liberados para a absorção principalmente durante e após a digestão gástrica, não

tendo ocorrido aumento no teor total de flavonoides bioacessíveis após a digestão intestinal.

Quanto à capacidade antioxidante da fração bioacessível, não houve diferença estatisticamente significativa no percentual de inibição do radical DPPH entre a fase aquosa sobrenadante e o branco da fase gástrica, portanto sugere-se que os compostos liberados após a digestão gástrica não apresentaram atividade antioxidante significativa frente ao DPPH*. Após a fase intestinal foi obtida uma porcentagem de inibição do DPPH* 25% maior, indicando que os compostos antioxidantes da farinha de quinoa capazes de inibir os radicais DPPH tornam-se bioacessíveis principalmente após a digestão intestinal. Por outro lado, o percentual de inibição dos radicais ABTS após a fase intestinal também aumentou 25% em relação à fase anterior, mas esse aumento não é superior ao potencial antioxidante observado para a fração aquosa da fase gástrica, sugerindo que compostos da farinha de quinoa com atividade antioxidante contra ABTS*+ se tornam bioacessíveis principalmente após a digestão gástrica.

Os resíduos de cada etapa da simulação da digestão foram submetidos à extração com solventes orgânicos, da mesma forma que a amostra de farinha de quinoa. Por este motivo, suas concentrações foram comparadas. Os resíduos compreendem a porção dos compostos que não foram liberados da matriz alimentar durante e após a digestão.

Para o teor total de compostos fenólicos observa-se que a concentração no resíduo da fase gástrica foi inferior ao determinado no extrato da farinha de quinoa, o que aponta para a possibilidade de que 43% do teor total de compostos fenólicos da farinha integral de quinoa branca tenha se tornado bioacessível depois da digestão gástrica. No entanto, não foi possível indicar o quanto foi liberado para absorção após a fase intestinal, pois o teor de fenólicos totais no resíduo foi significativamente superior ao determinado no extrato da farinha. A esse respeito deve-se considerar que o pH após a fase gástrica é ácido (aproximadamente 4,0), o que pode ter facilitado a extração dos compostos fenólicos do resíduo utilizando solventes orgânicos. É conhecido que o meio ácido facilita a extração de fenólicos de materiais vegetais, porque o ácido age nas

membranas celulares, causando seu rompimento e liberação dos compostos fenólicos (Sardarodiyani e Sani, 2016). Além disso, também deve ser levado em consideração a interação biológica entre os compostos fenólicos e as enzimas, pois a ação enzimática também pode melhorar a liberação dos fenólicos da matriz alimentar (Saura-Calixto, Serrano e Goni, 2007).

No que se refere ao teor de flavonoides totais, os resultados apontaram que cerca de 10% dos flavonoides da farinha de quinoa se tornam bioacessíveis e, corroborando com os resultados da fase aquosa sobrenadante, essa liberação para a absorção se dá após a digestão gástrica, não havendo aumento no teor total de flavonoides bioacessíveis após a digestão intestinal. O teste de Tukey demonstrou que não há diferença significativa entre o extrato da farinha de quinoa e os resíduos das etapas de digestão, ressaltando que é baixo o teor de flavonoides bioacessíveis da farinha de quinoa.

Sobre a atividade antioxidante, para ambos os métodos, não houve diferença significativa entre as porcentagens de inibição dos radicais pelos extratos dos resíduos de cada etapa da digestão. Pelo método DPPH, a inibição de radicais é superior para os resíduos em relação ao extrato da farinha, enquanto para o método ABTS, a diferença entre o extrato da farinha de quinoa e os resíduos não é significativa. Dessa forma, esses resultados não permitem inferir conclusões acerca da bioacessibilidade de compostos antioxidantes da farinha de quinoa.

Estudos evidenciaram que os compostos fenólicos dietéticos se fazem bioacessíveis em diferentes proporções nas distintas partes do sistema digestivo (Saura-Calixto, Serrano e Goni, 2007) e apontaram que os compostos fenólicos, nomeadamente ácidos fenólicos e flavonoides, podem ser absorvidos em quantidades suficientes para exercer atividade antioxidante, bem como outras atividades biológicas (Shahidi e Ambigaipalan, 2015).

As frações coletadas ao final da simulação das fases gástrica e intestinal e os extratos dos resíduos e da amostra de farinha de quinoa utilizada foram analisadas por CLAE-DAD e as concentrações dos compostos bioativos identificados são dadas na Tabela 42. Os brancos foram abatidos das fases

aquosas das respectivas etapas de digestão antes da integração dos picos, por meio do software LCsolutions.

Tabela 42: Concentração (mg L^{-1}) dos compostos bioativos nas frações da bioacessibilidade de farinha de quinoa.

Analito	QF	Fase gástrica		Fase intestinal	
		A	R	A	R
Ác protocatecuico	$0,31 \pm 0,04$	$0,28 \pm 0,06$	$0,33 \pm 0,07$	$0,17 \pm 0,01$	n.d.
Ác clorogênico	n.d.	$0,42 \pm 0,01$	n.d.	$0,38 \pm 0,01$	n.d.
Ác siríngico	$0,36 \pm 0,05$	$0,28 \pm 0,05$	n.d.	$0,19 \pm 0,01$	n.d.
Vanilina	n.d.	$0,47 \pm 0,04$	n.d.	$0,21 \pm 0,04$	n.d.
Ác p-cumárico	$0,29 \pm 0,05$	$0,17 \pm 0,02$	$0,35 \pm 0,09$	$0,31 \pm 0,04$	n.d.
Ác ferúlico	$0,73 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,04$	n.d.	$0,20 \pm 0,03$	n.d.
Ác sinápico	$0,87 \pm 0,01$	$0,39 \pm 0,09$	n.d.	n.d.	n.d.
Rutina	$4,50 \pm 0,44$	$18,98 \pm 0,84$	n.d.	$14,98 \pm 1,01$	n.d.
Ác elágico	n.d.	$2,60 \pm 0,07$	n.d.	$2,00 \pm 0,10$	n.d.
Ác t-cinâmico	$0,31 \pm 0,05$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Naringenina	$0,64 \pm 0,08$	$0,20 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,08$	n.d.	$0,18 \pm 0,02$
Quercetina	$0,32 \pm 0,04$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kaempferol	$2,83 \pm 0,25$	n.d.	$1,85 \pm 0,09$	n.d.	$0,98 \pm 0,07$

QF: extrato de farinha de quinoa; A: fase aquosa sobrenadante; R: extrato do resíduo; B: branco; n.d.: não detectado ou abaixo do LD. Média \pm desvio padrão.

A composição fenólica da farinha de quinoa branca foi discutida previamente, na seção 5.6.1.1. Neste estudo de bioacessibilidade não foram detectados: ácido gálico, ácido cafeico, catequina e crisina. Como mencionado anteriormente, os compostos determinados na fase aquosa sobrenadante são aqueles que se tornam bioacessíveis durante e após a digestão. Em contrapartida, os compostos determinados nos resíduos são os que não foram liberados para posterior absorção.

Ao comparar a composição das fases aquosas, observam-se quais são os compostos fenólicos bioacessíveis da farinha de quinoa: rutina, naringenina, vanilina e ácidos elágico, sinápico, ferúlico, p-cumárico, siríngico, clorogênico e

protocatecuico. Entre estes compostos, rutina e ácido elágico são os mais abundantes. A maioria desses fenólicos bioacessíveis é liberada em maior quantidade na fase gástrica, exceto para os ácidos p-cumárico e ferúlico, cujas concentrações foram superiores ao final da etapa intestinal. No caso do ácido sinápico e naringenina, demonstrou-se que a liberação se deu apenas na digestão gástrica, considerando que estes compostos não foram detectados nas frações da fase intestinal.

Comparando-se os compostos fenólicos do extrato de farinha de quinoa e dos resíduos, a presença no extrato e a ausência no resíduo sugerem que estes compostos foram liberados para a absorção. Nesse sentido, indica-se que rutina, quercetina e os ácidos trans-cinâmico, siríngico, ferúlico e sinápico da farinha de quinoa se tornam bioacessíveis após a digestão gástrica. Quanto ao kaempferol, um terço é bioacessível na fase gástrica e dois terços do total são liberados para a absorção na etapa intestinal.

A determinação de compostos bioativos nos extratos de alimentos não é suficiente para indicar seus possíveis efeitos na saúde humana, posto que apenas uma parte dos compostos presentes nos alimentos realmente é absorvida (Pellegrini et al., 2017), como foi demonstrado neste estudo. A presença do composto no resíduo sugere que estes não foram liberados ou foram liberados parcialmente para a absorção, como é o caso de kaempferol e naringenina da farinha de quinoa, ainda presentes no resíduo da fase intestinal.

A bioacessibilidade dos compostos fenólicos pode ter sido afetada por outros componentes da farinha de quinoa, como carboidratos, proteínas e fibras alimentares (Iglesias-Puig, Monedero e Haros, 2015), pois os compostos fenólicos se ligam fortemente a esses nutrientes, afetando sua digestão, motivo pelo qual são considerados antinutrientes (Chitindingu, Benhura e Muchuweti, 2015).

