



Caracterização de plantas alimentares não convencionais *Guizotia abyssinica* (L.f.) Cass., *Panicum miliaceum* L. e *Phalaris canariensis* L. para aplicação na indústria da panificação

Juliana França Lima

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança
Alimentar no âmbito da dupla diplomação com a Universidade
Tecnológica Federal do Paraná*

Orientadores

Doutora Lillian Bouçada de Barros
Doutora Maria Inês Moreira Figueiredo Dias
Prof. Doutora Nádia Cristiane Steinmacher

Bragança

2020



Juliana França Lima

Caracterização de plantas alimentares não convencionais *Guizotia abyssinica* (L.f.) Cass., *Panicum miliaceum* L. e *Phalaris canariensis* L. para aplicação na indústria da panificação

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no âmbito da dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Orientadores

Doutora Lillian Bouçada de Barros

Doutora Maria Inês Moreira Figueiredo Dias

Prof. Doutora Nádia Cristiane Steinmacher

Bragança

2020

Este trabalho foi financiado pelo programa FEDER-Interreg España-Portugal através do projeto 0377_Iberphenol_6_E e TRANSCoLAB 0612_TRANS_CO_LAB_2_P.



AGRADECIMENTOS

¹Durante esses meses de estudos reconheço que devo os agradecimentos a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para que eu alcançasse os meus objetivos. Portanto, primeiramente agradeço a Deus por ter me dado saúde, forças e ter me cuidado todos os dias.

Tudo o que conquistei não seria possível sem a ajuda incansável da minha família. Sou grata aos meus pais, Alaíde França e Julio de França, por sonharem comigo, me amarem e sempre me apoiarem, obrigada por toda a ajuda que me deram, onde mesmo em meio a tantas dificuldades, sempre fizeram o melhor para me proporcionar tudo de essencial para essa conquista. Agradeço aos meus irmãos, Laís e Messias, que sempre me apoiaram e torceram por mim durante essa caminhada, obrigada Laís por ter me ajudado nos meses de mais dificuldade, vocês foram essenciais para o meu sucesso. Agradeço também a minha avó Adelaide, por todas as orações feitas por mim, que sempre dizia que Deus estava cuidando de mim, e realmente eu fui completamente abençoada. Muito obrigada à toda minha família, serei eternamente grata.

Agradeço aos meus amigos que participaram total ou parcialmente desse processo junto a mim, com o companheirismo e palavras reconfortantes em dias duvidosos. Em especial ao meu melhor amigo e namorado Nicolas, pela sua paciência, conselhos e carinho, o seu companheirismo me inspirou e me deu forças para nunca desistir.

Sou grata a toda equipe do Centro de Investigação da Montanha (CIMO), principalmente as Doutoradas Lillian Barros e Maria Inês Dias, mulheres excepcionais a qual tive a oportunidade de ser orientada. Me ajudaram e estiveram ao meu lado durante a realização desse trabalho, me sinto privilegiada e as levarei sempre comigo com todo carinho.

Agradeço também a Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), a todos os professores e à coorientadora deste trabalho Doutora Nádia Steinmacher, pelo suporte e ensinamentos durante minha vida acadêmica, profissional e pessoal. A todos, minha eterna gratidão.

Obrigada!

¹ Texto escrito em Português do Brasil.

RESUMO

Os consumidores têm dado preferência a alimentos que para além das propriedades nutricionais, também apresentem características bioativas com efeitos benéficos para a sua saúde. A utilização de plantas alimentares não convencionais (PANC) tem representado uma mais valia para a indústria do setor alimentar, não só devido à sua abundância, mas também por não competir com outras matrizes vegetais usadas para a alimentação humana, e pelas suas propriedades nutricionais, químicas e bioativas. Considerando o aumento crescente por esta procura por parte do consumidor, é premente o estudo de novas fontes alimentares, assim como o estudo da sua aplicação para o desenvolvimento de novos produtos de alto valor acrescentado. O presente trabalho teve como objetivo o estudo de três sementes de plantas alimentares não convencionais, nomeadamente *Guizotia abyssinica* (L.f.) Cass., *Panicum miliaceum* L. e *Phalaris canariensis* L., conhecidas comumente como níger, painço e alpiste, respetivamente, iniciando pelo estudo da sua granulometria e índice de absorção de água. Propôs-se também a caracterização do seu valor nutricional por métodos AOAC, determinação, por métodos cromatográficos, dos teores em açúcares livres (HPLC-RI), ácidos gordos (GC-FID), ácidos orgânicos (UPLC-DAD), tocoferóis (HPLC-fluorescência) e compostos fenólicos (HPLC-DAD/ESI(MS) e, o estudo do seu potencial antioxidante, hepatotóxico e antimicrobiana. Finalmente, foram desenvolvidos produtos de panificação com substituição parcial de 20% da farinha de trigo, pelas farinhas elaboradas a partir das sementes. Um delineamento estatístico experimental pelo método simplex centroide foi aplicado para perceber o efeito da aplicação das farinhas de PANC nas características físico-químicas finais dos pães obtidos. As três sementes em estudo apresentaram elevada granulometria, associada a elevados índices de absorção de água, que no caso do alpiste e painço indica que o seu uso teria de ser complementado com outras farinhas para aplicação em produtos de panificação. Todas as sementes revelaram baixos valores de humidade, e de cinzas, mas no que respeita ao valor nutricional e químico, foi a semente de níger a que mais se destacou apresentando um maior conteúdo em gordura total, PUFA (ácido linoleico), açúcares, tocoferóis (α -tocoferol) e compostos fenólicos (derivados do ácido caféico). Todas as sementes apresentaram valores de IC₅₀ e CMI relativamente baixos para a inibição da peroxidação lipídica e também para atividade antimicrobiana, respetivamente. De ressaltar que os resultados obtidos para a atividade antifúngica nos extratos hidroetanólicos de níger e painço foram menores quando comparados com os

controles positivos utilizados (E211 e E224). As três amostras não apresentaram hepatotoxicidade, aferindo a sua segurança e potencialidade para serem introduzidas em novas matrizes. Pães elaborados com substituição parcial de 20% de farinha de trigo por farinha de painço e alpiste, foram os que apresentaram maior semelhança ao pão controle (100% farinha de trigo), relativamente à textura, volume específico e cor. Os pães com substituição parcial por farinha de níger foram os que tiveram maior diferença em relação ao controle, sobretudo no parâmetro L^* (luminosidade). Este estudo permitiu apresentar resultados inovadores em relação à caracterização nutricional, química e às propriedades bioativas de sementes poucos estudadas e consumidas, mas com grande potencial para serem aplicadas na indústria alimentar. Considerando a sua composição em compostos bioativos, o uso destas sementes é de todo aconselhável no âmbito de uma dieta fortificada, sendo fontes de compostos de alto valor nutricional e com efeitos benéficos para a saúde do consumidor.

Palavras-chave: Plantas alimentares não convencionais (PANC), valor nutricional, caracterização química, propriedades bioativas, produtos de panificação, delineamento experimental.

ABSTRACT

Consumers have given preference to food products that, in addition to the nutritional properties, also present bioactive characteristics with beneficial effects on their health. The use of unconventional food plants (PANC) has been an asset for the food industry, not only due to its abundance, but also because it does not compete with other vegetable matrices used for human consumption, and for its nutritional properties, chemical and bioactive potentiality. Considering the growing increase in this demand by the consumer, the study of new food sources is urgent, as well as the study of its application for the development of new products with high added value. The present work aimed to study three seeds of unconventional food plants, namely *Guizotia abyssinica* (Lf) Cass., *Panicum miliaceum* L. and *Phalaris canariensis* L., commonly known as niger, millet and birdseed, respectively, starting with the study of its granulometry and water absorption index. It was also proposed to characterize its nutritional value by AOAC methods, determination, by chromatographic methods, of the levels of free sugars (HPLC-RI), fatty acids (GC-FID), organic acids (UPLC-DAD), tocopherols (HPLC - fluorescence) and phenolic compounds (HPLC-DAD / ESI (MS) and, the study of their antioxidant, hepatotoxic and antimicrobial potential. Finally, bakery products were developed with partial replacement of the wheat flour (20% of the PANC's flour). An experimental statistical design using the centroid simplex method was applied to understand the effect of applying PANC flours on the final physical-chemical characteristics of the breads obtained. The three seeds under study showed high granulometry, associated with high water absorption index, which in the case of birdseed and niger indicates that their use would have to be complemented with other flours for application in bakery products. All seeds showed low values of humidity and ash, but with regard to nutritional and chemical value, it was the niger seed that stood out the most, with a higher content of total fat, PUFA (linoleic acid), sugars, tocopherols (α -tocopherol) and phenolic compounds (derivatives of caffeic acid). All seeds showed relatively low IC_{50} and MIC values for inhibition of lipid peroxidation and for antimicrobial activity, respectively. It should be noted that the results obtained for antifungal activity in the hydroethanolic extracts of niger and millet were lower when compared with the positive controls used (E211 and E224). The three samples did not show hepatotoxicity, assessing their safety and potentiality to be introduced into new food matrices. Breads made with

partial replacement of 20% wheat flour by millet and birdseed flour, were the ones that showed the greatest similarity to control bread (100% wheat flour), in terms of texture, specific volume and color. Breads with partial replacement for niger flour were the ones that had the greatest difference in relation to the control, especially in parameter L^* (luminosity). This study allowed to present innovative results in relation to the nutritional, chemical and bioactive properties of seeds that have been little studied and consumed, but with great potential to be applied in the food industry. Considering their composition in bioactive compounds, the use of these seeds is highly advisable in the context of a fortified diet, being sources of compounds of high nutritional value and with beneficial effects for the health of the consumer.