5.9. Atividade antibacteriana

A CIM foi determinada pela turbidez nos poços e o extrato considerado ativo quando inibiu o crescimento microbiano (Santos et al., 2018). Para o extrato de farinha de chia foi verificada a ausência de turbidez em todos os poços com extrato em concentração de 2000 µg mL⁻¹, indicando que nesta concentração o

extrato apresentou atividade bacteriostática contra *B. subtilis* e *P. aeruginosa*. Após a nova incubação em caldo nutriente sólido, foi observado o crescimento bacteriano, indicando que não houve atividade bactericida. Portanto, o extrato de farinha de chia é ativo em concentrações iguais ou superiores a 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com atividade bacteriostática contra *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Güzel, Ülger e Özay (2020) demonstraram que as sementes de chia apresentam atividade antimicrobiana e antiproliferativa contra vários microrganismos (fungos e bactérias gram-negativas e gram-positivas). No referido estudo, demonstrou-se que o extrato etanólico de sementes de chia possui atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, para a qual a CIM foi 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Abdel-Aty e colaboradores (2021) indicaram potente atividade antibacteriana de sementes de chia cruas e germinadas contra algumas bactérias entéricas humanas patogênicas. Assim como neste estudo, o extrato metanólico de sementes de chia crua em pó (farinha) exibiu atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* com CIM de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para a farinha de quinoa branca foi verificada turbidez em todos os poços com extrato, indicando que o extrato não apresentou atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* em concentrações inferiores ou iguais a 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Contudo, é conhecido que a quinoa contém diversos metabólitos secundários com atividades antimicrobianas (Lin et al., 2019), mas os fatores que alteram a composição bioativa, como origem geográfica, condições climáticas, práticas agrícolas e a extração, também afetam a eficácia do extrato em relação às propriedades biológicas (Güzel, Ülger e Özay, 2020).

A pesquisa de novas fontes de antimicrobianos, como plantas e alimentos vegetais, é de grande importância do ponto de vista da necessidade de identificar substâncias antimicrobianas para microrganismos que apresentam resistência aos medicamentos convencionais (Dikpinar e Süzgeç-Selçuk, 2020). Considerando também que a atividade antimicrobiana pode variar entre amostras do mesmo tipo em virtude de diversos fatores que influenciam a composição fitoquímica, é pertinente a investigação de espécies com reconhecida atividade antimicrobiana, como chia e quinoa, de origens geográficas distintas e submetidas a diferentes métodos de extração.

6. CONCLUSÕES

Evidências apontam que uma dieta rica em compostos fenólicos previne o desenvolvimento de doenças crônicas e degenerativas, principalmente devido ao potencial antioxidante desses compostos. Diante disso, é crescente o interesse por alimentos vegetais que fornecem, além de nutrientes, compostos bioativos potencialmente benéficos à saúde, produzidos naturalmente pelo metabolismo secundário da planta e por influência de fatores bióticos e abióticos do ambiente. Nesse contexto, o alto valor nutricional e a presença de compostos bioativos têm impulsionado o interesse por sementes e grãos, incorporados à dieta na forma integral e como farinha, bem como na produção de alimentos funcionais.

Considerando o crescente consumo de farinhas integrais de sementes e grãos, foram investigados a composição fitoquímica, os teores de compostos fenólicos, a bioacessibilidade de compostos fenólicos e as potenciais atividades antioxidante e antibacteriana de farinhas integrais. Para tanto, foram empregadas diversas estratégias analíticas, quanto à extração, separação, identificação e quantificação de compostos bioativos das farinhas integrais de linhaça (marrom e dourada), gergelim (preto e branco), chia (preta e branca), quinoa (branca) e amaranto (branco).

Aplicando planejamentos experimentais multivariados foi otimizado um método de extração sólido-líquido para compostos fenólicos de farinhas integrais, de modo a minimizar custos, consumo de insumos e tempo e maximizar a eficiência de extração. A validação permitiu assegurar precisão, exatidão e robustez do método de extração otimizado, que utilizou como solvente metanol:acetona (8:2, v v⁻¹) acidificado.

A análise do perfil fitoquímico dos extratos de farinhas integrais por CCD indicou que as farinhas integrais testadas apresentam ampla variedade de metabólitos secundários (compostos fenólicos, antocianinas, lignanas, taninos condensados, taninos hidrolisáveis, derivados antracênicos, antraquinonas, naftoquinonas, cumarinas, xantinas, saponinas, mono-, sesqui- e diterpenos, triterpenos e esteroides), com diferentes propriedades biológicas e diversas aplicabilidades, como alimentícia, farmacológica e bioquímica. A presença desses

fitoquímicos pode explicar os efeitos à saúde relacionados ao consumo destas farinhas.

Quanto à avaliação da atividade antioxidante, foram aplicados dois métodos espectrofotométricos baseados na inibição de radicais livres (DPPH e ABTS). De modo geral, foram obtidos maiores percentuais de inibição nos ensaios com o radical DPPH e, em relação às amostras analisadas, as farinhas integrais de chia apresentaram maior capacidade antioxidante *in vitro*, que variou de 82 a 94% de inibição DPPH•. Vale ressaltar que cada um dos métodos aplicados se baseia em um mecanismo e utiliza diferentes fontes de radicais, cuja estereoseletividade afeta a capacidade de reação do extrato e contra os quais os antioxidantes mostram diferentes potenciais.

Em relação ao conteúdo fenólico, os teores totais de compostos fenólicos determinados espectrofotometricamente variaram significativamente entre as farinhas integrais analisadas, o que é de se esperar, uma vez que cada espécie de planta sintetiza uma mistura característica de metabólitos secundários, além do fato de interações genético-ambientais influenciarem fortemente o perfil fenólico, o que também pode explicar a variação do conteúdo fenólico entre as amostras do mesmo tipo de farinha integral. Dentre as farinhas analisadas, de modo geral, foram verificados maiores teores totais de compostos fenólicos (4,10 a 5,89 mgEAG g⁻¹) e flavonoides (2,78 a 5,45 mgEQ g⁻¹) para as amostras de farinha de chia.

Foi desenvolvido um método de separação cromatográfica para 18 compostos bioativos (catequina, rutina, naringenina, quercetina, kaempferol, crisina, vanilina, teobromina e ácidos gálico, protocatecuico, clorogênico, cafeico, siríngico, p-cumárico, ferúlico, sinápico, elágico e transcinâmico), validado em dois sistemas cromatográficos utilizando os padrões de referência, tornando o método versátil ao possibilitar sua aplicabilidade a diferentes matrizes que contenham esses compostos fenólicos e antioxidantes.

Conforme observado nas determinações espectrofotométricas, as análises empregando CLAE-DAD revelaram uma diferença significativamente na composição das farinhas integrais analisadas, tendo sido obtidos perfis cromatográficos distintos para cada tipo de farinha integral. Entre os compostos

bioativos identificados nas amostras analisadas, foram obtidas maiores concentrações para: ácido sinápico (7,15 a 28,63 $\mu\text{g g}^{-1}$) e rutina (13,04 a 52,83 $\mu\text{g g}^{-1}$) nas farinhas de quinoa branca; catequina (30,95 a 263,71 $\mu\text{g g}^{-1}$) e ácido trans-cinâmico (19,64 a 238,56 $\mu\text{g g}^{-1}$) nas farinhas de chia; ácidos clorogênico (1,96 a 8,82 $\mu\text{g g}^{-1}$) e p-cumárico (1,08 a 14,23 $\mu\text{g g}^{-1}$) nas farinha de linhaça; e ácidos clorogênico (2,97 a 56,34 $\mu\text{g g}^{-1}$) e protocatecuico (12,87 a 47,02 $\mu\text{g g}^{-1}$) nas farinhas de gergelim.

Nas determinações por CLAE-DAD também foram observadas diferenças de composição entre as amostras do mesmo tipo de farinha, com grande variação de concentração para certos compostos bioativos. Essa variabilidade decorre do fato da produção de metabólitos secundários ser regulada por processos adaptativos, atendendo a demandas específicas da planta, e pela forte influência do ambiente ao qual a planta pertence, que pode levar a variações qualitativas e quantitativas de sua composição, causando acúmulo ou ausência de fitoquímicos nas amostras.

Aplicando análises multivariadas para a avaliação comparativa da composição de farinhas integrais foi evidenciado que o perfil fenólico depende da espécie e da variedade da planta, tendo sido identificados os potenciais biomarcadores de cada tipo de farinha (linhaça, gergelim e chia). Dessa forma demonstra-se o potencial da quimiometria para a verificação da autenticidade de farinhas integrais, ao passo que possibilitou extrair as informações necessárias do perfil cromatográfico, utilizado como uma impressão digital das amostras. Considerando o potencial risco de adulteração, este trabalho fornece subsídios para a investigação de autenticidade de farinhas integrais de sementes e grãos, contribuindo para a prevenção de fraude alimentar.

Sabendo que apenas uma parte dos compostos bioativos presentes nos alimentos é realmente absorvida e exerce algum efeito no organismo, apenas a identificação e quantificação dos metabólitos secundários não é suficiente para inferir sobre seus benefícios. Por isso há importância em se avaliar a bioacessibilidade dos compostos bioativos dos alimentos. Na avaliação da bioacessibilidade foi observado que a maior parte dos compostos fenólicos e

antioxidantes da farinha integral de quinoa branca se tornou bioacessível principalmente durante e após a digestão gástrica.

A composição fitoquímica da planta influencia diretamente suas atividades biológicas, do mesmo modo para os alimentos de origem vegetal. O extrato de farinha de chia apresentou atividade bacteriostática contra *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* em concentrações iguais ou superiores a 2000 µg mL⁻¹. Apesar do elevado teor de compostos fenólicos, o extrato de farinha de quinoa branca não apresentou atividade antibacteriana *B. subtilis* e *P. aeruginosa* em concentrações inferiores ou iguais a 2000 µg mL⁻¹.