Keywords: Non-conventional food plants (PANC), nutritional value, chemical characterization, bioactive properties, bakery products, experimental design.

ÍNDICE GERAL

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
ÍNDICE GERAL	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xvi
ÍNDICE DE TABELAS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xviii
1. Introdução	2
2. Revisão bibliográfica	3
2.1. Plantas alimentares não convencionais	3
2.2. Sementes de Alpiste (<i>Phalaris canariensis</i> L.)	5
2.2.1. Composição nutricional e química do Alpiste.....	7
2.3. Sementes de Níger (<i>Guizotia abyssinica</i> (L.f.) Cass.).....	8
2.3.1. Composição nutricional e química do níger	9
2.4. Sementes de Painço (<i>Panicum miliaceum</i> L.).....	9
2.4.1. Composição nutricional e química do Painço	10
2.5. Compostos e propriedades bioativas das sementes em estudo	11
2.5.1. Ácidos gordos	11
2.5.2. Compostos fenólicos	11
2.5.3. Propriedades antioxidantes	12
2.5.4. Potencial citotóxico	14
2.5.5. Potencial antimicrobiano	14
2.6. Produtos de panificação	15
2.6.1. Importância de aplicação de PANC na indústria de panificação.....	15
3. Objetivos.....	17
4. Material e métodos	20

4.1.	Padrões e Reagentes.....	20
4.2.	Preparação das farinhas e avaliação de parâmetros físicos.....	20
4.2.1.	Análise granulométrica.....	21
4.2.2.	Índice de absorção de água.....	22
4.3.	Determinação do valor nutricional e composição química das farinhas.....	22
4.3.1.	Análise do valor nutricional	22
4.3.2.	Açúcares livres	23
4.3.3.	Ácidos orgânicos	24
4.3.4.	Ácidos gordos	25
4.3.5.	Tocoferóis.....	26
4.4.	Avaliação do potencial bioativo e perfil em compostos fenólicos	27
4.4.1.	Preparação dos extratos hidroetanólicos	27
4.4.2.	Avaliação da atividade antioxidante.....	27
4.4.3.	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	30
4.4.4.	Avaliação da atividade hepatotóxica	32
4.4.5.	Determinação do perfil em compostos fenólicos	32
4.5.	Aplicação das farinhas de PANC em produtos de panificação	33
4.5.1.	Delineamento de misturas	34
4.5.2.	Características físicas dos pães.....	35
4.6.	Análise estatística	36
5.	Resultados e Discussão	38
5.1.	Análise Granulométrica e índice de absorção de água das farinhas de PANC	38
5.2.	Perfil nutricional de farinhas de sementes de níger, painço e alpiste	40
5.3.	Perfil em açúcares, ácidos orgânicos, ácidos gordos e tocoferóis	41
5.4.	Avaliação das propriedades bioativas.....	46
5.4.1.	Atividade antioxidante.....	46
5.4.2.	Atividade antimicrobiana	48

5.4.3.	Hepatotoxicidade	51
5.4.4.	Determinação do perfil fenólico	51
5.5.	Aplicação em pães	53
5.5.1.	Parâmetros de cor L*, a* e b*, firmeza e volume específicos dos pães...	55
6.	Conclusões e perspectivas futuras	61
7.	Referências	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de espécies de PANC.	3
Figura 2. Fitoalexinas da fenilamida no trigo (Ube et al., 2019).....	5
Figura 3. Parte aérea (A) e grãos/sementes (B) de <i>Phalaris canariensis</i> L.	6
Figura 4. Parte aérea (A) e grãos/sementes (B) de <i>Guizotia abyssinica</i> (L.f.) Cass.	9
Figura 5. Parte aérea (A) e grãos/sementes (B) <i>Panicum miliaceum</i> L.....	10
Figura 6. Diferentes classes de compostos fenólicos.	12
Figura 7. Factores que promovem a produção de radicais livres (Leiner, 2014).	13
Figura 8. Representação esquemática do plano de trabalhos desenvolvidos.	18
Figura 9. Sementes de <i>G. abyssinica</i> (A1), <i>P. miliaceum</i> (B1) e <i>P. canariensis</i> (C1), e respectivas farinhas (A2, B2 e C2, respetivamente).	21
Figura 10. Método simplex centroide {3,2} para delineamento de misturas.	35
Figura 11. Esquema dos ingredientes usados para a preparação dos pães, contendo diferentes percentagens de farinha de trigo e farinhas de sementes de alpiste, níger e painço e imagens dos produtos finais após cozedura.	54
Figura 12. Superfície ajustada de volume específico do pão (A), firmeza (B) e parâmetros de cor para L^* (C), a^* (D) e b^* (E) do miolo de pães com diferentes proporções de farinhas de sementes de níger, painço e alpiste. Área experimental definida por pontos e expressa em componentes.	59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Composição de micronutrientes de alpiste, trigo e aveia (mg/100 g).....	7
Tabela 2. Formulação para preparo do pão controle e pães com farinha de PANC.....	34
Tabela 3. Composições de PANC nas farinhas obtidas através do planejamento em simplex centroide aumentado.	35
Tabela 4. Granulometria e índice de absorção de água (IAA) das farinhas de PANC..	38
Tabela 5. Valor nutricional das sementes de níger, painço e alpiste (MD ± DP).....	40
Tabela 6. Composição de açúcares livres e ácidos orgânicos das sementes das sementes de níger, painço e alpiste (MD ± DP).	42
Tabela 7. Composição em ácidos gordos e tocoferóis das sementes de níger, painço e alpiste (MD ± DP).	44
Tabela 8. Atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos das das sementes de níger, painço e alpiste (MD ± DP).....	47
Tabela 9. Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos hidroetanólicos das sementes de níger, painço e alpiste (mg/mL).	50
Tabela 10. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível (λ_{max}), dados de espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação (mg/g extrato) de compostos fenólicos dos extratos hidroetanólicos das sementes de níger e alpiste (MD ± DP).....	52
Tabela 11. Valores médios da firmeza do miolo (g), volume específico (cm ³ /g) e parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) para pães com diferentes proporções de farinhas de sementes de níger, painço e alpiste (MD ± DP).	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH	2,2'-azobis (2-amidinopropano)
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análise de variância
AOAC	Associação Oficial de Químicos Analíticos
ATP	Adenosina trifosfato
BHT	Butil-hidroxitolueno
cm	Centímetros
CMB	Concentração mínima bactericida
CMF	Concentração mínima fungicida
CMI	Concentração mínima inibitória
DAD	Detetor de diodos
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
ESI	Ionização por electropulverização
FAME	Éster metílico de ácidos gordos
FeSO₄	Sulfato de ferro
FID	Detetor de ionização de chama
GC	Cromatografia gasosa
GI₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
GS	Sensibilidade ao glúten
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HBSS	Solução salina balanceada de Hank
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IAA	Índice de absorção de água
IC₅₀	Concentração responsável por 50% da atividade
INT	Cloreto de <i>p</i> -iodonitrotetrazólico
ISA	Índice de solubilidade de água
kcal	Quilocaloria
LOD	Limite de detecção

LOQ	Limite de quantificação
m/v	Razão massa/volume
m/z	Razão massa/carga
MA	Malte ágar
MD	Média
MDA	Malondialdeído
MS	Espetrometria de Massa
MS²	Dupla espectrometria de massa
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCGS	Sensibilidade não celíaca ao glúten
nd	Não detetado
NED	Hidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina
nq	Não quantificado
°C	Graus Celsius
OxHLIA	Ensaio da inibição da hemólise oxidativa
PANC	Plantas alimentares não convencionais
PBS	Tampão fosfato-salino
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
R²	Coefficiente de correlação
RI	<i>Refraction Index</i> (Índice de refração)
ROS	Espécies reativas de oxigénio
rpm	Rotações por minuto
SFA	Ácidos gordos saturados
SG	Sensibilidade ao Glúten
SRB	Sulforrodamina B
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
Tr	Tempo de retenção
Tris	Trisaminometano
Tris-HCl	Trisaminometano-ácido clorídrico

Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
TSB	Caldo Soja Trypticaseína
UFLC	Cromatografia líquida ultra-rápida
UV	Radiação ultravioleta
UV/VIS	Radiação ultravioleta-visível
v/v	Razão volume/volume
vg	Vestígios
Δt	Variação de tempo
λ_{\max}	Comprimento de onda de absorção máxima

INTRODUÇÃO



1. Introdução

Produtos alimentares de origem vegetal ou à base de plantas são dos mais consumidos em todo o mundo, havendo uma tendência cada vez maior por parte dos consumidores para a escolha destes tipos de produtos. Os grãos e sementes de plantas representam um nicho, de entre os produtos de origem vegetal, que também têm vindo a ser cada vez mais consumidos, na sua forma natural ou processada, devido sobretudo ao seu conteúdo proteico e lipídico. Para além das escolhas cada vez mais conscientes por produtos com elevado valor nutricional, os consumidores procuram também aqueles que lhes conferem um efeito benéfico para a saúde e que, por isso, apresentam uma atividade biológica associada. O desenvolvimento e/ou melhoramento de produtos alimentares que colmatem deficiências nutricionais e que possuam efeitos benéficos para a saúde do consumidor, apresenta-se assim como uma área de estudo bastante promissora.