Por fim, ressalta-se que o desenvolvimento de estratégias analíticas para a determinação de compostos bioativos em farinhas integrais de sementes e grãos, assim como para outros alimentos vegetais, é relevante por ser um caminho para apresentar potenciais fontes naturais de fitoquímicos com diversas possíveis aplicabilidades, como nas áreas de saúde, farmácia e alimentos.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Aty, A. M.; Elsayed, A. M.; Salah, H. A.; Bassuiny, R. I.; Mohamed, S. A. Egyptian chia seeds (*Salvia hispanica* L.) during germination: Upgrading of phenolic profile, antioxidant, antibacterial properties and relevant enzymes activities. **Food Science and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 723-734, 2021.
- Alfei, S.; Turrini, F.; Catena, S.; Zunin, P.; Grilli, M.; Pittaluga, A. M.; Boggia, R. Ellagic acid a multi-target bioactive compound for drug discovery in CNS? A narrative review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 183, 111724, 2019.
- Ahmed, E.; Arshad, M.; Khan, M. Z.; Amjad, M. S.; Sadaf, H. M.; Riaz, I.; Sabir, S.; Ahmad, N.; Saboon. Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, p. 205-214, 2017.
- Alibade, A.; Batra, G.; Bozinou, E.; Salakidou, C.; Lalas, S. Optimization of the extraction of antioxidants from winery wastes using cloud point extraction and a surfactant of natural origin (lecithin). **Chemical Papers**, v. 74, p. 4517-4524, 2020.
- Alu'datt, M. H.; Rababah, T.; Alhamad, M. N.; Al-Mahasneh, M. A.; Almajwal, A.; Gammoh, S.; Ereifej, K.; Johargy, A.; Alli, I. A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 218, p. 99-106, 2017.
- Alvarez-Jubete, L.; Wijngaard, H.; Arendt, E. K.; Gallagher, E. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa and buckwheat as affected by sprouting and baking. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 770-778, 2010.
- Alvites-Misajel, K.; García-Gutiérrez, M.; Miranda-Rodríguez C.; Ramos-Escudero, F. Organically vs conventionally-grown dark and white chia seeds (*Salvia hispanica* L.): fatty acid composition, antioxidant activity and techno-functional properties. **Grasas Y Aceites**, v. 70, n. 2, e299, 2019.
- Amalan, V.; Vijayakumar, N.; Indumathi, D.; Ramakrishnan, A. Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of p-coumaric acid in diabetic rats, role of pancreatic GLUT 2: In vivo approach. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 230-236, 2016.
- Amarowicz, R.; Carle, R.; Dongowski, G.; Durazzo, A.; Galensa, R.; Kammerer, D.; Maiani, G.; Piskula, M. K. Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, p. S151-S183, 2009.
- Amato, M.; Caruso, M. C.; Guzzo, F.; Galgano, F.; Commisso, M.; Bochicchio, R.; Labella, R.; Favati, F. Nutritional quality of seeds and leaf metabolites of Chia (*Salvia hispanica* L.) from Southern Italy. **European Food Research and Technology**, v. 241, p. 615-625, 2015.

André, C.; Castanheira, I.; Cruz, J. M.; Paseiro, P.; Sanches-Silva, A. Analytical strategies to evaluate antioxidants in food: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 5, p. 229-246, 2010.

Angelino, D.; Cossu, M.; Marti, A.; Zanoletti, M.; Chiavaroli, L.; Brighenti, F.; Rio, D. D.; Martini, D. Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in bread: a review. **Food & Function**, v. 8, n. 7, p. 2368-2393, 2017.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução CNNPA nº 12 de 1978**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/12_78_farinhas.htm. Acessado em 19/09/2018.

Armenta, S.; Garrigues, S.; Esteve-Turrillas, F. A.; Guardia, M. Green extraction techniques in green analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 116, p. 248-253, 2019.

Asao, M.; Watanabe, K. Functional and Bioactive Properties of Quinoa and Amaranth. **Food Science and Technology Research**, v. 16, n. 2, p. 163-168, 2010.

Athankar, K. K.; Wasewar, K. L.; Varma, M. N. Shende, D. Z. Reactive extraction of gallic acid with tri-n-caprylylamine. **New Journal of Chemistry**, v. 40, n. 3, p. 2413-2417, 2016.

Atta, E. M.; Mohamed, N. H.; Abdelgawad, A. A. M. Antioxidants: An Overview on the Natural and Synthetic Types. **European Chemical Bulletin**, v. 6, n. 8, p. 365-375, 2017.

Ayerza, R. Effects of seed color and growing locations on fatty acid content and composition of two chia (*Salvia hispanica* L.) genotypes. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 10, p. 1161-1165, 2010.

Ayerza, R. Seed composition of two chia (*Salvia hispanica* L.) genotypes which differ in seed color. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 25, n. 7, p. 495-500, 2013.

Azam, S.; Hadi, N.; Khan, N. U.; Hadi, S. M. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. **Medical Science Monitor**, v. 9, n. 9, p. 325-330, 2003.

Azevedo, R. S. A.; Teixeira, B. S.; Sauthier, M. C. S.; Santana, M. V. A.; Santos, W. N. L.; Santana, D. A. Multivariate analysis of the composition of bioactive in tea of the species *Camellia sinensis*. **Food Chemistry**, v. 273, p. 39-44, 2019.

Badarinath, A. V.; Rao, K. M.; Chetty, C. M. S.; Ramkanth, S.; Rajan, T. V. S.; Gnanaprakash, K. A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and consideration. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 2, p. 1276-1285, 2010.

- Badria, F. A.; Ibrahim, A. S. Evaluation of natural anthracene-derived compounds as antimetabolic agents. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 7, p. 84-89, 2013.
- Balakrishnan, G.; Schneider, R. S. Quinoa flavonoids and their bioaccessibility during in vitro gastrointestinal digestion. **Journal of Cereal Science**, v. 95, 103070, 2020.
- Barba, F. J.; Zhu, Z.; Koubaa, M.; Sant'Ana, A. S.; Orlie, V. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 49, p. 96-109, 2016.
- Barros, L.; Dueñas, M.; Dias, M. I.; Sousa, M. J.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I. C. F. R. Phenolic profiles of cultivated, *in vitro* cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 1-8, 2013.
- Barroso, A. K. M.; Torres, A. G.; Castelo-Branco, V. N.; Ferreira, A.; Finotelli, P. V.; Freitas, S. P. Linhaça marrom e dourada: propriedades químicas e funcionais das sementes e dos óleos prensados a frio. **Ciência Rural**, v. 44, n. 1, p. 181-187, 2014.
- Becker, M. M.; Nunes, G. S.; Ribeiro, D. B.; Silva, F. E. P. S.; Catanante, G.; Marty, J. L. Determination of the antioxidant capacity of red fruits by miniaturized spectrophotometry assays. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 5, p. 1108-1114, 2019.
- Benabdallah, A.; Rahmoune, C.; Boumendjel, M.; Aissi, O.; Messaoud, C. Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha species* (Lamiaceae) from northeast of Algeria. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 9, p. 760-766, 2016.
- Bessa, T.; Terrones, M. G. H.; Santos, D. Q. Avaliação fitotóxica e identificação de metabólitos secundários da raiz de *Cenchrus echinatus*. **Horizonte Científico**, v. 1, n. 1, 2007.
- Bezerra, D. P.; Soares, A. K. N.; Sousa, D. P. Overview of the Role of Vanillin on Redox Status and Cancer Development. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 9734816, 2016.
- Bisio, A.; Pedrelli, F.; D'Ambola, M.; Labanca, F.; Schito, A.; Govaerts, R.; De Tommasi, N.; Milella, L. Quinone diterpenes from *Salvia* species: chemistry, botany, and biological activity. **Phytochemistry Reviews**, v. 18, n. 3, p. 665-842, 2019.
- Boz, H. p-Coumaric acid in cereals: presence, antioxidant and antimicrobial effects. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 11, p. 2323-2328, 2015.

Bravi, E.; Perretti, G.; Marconi, O.; Patrizi, E.; Fantozzi, P. Secoisolariciresinol diglucoside determination in flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil and application to a shelf life study. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1553-1558, 2011.

Brito, I. L.; Souza, E. L.; Felex, S. S. S.; Madruga, M. S.; Yamashita, F.; Magnani, M. Nutritional and sensory characteristics of gluten-free quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd)-based cookies development using an experimental mixture design. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 5866-5873, 2015.

Bueno, M. A. S. Papel atual das metilxantinas (aminofilina e teofilina) nas doenças respiratórias. **Einstein**, v. 1, p. 141-142, 2003.

Calderelli, V. A. S.; Benassi, M. T.; Visentainer, J. V.; Matioli, G. Quinoa and flaxseed: potential ingredients in the production of bread with functional quality. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 4, p. 981-986, 2010.

Calderon-Montano, J. M.; Burgos-Moron, E.; Perez-Guerrero, C.; Lopez-Lazaro, M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 298-344, 2011.

Calegari, M. A.; Prasniewski, A.; Silva, C.; Sado, R. Y.; Maia, F. M. C.; Tonial, L. M. S.; Oldoni, T. L. C. Propolis from Southwest of Parana produced by selected bees: Influence of seasonality and food supplementation on antioxidant activity and phenolic profile. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 89, n. 1, p. 45-55, 2017.

Caleja, C.; Barros, L.; Antonio, A. L.; Ciric, A.; Sokovic, M.; Oliveira, M. B. P. P.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I. C. F. R. *Foeniculum vulgare* Mill. as natural conservation enhancer and health promoter by incorporation in cottage cheese. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 428-438, 2015.

Călinoiu, L. F.; Vodnar, D. C. Whole Grains and Phenolic Acids: A Review on Bioactivity, Functionality, Health Benefits and Bioavailability. **Nutrients**, v. 10, n. 11, 2018.

Carciochi, R. A.; D'Alessandro, L. G.; Manrique, G. D. Effect of roasting conditions on the antioxidant compounds of quinoa seeds. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, p. 1018-1025, 2016.