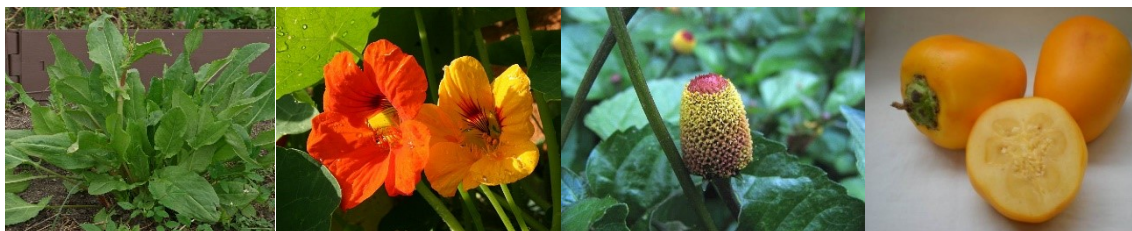
A utilização de plantas alimentares não convencionas (PANC) pode ser uma das respostas para o desenvolvimento de novos produtos alimentares ou para a melhoria de produtos já existentes, como é o caso dos produtos de panificação. O uso destas plantas não só permite aumentar o leque da diversidade de plantas que podem ser consumidas, como também permite reduzir a pressão sobre as espécies de plantas tão abundantemente consumidas hoje em dia, como é o caso do milho, trigo, entre outros. Como o consumo das PANC não está enraizado na cultura alimentar de muitas populações, são necessários estudos rigorosos de caracterização e de, sobretudo, segurança alimentar destas plantas, de forma a poder assegurar uma correta utilização das mesmas.

Neste sentido, o presente estudo pretende caracterizar o perfil nutricional relativamente ao conteúdo lipídico, proteico e hidratos de carbono, assim como o perfil químico em termos de composição em açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, tocoferóis e ácidos gordos de farinhas de três sementes de PANC, *Guizotia abyssinica* (L.f.) Cass., *Panicum miliaceum* L. e *Phalaris canariensis* L. Para além disso, pretende analisar as propriedades bioativas dos extratos hidroetanólicos das sementes, em termos da sua atividade antioxidante e antimicrobiana, e ainda hepatotóxica (avaliando a segurança das mesmas). Por último, produtos de panificação irão ser desenvolvidos com base nas farinhas destas sementes, e avaliada as suas propriedades físicas e de cor.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Plantas alimentares não convencionais

Por definição, plantas que possuam uma ou mais partes ou mesmo subprodutos que podem ser utilizados na alimentação humana são ditas “plantas alimentares”. Há, no entanto, um grupo denominado de “Plantas Alimentares Não Convencionais” (PANC), que não são habitualmente consumidas, mas que, devido às suas propriedades bioativas, nutricionais e baixa toxicidade apresentam potencialidade para serem introduzidas numa dieta regular. Na **Figura 1** estão representadas algumas espécies de plantas denominadas de PANC. As plantas silvestres pertencentes a este grupo são vulgarmente conhecidas como “ervas daninhas”, “mato” ou “planta do mato” (Kinupp & Barros, 2004). A introdução das PANC numa base de dieta regular poderia levar a uma diversificação e melhoria da qualidade nutricional alimentar considerando o nosso sistema agrícola atual, pois um número muito pequeno de plantas está disponível para comercialização e consumo (Leal, 2015).



Rumex acetosa L.
(Polygonaceae)

Tropaeolum majus L.
(Tropaeolaceae)

Acemella oleracea L.
R.K.Jansen (Asteraceae)

Solanum sessiliflorum
Dun. – (Solanaceae)



Eryngium foetidum L.
(Apiaceae)

Xanthosoma spp.
(Araceae)

Bryophyllum pinnatum
Lam. Pers.
(Crassulaceae)

Ipomoea batatas L. Lam.
(Convolvulaceae)

Figura 1. Exemplos de espécies de PANC.

Uma das mais completas lista de PANC foi descrita por Kunkel (1984), onde foram listadas cerca de 12500 espécies consideravelmente boas para consumo, contendo 3100 géneros e aproximadamente 400 famílias de plantas. No entanto, a maior parte das espécies de plantas produzidas para consumo humano provêm de apenas 20 espécies, ignorando toda uma diversidade de opções alimentares existentes (Kinupp, 2007). Muitas espécies de PANC são totalmente desconhecidas, de uso restrito, e distribuição geográfica limitada. No entanto, são plantas com grande resistência a fatores bióticos e abióticos, características de sabor bastante acentuadas e grande versatilidade culinária (Kinupp, 2007).

Mundialmente são produzidas quantidades excedentárias de alimentos, que não são depois reconduzidas para as populações mais necessitadas havendo assim uma má distribuição dos excedentes, resultando em grandes desperdícios e enormes perdas económicas para os produtores. Para além disso, grande parte da população não utiliza ou subutiliza algumas espécies de plantas com grande potencialidade para complementação alimentar. Nos países tropicais e subtropicais há uma grande variedade deste tipo de plantas com grande potencial para ser usado pela indústria alimentar (Kinupp, 2007). Essas plantas, na sua maioria, são fontes de alimentos que não exigem o preparo de solos e desmatamento para atribuição de novas áreas, pois se desenvolvem em ambientes naturais (Bressan et al., 2011). O consumo dessas plantas pode ser uma estratégia no futuro para o consumo racional de alimentos. Se for realizada de forma sustentável, que não é uma dificuldade para essas espécies, podem ser considerados alimentos com baixo impacto ambiental (Kinupp, 2007), visto que a degradação do solo nas áreas agrícolas tem aumentado e conseqüentemente a produtividade diminuído devido ao grande número de destruição de florestas e áreas arborizadas para aumentar a comercialização agrícola de acordo com o crescimento populacional (Wijnhoud, 2007).

Sendo reconhecido a atual necessidade da população com grandes problemas de saúde como obesidade, hipertensão, diabetes ou mesmo câncer, essas plantas podem auxiliar na melhor distribuição de alimentos funcionais e nutracêuticos, que são alimentos ou ingredientes que além da sua composição nutricional, possuem outras substâncias, capazes de interferir em processos metabólicos, auxiliando o desenvolvimento de algumas células do corpo humano, melhorando aspectos de saúde e prevenindo o surgimento extemporâneo de doenças degenerativas. Indiscutivelmente, o consumo apenas desses alimentos não deve ser levado em consideração como solução para

problemas de saúde, mas sim como um complemento que a ciência tem posicionado (Marangoni, 2007). As sementes de níger (*Guizotia abyssinica* (L.f.) Cass.), painço (*Panicum miliaceum* L.) e alpiste (*Phalaris canariensis* L.) são alguns dos exemplos de PANC com grandes potencialidades para serem usadas como ingredientes ou como fontes de compostos bioativos para aplicação na indústria alimentar.

2.2. Sementes de Alpiste (*Phalaris canariensis* L.)

A família das gramíneas (Poaceae), é considerada a quinta maior família de plantas com flores no mundo, possuindo aproximadamente 11500 espécies e 768 gêneros (Soreng et al., 2017). A sua dispersão geográfica é imensa, sendo encontradas em todos os continentes e em todo o tipo de regiões com grandes diferenças térmicas, desde zonas tropicais, a zonas temperadas, mas também em regiões do ártico (Saarela et al., 2018).

De entre os membros da família Poaceae, há alguns como o trigo, arroz e sorgo que produzem substâncias denominadas de fitoalexinas (**Figura 2**) com diversas estruturas químicas, incluindo fenilamidas, flavonóides e terpenóides, que são compostos sintetizados pela planta quando submetida a stress extrínseco, possuindo também reconhecida atividade antimicrobiana (Ejike et al., 2013; Ube et al., 2019).

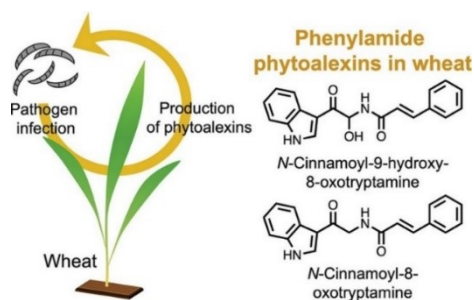


Figura 2. Fitoalexinas da fenilamida no trigo (Ube et al., 2019).

As plantas da família Gramínea são caracterizadas por possuírem caules finos e longos, como o trigo, arroz, milho, sorgo e cevada, e nas quais os seus grãos amiláceos são usados para consumo humano e mesmo para produção de farinhas e farelo (Sarwar et al., 2013). Do ponto de vista económico, é uma das famílias mais importantes para a indústria alimentar, uma vez que inclui das sementes/grãos mais usadas e consumidas a nível mundial, mas também as espécies desta família podem ainda serem usadas para a produção de bambu e biocombustíveis.