Casas, L.; Mantell, C.; Rodriguez, M.; Torres, A.; Macias, F. A.; Ossa, E. M. Extraction of natural compounds with biological activity from sunflower leaves using supercritical carbon dioxide. **Chemical Engineering Journal**, v. 152, n. 2, p. 301-306, 2009.

Cass, Q. B.; Degani, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EdUFSCar, 2011.

Castrillón-Arbeláez, P. A.; Frier, P.D. **Secondary metabolism in *maranthus* spp. - A genomic approach to understand its diversity and responsiveness to stress in marginally studied crops with high agronomic potential.** *In:*

Shanker, A. K.; Shanker, C. Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives. IntechOpen, 2016.

Ceci, C.; Graziani, G.; Faraoni, I.; Cacciotti, I. Strategies to improve ellagic acid bioavailability: from natural or semisynthetic derivatives to nanotechnological approaches based on innovative carriers. **Nanotechnology**, v. 31, 382001, 2020.

Cerqueira, M. B. R.; Dias, A. N.; Caldas, S. S.; Santana, F. B.; D'Oca, M. G. M.; Primel, E.G. validação de método para determinação de ácidos orgânicos voláteis em efluentes de reatores anaeróbios empregando cromatografia líquida. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 156-159, 2011.

Chatzilazarou, A.; Katsoyannos, E.; Gortzi, O.; Lalas, S.; Paraskevopoulos, Y.; Dourtoglou, E.; Tsaknis, J. Removal of Polyphenols from Wine Sludge using Cloud Point Extraction. **Journal of Air and Waste Management**, v. 60, p. 454-459, 2010.

Chen, C. Sinapic acid and its derivatives as medicine in oxidative stress-induced diseases and aging. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 3571614, 2016.

Chitindingu, K.; Benhura, M. A. N.; Muchuweti, M. *In vitro* bioaccessibility assessment of phenolic compounds from selected cereal grains: A prediction tool of nutritional efficiency. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 575-581, 2015.

Cianciosi, D.; Forbes-Hernández, T. Y.; Giampieri, F.; Zhang, J.; Ansary, J.; Pacetti, M.; Quiles, J. L.; Simal-Gandara, J.; Battino, M. Effect of *in vitro* Gastrointestinal Digestion on the Bioaccessibility of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Manuka Honey. **eFood**, v. 1, n. 1, p. 85-93, 2020.

Coelho, M. S.; Salas-Mellado, M. M. Composição química, propriedades funcionais e aplicações tecnológicas da semente de chia (*Salvia hispanica* L) em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 4, p. 259-268, 2014.

Coelho, M. S.; Salas-Mellado, M. M. Effects of Substituting Chia (*Salvia hispanica* L.) Flour or Seeds for Wheat Flour on the Quality of the Bread. **LWT – Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 729-736, 2015.

Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2006.

Cömert, E. D.; Gökmen, V. Antioxidants bound to an insoluble food matrix: Their analysis, regeneration behavior, and physiological importance. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 3, p. 382-399, 2017.

Cömert, E. D.; Gökmen, V. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. **Food Research International**, v. 105, p. 76-93, 2018.

Cong-Cong, X.; Bing, W.; Yi-Qiong, P.; Jian-Sheng, T.; Tong, Z. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 10, p. 721-731, 2017.

Corbin, C.; Fidel, T.; Leclerc, E. A.; Barakzoy, E.; Sagot, N.; Falguières, A.; Renouard, S.; Blondeau, J. P.; Ferroud, C.; Doussot, J.; Lainé, E.; Hano, C. Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 26, p. 176-185, 2015.

Cornejo, F.; Novillo, G.; Villacrés, E.; Rosell, C. M. Evaluation of the physicochemical and nutritional changes in two amaranth species (*Amaranthus quitensis* and *Amaranthus caudatus*) after germination. **Food Research International**, v. 121, p. 933-939, 2019.

Costantini, L.; Lukšič, L.; Molinari, R.; Kreft, I.; Bonafaccia, G.; Manzi, L.; Merendino, N. Development of gluten-free bread using tartary buckwheat and chia flour rich in flavonoids and omega-3 fatty acids as ingredients. **Food Chemistry**, v. 165, p. 232-240, 2014.

D'Archivio, M.; Filesi, C.; Vari, R.; Scazzocchio, B.; Masella, R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 4, p. 1321-1342, 2010.

Darroz, J. V.; Fuso, L. C.; Borges, N. M.; Gomes, A. J. P. S. Utilização de fitoterápicos no tratamento de constipação intestinal. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 18, n. 2, p. 113-119, 2014.

Das, A. B.; Goud, V. V.; Das, C. **Phenolic compounds as functional ingredients in beverages**. In: Grumezescu, A. M.; Holban, A. M. Value-Added Ingredients and Enrichments of Beverages. Volume 14: The Science of Beverages. Cambridge: Academic press, 2019, p. 285-323.

Das, A.; Raychaudhuri, U.; Chakraborty, R. Cereal based functional food of Indian subcontinent: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 6, p. 665-672, 2012.

Davalos, A.; Gomez-Cordoves, C.; Bartolome, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 48-54, 2004.

Delgado-Andrade, C.; Conde-Aguilera, J. A.; Haro, A.; Cueva, S. P.; Rufián-Henares, J. A. A combined procedure to evaluate the global antioxidant response of bread. **Journal of Cereal Science**, v. 52, n. 2, p. 239-246, 2010.

Dias, M. I.; Barros, L.; Dueñas, M.; Pereira, E.; Carvalho, A. M.; Alves, R. C.; Oliveira, B. P. P.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I. C. F. R. Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic

extract, infusion and decoction. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 4152-4160, 2013.

Dikpınar, T.; Süzgeç-Selçuk, S. Antimicrobial Activities of Medicinal Plants Containing Phenolic Compounds. **The Natural Products Journal**, v. 10, n. 5, p. 514-534, 2020.

Dravie, E. E.; Kortei, N. K.; Essuman, E. K.; Tettey, C. O.; Boakye, A. A.; Hunkpe, G. Antioxidant, phytochemical and physicochemical properties of sesame seed (*Sesamum indicum* L). **Scientific African**, v. 8, e00349, 2020.

Ellis, D. I.; Brewster, V. L.; Dunn, W. B.; Allwood, J. W.; Golovanov, A. P.; Goodacre, R. Fingerprinting food: Current technologies for the detection of food adulteration and contamination. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 17, 5706-5727, 2012.

El-Najjar, N.; Gali-Muhtasib, H.; Ketola, R. A.; Vuorela, P.; Urtti, A.; Vuorela, H. The chemical and biological activities of quinones: overview and implications in analytical detection. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, p. 353-370, 2011.

Erbán, A.; Ines Fehrle, I.; Martínez-Seidel, F.; Brigante, F.; Más, A. L.; Baroni, V.; Wunderlin, D.; Kopka, J. Discovery of food identity markers by metabolomics and machine learning technology. **Scientific Reports**, v. 9, 9697, 2019.

Escribano, J.; Cabanes, J.; Jiménez-Atiéndzar, M.; Ibañez-Tremolada, M.; Gómez-Pando, L. R.; García-Carmona, F.; Gandía-Herrero, F. Characterization of betalains, saponins and antioxidant power in differently colored quinoa (*Chenopodium quinoa*) varieties. **Food Chemistry**, v. 234, p. 285-294, 2017.

Eskin, N. A. M.; Przybylski, R. Antioxidants and shelf life of foods. *In*: Eskin, N. A. M.; Robinson, D. S. **Food Shelf Life Stability**. Boca Raton: CRC Press, 2000, p. 186.

Everette, J. D.; Bryant, Q. M.; Green, A. M.; Abbey, Y. A.; Wangila, G. W.; Walker, R. B. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8139-8144, 2010.

Eyong, K. O.; Kuete, V.; Efferth, T. **Quinones and Benzophenones from the Medicinal Plants of Africa**. *In*: Kuete, V. Medicinal Plant Research in Africa. Elsevier, 2013. p. 351-391.

Falco, B.; Incerti, G.; Bochicchio, R.; Phillips, T. D.; Amato, M.; Lanzotti, V. Metabolomic analysis of *Salvia hispanica* seeds using NMR spectroscopy and multivariate data analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 99, p. 86-96, 2017.

Falco, B.; Lanzotti, V. NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics analysis of *Salvia*. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, p. 951-972, 2018.

Ferreira, P. S.; Victorelli, F. D.; Fonseca-Santos, B.; Chorilli, M. A Review of Analytical Methods for p-Coumaric Acid in Plant-Based Products, Beverages, and Biological Matrices. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 49, p. 21-31, 2019.

Ferreira, S. L. C. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos**. Salvador: Vento Leste, 2015.

Fischer, S.; Wilckens, R.; Jara, J.; Aranda, M. Variation in antioxidant capacity of quinoa (*Chenopodium quinoa* Will) subjected to drought stress. **Industrial Crops and Products**, v. 46, p. 341-349, 2013.

Fogliano, V.; Verde, V.; Randazzo, G.; Ritieni, A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 1035-1040, 1999.

Fotakis, C.; Tsigrimani, D.; Tsiaka, T.; Lantzouraki, D. Z.; Strati, I. F.; Makris, C.; Tagkouli, D.; Proestos, C.; Sinanoglou, V. J.; Zoumpoulakis, P. Metabolic and antioxidant profiles of herbal infusions and decoctions. **Food Chemistry**, v. 211, p. 963-971, 2016.

Fouillaud, M.; Venkatachalam, M.; Girard-Valenciennes, E.; Caro, Y.; Dufossé, L. Anthraquinones and derivatives from marine-derived fungi: Structural diversity and selected biological activities. **Marine Drugs**, v. 14, n. 4, 64, 2016.

Furumoto, T.; Nishimoto, K. Identification of a characteristic antioxidant, anthrasesamone F, in black sesame seeds and its accumulation at different seed developmental stages. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 80, p. 350-355, 2016.