O alpiste (*Phalaris canariensis* L., **Figura 3A**) é uma planta da família das gramíneas, de crescimento anual e com uma característica cor de palha, pode crescer até 1 m de altura, e as suas folhas podem atingir até 40 cm de comprimento e 1 cm de largura (Bilello et al., 2014). Produz pequenos grãos/sementes elípticos (**Figura 3B**) com aproximadamente 4 mm de comprimento e 1,5 mm de largura (CDCS, 2018).

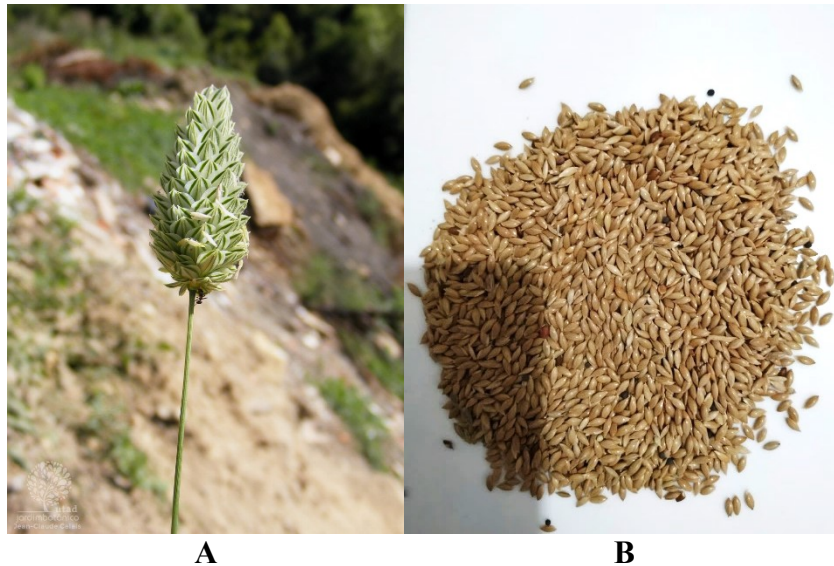


Figura 3. Parte aérea (A) e grãos/sementes (B) de *Phalaris canariensis* L.

As sementes de alpiste podem ser classificadas como sendo cereais, pois possuem na sua constituição germe, endosperma e produzem farelo. Em 2015, o alpiste foi aprovado para consumo humano no Canadá e Estados Unidos, estando disponível desde 2018, uma variedade de sementes de alpiste com casca amarela (mais adequada para consumo humano) (CDCS, 2018). Antes da década de 1990, a principal desvantagem do uso das sementes de alpiste para consumo era devido a presença de alguns pêlos na casca das suas sementes (tricomas ou espículas), conhecidos na época como “espíritos”, que causavam irritação na pele e/ou no pulmão, afetando sobretudo os coletores desta planta (Salas et al., 2014). Entretanto, através de técnicas de melhoramento de plantas, foi desenvolvida no Canadá uma semente de alpiste sem pelo (glabra), tornando-a mais adequada para consumo. Esta semente apresenta-se assim muito promissora para o desenvolvimento de produtos de panificação, não só por ser uma alternativa saudável, mas também porque o teor de amido corresponde a mais de 55% do total de hidratos de carbono (CDCS, 2018).

Thacker (2003) descreveu, num estudo realizado com suínos, que uma dieta à base de sementes de alpiste foi eficiente para o crescimento dos animais e que fatores não nutricionais não estavam presentes em quantidades significativas para afetar de forma negativa o desempenho dos suínos. Considerando que os suínos possuem um sistema digestivo parecido com o do ser humano, este estudo poderá ser útil na avaliação das propriedades nutricionais desta semente como alimento para consumo humano, no entanto, os estudos não relatam parâmetros toxicológicos. Por outro lado, em um estudo conduzido por Magnuson et al. (2014), não foi observada toxicidade aguda em ratos provocada pelo consumo de uma dieta à base de 50% de semente durante 90 dias, assegurando assim o uso da semente como um cereal promissor para consumo humano.

2.2.1. Composição nutricional e química do Alpiste

A nível nutricional, a semente de alpiste apresenta uma composição de aproximadamente 60% de hidratos de carbono, 8% de lípidos, 7% de fibra alimentar e 20% de proteína (com grande percentagem de aminoácidos essenciais como cisteína, triptofano e fenilalanina) (CDCS, 2018). É também uma boa alternativa para os consumidores mais sensíveis, pois não possui glúten, apresenta ainda conteúdos mais elevados de ferro do que o trigo ou quinoa, maior conteúdo em zinco do que qualquer outro pseudocereal e ainda maior conteúdo em folatos, fósforo, magnésio e manganês comparativamente à aveia e trigo (**Tabela 1**). As sementes de alpiste podem ainda conter uma média de 55,8 g de amido por 100 g de amostra (Aal et al., 2011). Possuem um teor de ácidos gordos mais elevado que o trigo ou a cevada, por exemplo, sendo que os mais representativos são o ácido palmítico (ácido gordo saturado, 15%), ácido oleico (ácido gordo monoinsaturado, 30%) e ácido linoleico (ácido gordo polinsaturado, 55%).