Gewehr, M. F.; Danelli, D.; Melo, L. M.; Flöres, S. H.; Jong, E. V. Nutritional and Technological Evaluation of Bread Made with Quinoa Flakes (*Chenopodium quinoa* Willd). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 2, e12803, 2017.

Ghaffar, N.; Javad, S. **Plants and nanoworld: An introduction**. In: Javad, S.; Butt, A. Nanobotany. Springer International Publishing, 2018.

Ghafoor, K.; Al Juhaimi, F.; Özcan, M.M.; Uslu, N.; Ahmed, I. A. M.; Babiker, E. E. The effect of boiling, germination and roasting on bioactive properties, phenolic compounds, fatty acids and minerals of chia seed (*Salvia hispanica* L.) and oils. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 27, 100447, 2021.

Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, v. 30, 374-381, 2007.

Gómez-Caravaca, A. M.; Iafelice, G.; Lavini, A.; Pulvento, C.; Caboni, M. F.; Marconi, E. Phenolic Compounds and Saponins in Quinoa Samples (*Chenopodium quinoa* Willd.) Grown under Different Saline and Nonsaline

Irrigation Regimens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, 4620-4627, 2012.

Gorinstein, S.; Vargas, O. J. M.; Jaramillo, N. O.; Salas, I. A.; Ayala, A. L. M.; Arancibia-Avila, P.; Toledo, F.; Katrich, E.; Trakhtenberg, S. The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. **European Food Research and Technology**, v. 225, p. 321-328, 2007.

Gortzi, O.; Lalas, S.; Chatzilazarou, A.; Katsoyannos, E.; Papaconstandinou, S.; Dourtoglou, E. Recovery of Natural Antioxidants from Olive Mill Wastewater Using Genapol-X080. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, p. 133-140, 2008.

Gullon, B.; Pintado, M. E.; Barber, X.; Fernández-López, J.; Pérez-Álvarez, J. A.; Viuda-Martos, M. Bioaccessibility, changes in the antioxidant potential and colonic fermentation of date pits and apple bagasse flours obtained from co-products during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v. 78, p. 169-176, 2015.

Gutte, K. B.; Sahoo, A. K.; Ranveer, R. C. Bioactive components of flaxseed and its health benefits. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 31, n. 1, p. 42-51, 2015.

Güzel, S.; Ülger, M.; Özyay, Y. Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds. **International Journal of Secondary Metabolite**, v. 7, n. 3, p. 174-180, 2020.

Hailelassie, H. A.; Henry, C. J.; Tyler, R. T. Impact of household food processing strategies on antinutrient (phytate, tannin and polyphenol) contents of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and beans (*Phaseolus vulgaris* L.): a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 1947-1957, 2016.

Haminiuk, C. W. I.; Maciel, G. M.; Plata-Oviedo, M. S. V.; Peralta, R. M. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 10, p. 2023-2044, 2012.

Han, R. M.; Tían, Y. X.; Liu, Y.; Chen, C. H., Ai, X. C.; Zhang, J. P.; Skibsted, L. H. Comparison of flavonoids and isoflavonoids as antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 9, p. 3780-3785, 2009.

Han, Y.; Chi, J.; Zhang, M.; Zhang, R.; Fan, S.; Dong, L.; Huang, F.; Liu, L. Changes in saponins, phenolics and antioxidant activity of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd) during milling process. **LWT - Food Science and Technology**, v. 114, 2019.

Hanan, M. A.; Nahla, S. Z.; Abdelaleem, M. A. Nutritional applications of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* W.) and their effect on diabetic rats. **International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences**, v. 8, n. 4, p.23-36, 2019.

- Hartogh, D. J. D.; Tsiani, E. Antidiabetic Properties of Naringenin: A Citrus Fruit Polyphenol. **Biomolecules**, v. 9, n. 3, 99, 2019.
- He, J.; Giusti, M. M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, p. 163-187, 2010.
- Heleno, S. A.; Martins, A.; Queiroz, M. J. R. P.; Ferreira, I. C. F. R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites *versus* parent compounds: A review. **Food Chemistry**, v. 173, p. 501-513, 2015.
- Hemalatha, P.; Bomzan, D. P.; Rao, B. V. S.; Sreerama, Y. N. Distribution of phenolic antioxidants in whole and milled fractions of quinoa and their inhibitory effects on α -amylase and α -glucosidase activities. **Food Chemistry**, v. 199, p. 330-338, 2016.
- Herchi, W.; Arráez-Román, D.; Trabelsi, H.; Bouali, I.; Boukhchina, S.; Kallel, H.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutierrez, A. Phenolic compounds in flaxseed: a review of their properties and analytical methods. An overview of the last decade. **Journal of Oleo Science**, v. 63, p. 7-14, 2014.
- Hung, L. Q.; Thuong, P. T.; Tung, N. H. A new ursane-type triterpene from the roots of *Salvia miltiorrhiza* bunge. **Records of Natural Products**, v. 13, n. 5, p. 429-433, 2019.
- Iglesias-Puig, E.; Monedero, V.; Haros, M. Bread with whole quinoa flour and bifidobacterial phytases increases dietary mineral intake and bioavailability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 71-77, 2015.
- Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.
- Imran, M.; Anjum, F. M.; Butt, M. S.; Sheikh, M. A. Influence of Extrusion Processing on Tannin Reduction and Oil Loss in Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) Meal. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 38, p. 622-629, 2014.
- Imran, M.; Salehi, B.; Sharifi-Rad, J.; Gondal, T.A.; Saeed, F.; Imran, A.; Shahbaz, M.; Fokou, P. V. T.; Arshad, M. U.; Khan, H.; Guerreiro, S. G.; Martins, N.; Estevinho, L. M. Kaempferol: A Key Emphasis to Its Anticancer Potential. **Molecules**, v. 24, 2277, 2019.
- Ivanova-Petropulos, V.; Mitrev, S.; Stafilov, T.; Markova, N.; Leitner, E.; Lankmayr, E.; Siegmund, B. Characterisation of traditional Macedonian edible oils by their fatty acid composition and their volatile compounds. **Food Research International**, v. 77, p. 506-514, 2015.
- Ixtaina, V. Y.; Martínez, M. L.; Spotorno, V.; Mateo, C. M.; Maestri, D. M.; Diehl, B. W. K. Characterization of Chia Seed Oils Obtained by Pressing and Solvent

Extraction. **Journal of Food Composition Analysis**, v. 24, n. 2, p. 166-174, 2011.

Jimoh, W. A.; Fagbenro, O. A.; Adeparusi, E. O. Effect of processing on some minerals, anti-nutrients and nutritional composition of sesame (*Sesamum Indicum*) seed meals. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 10, p. 1858-1865, 2011.

Kabera, J. N.; Semana, E.; Mussa A. R.; He, X. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, p. 377-392, 2014.

Kafkas, N. E.; Kosar, M.; Oz, A. T.; Mitchell, A. E. Advanced Analytical Methods for Phenolics in Fruits. **Journal of Food Quality**, v. 2018, 3836064, 2018.

Kalinová, J. P.; Vrchotová, N.; Tříška, J. Contribution to the study of rutin stability in the achenes of Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). **Food Chemistry**, v. 258, p. 314-320, 2018.

Kanmaz, E. Ö. Subcritical water extraction of phenolic compounds from flaxseed meal sticks using accelerated solvent extractor (ASE). **European Food Research and Technology**, v. 238, p. 85-91, 2014.

Karamac, M.; Gai, F.; Longato, E.; Meineri, G.; Janiak, M. A.; Amarowicz, R.; Peiretti, P. G. Antioxidant activity and phenolic composition of amaranth (*Amaranthus caudatus*) during plant growth. **Antioxidants**, v. 8, n. 173, 2019.

Kashani, H. H.; Hoseini, E. S.; Nikzad, H.; Aarabi, M. H. Pharmacological properties of medicinal herbs by focus on secondary metabolites. **Life Science Journal**, v. 9, p. 509-520, 2012.

Kasote, D. M. Flaxseed phenolics as natural antioxidants. **International Food Research Journal**, v. 20, p. 27-34, 2013.

Katsoyannos, E.; Gortzi, O.; Chatzilazarou; Athanasiadis, Y.; Tsaknis, J.; Lalas, S. Evaluation of the suitability of low hazard surfactants for the separation of phenols and carotenoids from red-flesh orange juice and olive mill wastewater using cloud point extraction. **Journal of Separation Science**, v. 35, p. 2665-2670, 2012.

Kaur, S.; Bains, K. Chia (*Salvia hispanica* L.) – a rediscovered ancient grain, from Aztecs to food laboratories. **Nutrition & Food Science**, v. 50, n. 3, p. 463-479, 2020.

Kelly, G. S. Quercetin. **Alternative Medicine Review**, v. 16, n. 2, p. 172-194, 2011.

Kermani, S. G.; Saeidi, G.; Sabzalian, M. R.; Gianinetti, A. Drought stress influenced sesamin and sesamol content and polyphenolic components in sesame (*Sesamum indicum* L.) populations with contrasting seed coat colors. **Food Chemistry**, v. 289, p. 360-368, 2019.

Khademian, R.; Asghari, B.; Sedaghati, B.; Yaghoobian, Y. Plant beneficial rhizospheric microorganisms (PBRMs) mitigate deleterious effects of salinity in sesame (*Sesamum indicum* L.): physio-biochemical properties, fatty acids composition and secondary metabolites content. **Industrial Crops and Products**, v. 136, p. 129-139, 2019.

Kiokias, S.; Varzakas, T.; Oreopoulou, V. *In vitro* activity of vitamins, flavonoids, and natural phenolic antioxidants against the oxidative deterioration of oil-based systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 1, p. 78-93, 2008.

Kokou, F.; Fountoulaki, E. Aquaculture waste production associated with antinutrient presence in common fish feed plant ingredients. **Aquaculture**, v. 495, p. 295-310, 2018.

Krogdahl, A.; Penn, M.; Thorsen, J.; Refstie, S.; Bakke, A. M. Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 3, p. 333-344, 2010.

Kumar, N.; Pruthi, V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. **Biotechnology Reports**, v. 4, p. 86-93, 2014.

Kunyanga, C. N.; Imungi, J. K.; Okoth, M.; Momanyi, C.; Biesalski, H. K.; Vadivel, V. Antioxidant and antidiabetic properties of condensed tannins in acetonic extract of selected raw and processed indigenous food ingredients from Kenya. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 4, p. C560-C567, 2011.

Lanças, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC / CLAE**. Campinas, SP: Editora Átomo, 2009.

Landete, J. M. Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. **Food Research International**, v. 46, n. 1, p. 410-424, 2012.

Lattin, J.; Carroll, J. D.; Green, P. E. **Analyzing multivariate data**. Pacific Grove: Thomson Brooks/Cole, 2003.

Li, H.; Deng, Z.; Liu, R.; Zhu, H.; Draves, J.; Marcone, M.; Sun, Y.; Tsao, R. Characterization of phenolics, betacyanins and antioxidant activities of the seed, leaf, sprout, flower and stalk extracts of three *Amaranthus* species. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 37, p. 75-81, 2015a.

Li, X.; Li, J.; Dong, S.; Li, Y.; Wei, L.; Zhao, C.; Li, J.; Liu, X.; Wang, Y. Effects of germination on tocopherol, secoisolariciresinol diglucoside, cyanogenic glycosides and antioxidant activities in flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 7, p. 2346-2354, 2019.

Li, Y.; Ma, D.; Sun, D.; Wang, C.; Zhang, J.; Xie, Y.; Guo, T. Total phenolic, flavonoid content, and antioxidant activity of flour, noodles, and steamed bread

made from different colored wheat grains by three milling methods. **The Crop Journal**, v. 3, n. 4, p. 328-334, 2015b.

Li, Y.; Padoan, E.; Ajmone-Marsan, F. Soil particle size fraction and potentially toxic elements bioaccessibility: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 209, 111806, 2021.

Limwachiranon, J.; Huang, H.; Li, L.; Lin, X.; Zou, L.; Liu, J.; Zou, Y.; Aalim, H.; Duan, Z.; Luo, Z. Enhancing stability and bioaccessibility of chlorogenic acid using complexation with amylopectin: A comprehensive evaluation of complex formation, properties, and characteristics. **Food Chemistry**, v. 311, 125879, 2020.

Lin, M.; Han, P.; Li, Y.; Wang, W.; Lai, D.; Zhou, L. Quinoa Secondary Metabolites and Their Biological Activities or Function. **Molecules**, v. 24, n. 13, 2512, 2019.

Luo, W.; Zhao, M.; Yang, B.; Ren, J.; Shen, G.; Rao, G. Antioxidant and antiproliferative capacities of phenolics purified from *Phyllanthus emblica* L. fruit. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 277-282, 2011.

Luthar, Z.; Germ, M.; Likar, M.; Golob, A.; Vogel-Mikuš, K.; Pongrac, P.; Kušar, A.; Pravst, I.; Kreft, I. Breeding Buckwheat for Increased Levels of Rutin, Quercetin and Other Bioactive Compounds with Potential Antiviral Effects. **Plants**, v. 9, 1638, 2020.

Magalhães, B. E. A.; Oliveira, F. G. S.; Freitas, A. G. M. **Pólen apícola – Compostos bioativos e benefícios à saúde**. Beau Bassin: Novas Edições Acadêmicas, 2018.

Magalhães, B. E. A.; Santana, D. A.; Silva, I. M. J; Minho, L. A. C.; Gomes, M. A.; Almeida, J. R. G. S; Santos, W. N. L. Determination of phenolic composition of oil seed whole flours by HPLC-DAD with evaluation using chemometric analyses. **Microchemical Journal**, v. 155, 104683, 2020.

Magalhães, B. E. A.; Santos, W. N. L. Phenolic content and antioxidant capacity of infusions herbs: Optimization of phenolic extraction and HPLC-DAD method. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. 3, e20190646, 2020a.

Magalhães, B. E. A.; Santos, W. N. L. **Conteúdo fenólico e atividade antioxidante de farinha integral de amaranto**. In: Nardeli, J. V. Atividades de ensino e de pesquisa em química. Ponta Grossa: Atena, 2020b, p. 87-94.

Mani, R.; Natesan, V. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. **Phytochemistry**, v. 145, p. 187-196, 2018.

Manning, L.; Soon, J. M. Developing systems to control food adulteration. **Food Policy**, v. 49, p. 23-32, 2014.

Martínez-Cruz, O.; Paredes-López, O. Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) by ultra high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1346, p. 43-48, 2014.

Masodsai, K.; Lin, Y.; Chaunchaiyakul, R.; Su, C.; Lee, S.; Yang, A. Twelve-Week Protocatechuic Acid Administration Improves Insulin-Induced and Insulin-Like Growth Factor-1-Induced Vasorelaxation and Antioxidant Activities in Aging Spontaneously Hypertensive Rats. **Nutrients**, v. 11, 699, 2019.

Meas, S.; Luengwilai, K.; Thongket, T. Enhancing growth and phytochemicals of two amaranth microgreens by LEDs light irradiation. **Scientia Horticulturae**, v. 265, 109204, 2020.

Mekinić, I. G.; Skroza, D.; Ljubenkov, I.; Katalinić, V.; Šimat, V. Antioxidant and Antimicrobial Potential of Phenolic Metabolites from Traditionally Used Mediterranean Herbs and Spices. **Foods**, v. 8, 579, 2019.

Merken, H. M.; Beecher, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.

Mingoti, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2013.

Mishra, K.; Ojha, H.; Chaudhury, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: a critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036-1043, 2012.

Musial, C.; Kuban-Jankowska, A.; Gorska-Ponikowska, M. Beneficial Properties of Green Tea Catechins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, 1744, 2020.

Musialik, M.; Kuzmicz, R.; Pawlowski, T. S.; Litwinienko, G. Acidity of hydroxyl groups: An overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 7, p. 2699-2709, 2009.

Naveed, M.; Hejazi, V.; Abbas, M.; Kamboh, A. A.; Khan, G. J.; Shumzaid, M.; Ahmad, F.; Babazadeh, D.; FangFang, X.; Modarresi-Ghazani, F.; WenHu, L.; XiaoHui, Z. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 67-74, 2018.

Navruz-Varli, S.; Sanlier, N. Nutritional and health benefits of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). **Journal of Cereal Science**, v. 69, p. 371-376, 2016.

Negri, M.; Salci, T. P.; Shinobu-Mesquita, C. S.; Capoci, I. R. G.; Svidzinski, T. I. E.; Kioshima, E. S. Early state research on antifungal natural products. **Molecules**, v. 19, p. 2925-2956, 2014.

Nikolić, N.; Mitrović, J.; Karabegović, I.; Savić, S.; Petrović, S.; Lazić, M.; Stojanović, G. A comparison between wheat and different kinds of corn flour based on minerals, free phenolic acid composition and antioxidant activity. **Journal of Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, v. 11, n. 4, 2019.

- Nsimba, R. Y.; Kikuzaki, H.; Konishi, Y. Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. seeds. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 760-766, 2008.
- Okai, N.; Miyoshi, T.; Takeshima, Y.; Kuwahara, H.; Ogino, C.; Kondo, A. Production of protocatechuic acid by *Corynebacterium glutamicum* expressing chorismate-pyruvate lyase from *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p.135-145, 2016.
- Olawaye, B. T.; Gbadamosi, S. O. Effect of different treatments on in vitro protein digestibility, antinutrients, antioxidant properties and mineral composition of *Amaranthus viridis* seed. **Cogent Food & Agriculture**, v. 3, n. 1, 2017.
- Oliveira, A. C.; Valentim, I. B.; Goulart, M. O. F.; Silva, C. A.; Bechara, E. J. H.; Trevisan, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, p. 689-702, 2009.
- Oliveira-Júnior, R. G.; Ferraz, C. A. A.; Souza, G. R.; Guimarães, A. L.; Oliveira, A. P.; Lima-Saraiva, S. R. G.; Rolim, L. A.; Rolim-Neto, P. J.; Almeida, J. R. G. S. Phytochemical analysis and evaluation of antioxidant and photoprotective activities of extracts from flowers of *Bromelia laciniosa* (*Bromeliaceae*). **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 31, n. 3, p. 600-605, 2017.
- Olivieri, A. C. Analytical figures of merit: from univariate to multiway calibration. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 5358-5378, 2014.
- Ostrosky, E. A.; Mizumoto, M. K.; Lima, M. E. L.; Kaneko, T. M.; Nishikawa, S.O.; Freitas, B.R. Methods for evaluation of the antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 301-307, 2008.
- Othman, S. B.; Katsuno, N.; Kanamaru, Y.; Yabe, T. Water-soluble extracts from defatted sesame seed flour show antioxidant activity *in vitro*. **Food Chemistry**, v. 175, p. 306-314, 2015.
- Palafox-Carlos, H.; Ayala-Zavala, J. F.; González-Aguilar, G. A. The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. R6-R15, 2011.
- Panche, A. N.; Diwan, A. D.; Chandra, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, e47, 2016.
- Parada, J.; Aguilera, J. M. Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. R21-R32, 2007.
- Paško, P.; Bartoń, H.; Zagrodzki, P.; Gorinstein, S.; Fołta, M.; Zachwieja, Z. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 994-998, 2009.

- Passannanti, S.; Paternostro, M.; Piozzi, F. Triterpene acids from *Salvia* and *Teucrium* species. **Phytochemistry**, v. 22, n. 4, p. 1044-1045, 1983.
- Pastor, K.; Ačanski, M.; Vujić, D.; Bekavac, G.; Milovac, S.; Kravić, S. Rapid method for small grain and corn flour authentication using GC/EI-MS and multivariate analysis. **Food Analytical Methods**, v. 9, p. 443-450, 2016.
- Paucar-Menacho, M.; Dueñas, M.; Peñas, E.; Frias, J.; Martínez-Villaluenga, C. Effect of dry heat puffing on nutritional composition, fatty acid, amino acid and phenolic profiles of pseudocereals grains. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 68, n. 4, p. 289-297, 2018.
- Peiretti, P. G.; Meineri, G.; Gai, F.; Longato, E.; Amarowicz, R. Antioxidative activity and phenolic compounds of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seeds and amaranth (*Amaranthus caudatus*) grain extracts. **Natural Product Research**, v. 31, p. 2178-2182, 2017.
- Pellegrini, M.; Lucas-Gonzalez, R.; Fernández-López, J.; Ricci, A.; Pérez-Alvarez, J. A.; Sterzo, C. L.; Viuda-Martos, M. Bioaccessibility of polyphenolic compounds of six quinoa seeds during *in vitro* gastrointestinal digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 77-88, 2017.
- Pellegrini, M.; Lucas-Gonzalez, R.; Sayas-Barberá, E.; Fernández-López, J.; Pérez-Álvarez, J. A.; Viuda-Martos, M. Bioaccessibility of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 73, n. 1, p. 47-53, 2018.
- Petry, N.; Egli, I.; Zeder, C.; Walczyk, T.; Hurrell, R. Polyphenols and phytic acid contribute to the low iron bioavailability from common beans in young women. **Journal of Nutrition**, v. 140, n. 11, p. 1977-1982, 2010.
- Pizarro, P. L.; Almeida, E. L.; Sammán, N. C.; Chang, Y. K. Evaluation of Whole Chia (*Salvia hispanica* L.) Flour and Hydrogenated Vegetable Fat in Pound Cake. **Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 73-79, 2013.
- Pokorny, J. Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants?. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, n. 6, p. 629-642, 2007.
- Pyrzynska, K.; Sentkowska, A. Recent Developments in the HPLC Separation of Phenolic Food Compounds. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 45, p. 41-51, 2015.
- Pytlakowska, K.; Kozik, V.; Dabioch, M. Complex-forming organic ligands in cloud-point extraction of metal ions: A review. **Talanta**, v. 110, p. 202-228, 2013.
- Rahman, M. J.; Camargo, A. C.; Shahidi, F. Phenolic and polyphenolic profiles of chia seeds and their *in vitro* biological activities. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 622-634, 2017.

- Ramalho, V. C.; Jorge, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.
- Reyes-Caudillo, E.; Tecante, A.; Valdivia-López, M. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. **Food Chemistry**, v. 107, p. 656-663, 2008.
- Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- Ribas-Agustí, A.; Martín-Belloso, O.; Soliva-Fortuny, R.; Elez-Martínez, P. Food processing strategies to enhance phenolic compounds bioaccessibility and bioavailability in plant-based foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 15, p. 2531-2548, 2017.
- Ribeiro, D. A.; Macêdo, D. G.; Boligon, A. A.; Menezes, I. R. A.; Souza, M. M. A.; Costa, J. G. M. Influence of seasonality on the phenolic composition of *Secondatia floribunda* A.DC (Apocynaceae) during its phenological cycle. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 41, 185, 2019.
- Ribeiro, D. A.; Camilo, C. J.; Nonato, C. F. A.; Rodrigues, F. F. G.; Menezes, I. R. A.; Ribeiro-Filho, J.; Xiao, J.; Souza, M. M. A.; Costa, J. G. M. Influence of seasonal variation on phenolic content and in vitro antioxidant activity of *Secondatia floribunda* A. DC. (Apocynaceae). **Food Chemistry**, v. 315, 126277, 2020.
- Riedl, J.; Esslinger, S.; Fauhl-Hassek, C. Review of validation and reporting of non-targeted fingerprinting approaches for food authentication. **Analytica Chimica Acta**, v. 885, p. 17-32, 2015.
- Robbins, R. J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2866-2887, 2003.
- Rocchetti, G.; Chiodelli, G.; Giuberti, G.; Masoero, F.; Trevisan, M.; Lucini, L. Evaluation of phenolic profile and antioxidant capacity in gluten-free flours. **Food Chemistry**, v. 228, p. 367-373, 2017a.
- Rocchetti, G.; Lucini, L.; Chiodelli, G.; Giuberti, G.; Gallo, A.; Masoero, F.; Trevisan, M. Phenolic profile and fermentation patterns of different commercial gluten-free pasta during *in vitro* large intestine fermentation. **Food Research International**, v. 97, p. 78-86, 2017.
- Rodrigues, S.; Pinto, G. A. S. Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n. 3, p. 869-872, 2007.
- Rodríguez, S. D.; Rolandelli, G.; Buera, M. P. Detection of quinoa flour adulteration by means of FT-MIR spectroscopy combined with chemometric methods. **Food Chemistry**, v. 274, p. 392-401, 2019.

Rodríguez-Roque, M. J.; Rojas-Graü, M. A.; Elez-Martínez, P.; Martín-Belloso, O. Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 206-212, 2013.

Roggo, Y.; Chalus, P.; Maurer, L.; Lema-Martinez, C.; Edmond, A.; Jent, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 683-700, 2007.

Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Morais, S. M.; Sampaio, C. G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). **Comunicado Técnico Online Embrapa**, n. 125, 2006.

Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Morais, S. M.; Sampaio, C. G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado Técnico Online Embrapa**, n. 127, 2007a.

Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Morais, S. M.; Sampaio, C. G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS•+. **Comunicado Técnico Online Embrapa**, n. 128, 2007b.

Ruslan, K.; Happyriani, S.; Fidrianny, I. Antioxidant potential of two varieties of *Sesamum indicum* L. collected from Indonesia. **Journal of Taibah University Medical Sciences**, v. 13, n. 3, p. 211-218, 2018.

Saad-Allah, K. M.; Youssef, M. S. Phytochemical and genetic characterization of five quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) genotypes introduced to Egypt. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, p. 617-629, 2018.

Samaranayaka, A. G. P.; Li-Chan, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: a review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 4, p. 229-254, 2011.

Sánchez-Moreno, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Revista de Agroquímica Y Tecnología de Alimentos**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.

Santin, L. G.; Gargano, R.; Oliveira, S. S. A evolução do interesse científico pelo chocolate e pela teobromina: um estudo cienciométrico. **Revista Processos Químicos**, v. 9, n. 17, p. 9-21, 2015.

Santos, Perla M.; Batista, Danilo L. J.; Ribeiro, Luiz A. F.; Boffo, Elisângela F.; de Cerqueira, M. D.; Martins, D.; de Castro, R. D.; de Souza-Neta, L. C.; Pinto, E.; Zambotti-Villela, L.; Colepicolo, P.; Fernandez, L. G.; Canuto, G. A. B.; Ribeiro, P. R. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds from the oilseed crop

Ricinus communis using a multiplatform metabolite profiling approach. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 834-844, 2018.

Santos, W. N. L.; Sauthier, M. C. S.; Santos, A. M. P.; Santana, D. A.; Azevedo, R. S. A.; Caldas, J. C. Simultaneous determination of 13 phenolic bioactive compounds in guava (*Psidium guajava* L.) by HPLC-PAD with evaluation using PCA and Neural Network Analysis (NNA). **Microchemical Journal**, v. 133, p. 583-592, 2017.

Sardarodiyani, M.; Sani, A. M. Natural antioxidants: sources, extraction and application in food systems. **Nutrition & Food Science**, v. 46, n. 3, p. 363-373, 2016.

Sartor, T.; Xavier, V. B.; Falcão, M. A.; Mondin, C. A.; Santos, M. A.; Cassel, E.; Astarita, L. V.; Santarém, E. R. Seasonal changes in phenolic compounds and in the biological activities of *Baccharis dentate* (Vell.) GM Barroso. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 355-359, 2013.

Saura-Calixto, F.; Serrano, J.; Goni, 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.; Valese, A. C.; Daguer, H.; Bergamo, G.; Azevedo, M. S.; Nehring, P.; Gonzaga, L. V.; Fett, R.; Costa, A. C. O. Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds, minerals, and antioxidant capacity of *Mimosa scabrella* Benth honeydew honeys. **Food Research International**, v. 99, p. 670-678, 2017.

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.

Shahidi, F.; Liyana-Pathirana, C. M.; Wall, D. S. Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions. **Food Chemistry**, v. 99, p. 473-483, 2006.

Silva, B. P.; Anunciação, P. C.; Matyelka, J. C. S.; Lucia, C. M. D.; Martino, H. S. D.; Pinheiro-Sant'Ana, H. M. Chemical composition of Brazilian chia seeds grown in different places. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1709-1716, 2017b.

Silva, L. A. A.; Freitas, F. V.; Vieira, T. S.; Barbosa, W. M.; Silva, E. M. M. Utilização de ingredientes sucedâneos ao trigo na elaboração de bolos sem glúten. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 76, e1724, 2017a.

Singh, A.; Punia, D. Characterization and nutritive values of amaranth seeds. **Current Journal of Applied Science and Technology**, v. 39, n. 3, p. 27-33, 2020.

Smeds, A. I.; Eklund, P. C.; Sjöholm, R. E.; Willfor, S. M.; Nishibe, S.; Deyama, T.; Holmbom, B. R. Quantification of a broad spectrum of lignans in cereals, oilseeds

and nuts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 1337-1346, 2007.

Soares, S.; Brandão, E.; Mateus, N.; De Freitas, V. Interaction between red wine procyanidins and salivary proteins: effect of stomach digestion on the resulting complexes. **RSC Advances**, v. 5, p. 12664-12670, 2015.

Sohaimy, S. A.; Mohamed, S. E.; Shehata, M. G.; Mehany, T.; Zaitoun, M. A. Compositional analysis and functional characteristics of quinoa flour. **Annual Research & Review in Biology**, v. 22, n. 1, p. 1-11, 2018.

Sousa, C. M. M.; Silva, H. R.; Vieira-Jr., G. M.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S.; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Brandão, M. S.; Chaves, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

Srinivasan, S.; Muthukumaran, J.; Muruganathan, U.; Venkatesan, R. S.; Jalaludeen, A. M. Antihyperglycemic effect of syringic acid on attenuating the key enzymes of carbohydrate metabolism in experimental diabetic rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 4, n. 4, p. 595-602, 2014.

Srinivasulu, C.; Ramgopal, M.; Ramanjaneyulu, G.; Anuradha, C. M.; Suresh Kumar, C. Syringic acid (SA) – A Review of Its Occurrence, Biosynthesis, Pharmacological and Industrial Importance. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 547-557, 2018.

Stamatopoulos, K.; Katsoyannos, E.; Chatzilazarou, A. Antioxidant Activity and Thermal Stability of Oleuropein and Related Phenolic Compounds of Olive Leaf Extract after Separation and Concentration by Salting-Out-Assisted Cloud Point Extraction. **Antioxidants**, v. 3, p. 229-244, 2014.

Su, W. H.; Sun, D. W. Evaluation of spectral imaging for inspection of adulterants in terms of common wheat flour, cassava flour and corn flour in organic Avatar wheat (*Triticum* spp.) flour. **Journal of Food Engineering**, v. 200, p. 59-69, 2017.

Sugiharto, S.; Yudiarti, T.; Isroli, I. Assay of Antioxidant Potential of Two Filamentous Fungi Isolated from the Indonesian Fermented Dried Cassava. **Antioxidants**, v. 5, n. 6, 2016.

Sujka, K.; Koczoń, P.; Ceglińska, A.; Reder, M.; Ciemniowska-Żytkiewicz, H. The Application of FT-IR spectroscopy for quality control of flours obtained from polish producers. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 3, p. 1-9, 2017.

Sun, L.; Zhang, J.; Lu, X.; Zhang, L.; Zhang, Y. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 10, p. 2689-2696, 2011.

Suzuki, H.; Sawada, S.; Watanabe, K.; Nagae, S.; Yamaguchi, M.; Nakayama, T.; Nishino, T. Identification and characterization of a novel anthocyanin malonyltransferase from scarlet sage (*Salvia splendens*) flowers: an enzyme that

is phylogenetically separated from other anthocyanin acyltransferases. **The Plant Journal**, v. 38, p. 994-1003, 2004.

Tan, Z.; Wang, C.; Yang, Z.; Yi, Y.; Wang, H.; Zhou, W.; Li, F. Ionic Liquid-Based Ultrasonic-Assisted Extraction of Secoisolariciresinol Diglucoside from Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) with Further Purification by an Aqueous Two-Phase System. **Molecules**, v. 20, p. 17929-17943, 2015.

Tang, Y.; Li, X.; Zhang, B.; Chen, P. X.; Liu, R.; Tsao, R. Characterisation of phenolics, betanins and antioxidant activities in seeds of three *Chenopodium quinoa* Willd. Genotypes. **Food Chemistry**, v. 166, p. 380-388, 2015.

Tang, Y.; Tsao, R. Phytochemicals in quinoa and amaranth grains and their antioxidant, anti-inflammatory, and potential health beneficial effects: a review. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 61, n. 7, 1600767, 2017.

Tavarini, S.; Castagna, A.; Conte, G.; Foschi, L.; Sanmartin, C.; Incrocci, L.; Ranieri, A.; Serra, A.; Angelini, L. G. Evaluation of chemical composition of two linseed varieties as sources of health-beneficial substances. **Molecules**, v. 24, n. 20, 3729, 2019.

Thompson, L. U. Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. **Food Research International**, v. 26, n. 2, p. 131-149, 1993.

Valenzuela-González; M.; Rouzaud-Sández, O.; Ledesma-Osuna, A. I.; Astiazarán-García, H.; Salazar-López, N. J.; Vidal-Quintanar, R. L.; Robles-Sánchez, M. Bioaccessibility of phenolic compounds, antioxidant activity, and consumer acceptability of heat-treated quinoa cookies. **Food Science and Technology**, v. 42, e43421, 2022.

Veitch, N. C.; Grayer, R. J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1626-1695, 2011.

Vélez-Jiménez, E.; Tenbergen, K.; Santiago, P. D.; Cardador-Martínez, M. A. Functional Attributes of Amaranth. **Austin Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 2, n. 1, id1010, 2014.

Venskutonis, P. R.; Kraujalis, P. Nutritional Components of Amaranth Seeds and Vegetables: A Review on Composition, Properties, and Uses. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 4, p. 381-412, 2013.

Venugopala, K. N.; Rashmi, V.; Odhav, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **BioMed Research International**, v. 2013, 963248, 2013.

Verdú, S.; Vásquez, F.; Grau, R.; Ivorra, E.; Sánchez, A. J.; Barat, J. M. Detection of adulterations with different grains in wheat products based on the hyperspectral image technique: The specific cases of flour and bread. **Food Control**, v. 62, p. 373-380, 2016.

- Verza, S. G.; Silveira, F.; Cibulski, S.; Kaiser, S.; Ferreira, F.; Gosmann, G.; Roehe, P. M.; Ortega, G. G. Immunoadjuvant activity, toxicity assays, and determination by UPLC/Q-TOF-MS of triterpenic saponins from *Chenopodium quinoa* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 12, p. 3113-3118, 2012.
- Vishwanath, H. S.; Anilakumar, K. R.; Harsha, S. N.; Khanum, F.; Bawa, A. S. *In vitro* antioxidant activity of *Sesamum indicum* seeds. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 5, p. 56-60, 2012.
- Wagner, H.; Blatt, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer Verlag., 1996.
- Walton, N. J.; Mayer, M. J.; Narbad, A. Vanillin. **Phytochemistry**, v. 63, n. 5, p.505-515, 2003.
- Wang, N.; Hatcher, D.W.; Tyler, R.T.; Toews, R.; Gawalko, E.J. Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 589-594, 2010.
- Waszkowiak, K.; Gliszczyńska-Świgło, A.; Barthet, V.; Skręty, J. Effect of extraction method on the phenolic and cyanogenic glucoside profile of flaxseed extracts and their antioxidant capacity. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 92, n. 11-12, p. 1609-1619, 2015.
- Willfahrt, A.; Steiner, E.; Jonas Hötzel, J.; Crispin, X. Printable acid-modified corn starch as non-toxic, disposable hydrogel-polymer electrolyte in supercapacitors. **Applied Physics A**, v. 125, 474, 2019.
- Wimberley, J.; Cahill, J.; Atamian, H. S. Sequencing and analysis of *Salvia hispanica* tissue-specific transcriptome and identification of genes involved in terpenoid biosynthesis. **Plants**, v. 9, 405, 2020.
- Xu, J.; Chen, S.; Hu, Q. Antioxidant activity of brown pigment and extracts from black sesame seed (*Sesamum indicum* L.). **Food Chemistry**, v. 91, p. 79-83, 2005.
- Yang, B., Jiang, Y. M., Shi, J., Chen, F.; Ashraf, M. Extraction and pharmacological properties of bioactive compounds from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit – a review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1837-1842, 2011.
- Yilmaz, S. Effects of dietary caffeic acid supplement on antioxidant, immunological and liver gene expression responses, and resistance of *Nile tilapia*, *Oreochromis niloticus* to *Aeromonas veronii*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 86, p. 384-392, 2019.
- Yilmaz, S.; Sova, M.; Ergun, S. Antimicrobial activity of trans-cinnamic acid and commonly used antibiotics against important fish pathogens and nonpathogenic isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 6, p. 1714-1727, 2018.

Zehring, J.; Reim, V.; Schröter, D.; Neugart, S.; Schreiner, M.; Rohn, S.; Maul, R. Identification of novel saponins in vegetable amaranth and characterization of their hemolytic activity. **Food research international**, v. 78, p.361-368, 2015.

Zeng, Z.; Liu, C.; Luo, S.; Chen, J.; Gong, E. The Profile and Bioaccessibility of Phenolic Compounds in Cereals Influenced by Improved Extrusion Cooking Treatment. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, 2016.

Zhao, J.; Xia, H.; Yu, T.; Jin, L.; Li, X.; Zhang, Y.; Shu, L.; Zeng, L.; He, Z. A colorimetric assay for vanillin detection by determination of the luminescence of o-toluidine condensates. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, e0194010, 2018.

Zhou, L.; Lin, X.; Abbasi, A. M.; Zheng, B. Phytochemical contents and antioxidant and antiproliferative activities of selected black and white sesame seeds. **BioMed Research International**, v. 2016, 8495630, 2016.

Zhu, L.; Gu, P.; Shen, H. Gallic acid improved inflammation via NF- κ B pathway in TNBS-induced ulcerative colitis. **International Immunopharmacology**, v. 67, p. 129-137, 2019.

Zielinski, A. A. F.; Haminiuk, C. W. I.; Alberti, A.; Nogueira, A.; Demiate, I. M.; Granato, D. A comparative study of the phenolic compounds and the *in vitro* antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**, v. 60, p. 246-254, 2014.