Tabela 1. Composição de micronutrientes de alpiste, trigo e aveia (mg/100 g).

	Folato	Fósforo	Magnésio	Manganês
Alpiste	0,12	660	213	6,4
Trigo	0,09	410	180	5,5
Aveia	0,07	340	140	5

Fonte: Adaptado de CDCS (2018).

A semente de alpiste é também uma fonte de esteróis vegetais (aproximadamente 0,47 mg/g), representado o β -sitosterol cerca de 43% do total de esteróis. Foi também já reportado a presença de carotenoides, β -caroteno, a luteína e zeaxantina (CDCS, 2018).

2.3. Sementes de Níger (*Guizotia abyssinica* (L.f.) Cass.)

A semente de Níger (*Guizotia abyssinica* (L.f.) Cass., **Figura 4**) pertence à família botânica Asteraceae. Esta família é composta por aproximadamente 25000 espécies e mais de 1500 géneros. É a maior família de plantas com flores e está distribuída por todo o mundo, à exceção da Antártida (Sell & Murrell, 2006). É uma família de plantas de elevado valor económico, pois muitas delas são designadas de plantas aromáticas e medicinais, e por isso usadas para consumo humano, mas também têm outras aplicações como na apicultura, na produção de inseticidas e também ornamentais (Beretta et al., 2008). No estudo de identificação de PANC realizado por Barreira et al. (2015) em uma região de Minas Gerais - Brasil, a família Asteraceae foi a com maior representatividade (18,6%) dentre as plantas identificadas.

O género *Guizotia* compreende seis espécies, podendo alcançar até 2 m de altura. As suas folhas nascem em lados opostos do caule, atingido 10 a 20 cm de comprimento e 3 a 5 cm de largura. Tem folhas distintas, podendo ser mais ou menos pontiagudas, e variam de verde claro para verde escuro. É uma cultura anual, e é cultivada principalmente pelo seu alto teor de fração lipídica (Getinet & Sharma, 1996). A semente de níger é considerada uma das principais oleaginosas de grande importância comercial, cultivada em muitos países de zonas tropicais e temperadas (Bhagya & Sastry, 2003). A Etiópia e a Índia no que diz respeito as sementes, são os maiores produtores do mundo, sendo na Etiópia cerca de 50 a 60% do óleo comestível do país feito a partir dessas sementes (Quinn & Myers, 2002).



Figura 4. Parte aérea (A) e grãos/sementes (B) de *Guizotia abyssinica* (L.f.) Cass.

2.3.1. Composição nutricional e química do níger

As sementes de níger, à semelhança de outras oleaginosas, são muito ricas em ácidos gordos. O perfil destas sementes assemelha-se muito aos do açafrão e girassol, possuindo um alto teor em ácido linoleico (aproximadamente 85% da sua composição total em ácidos gordos), mas também palmítico, esteárico e oleico (representando cada uma cerca de 6 a 11% dos ácidos gordos totais) (Ramadan & Mörsel, 2003; Getinet & Sharma, 1996). Nutricionalmente, são ricas em proteína e fibra bruta, 30 e 23%, respetivamente (Bhagya & Sastry, 2003).

2.4. Sementes de Painço (*Panicum miliaceum* L.)

O Painço (*Panicum miliaceum* L., **Figura 5**) é uma planta herbácea de crescimento anual, pertencente à família Poaceae, que é uma das maiores famílias de gramíneas. O género *Panicum* possui cerca de 450 espécies de gramíneas. O painço é também denominado de milho proso, milho de vassoura, milheto ou milho comum. Um grupo de 35 espécies de gramíneas pertencentes à família botânica Poaceae inclui as principais plantas produtoras de alimentos do mundo (Kalaisekar et al., 2016). Dos cereais antigos mais utilizados, o painço fica somente atrás do trigo e da cevada (Kalinova & Moudry, 2006). Atualmente, a planta é cultivada nos Estados Unidos, África e Europa

(Kalaisekar et al., 2016; Patil, 2017). O painço é usado para consumo humano principalmente em países em desenvolvimento. Na Europa, esta semente é normalmente usada como ração animal (Kalinova & Moudry, 2006). O uso eficiente do painço deve-se à sua grande diversidade genética (Zhang et al., 2019).

As sementes de painço têm um tempo de crescimento muito curto, cerca de 70 a 80 dias (Kalinova & Moudry, 2006; Patil, 2017), medem cerca de 3 mm de comprimento e 2 mm de largura, e normalmente são em forma oval. São sementes mais pequenas, comparativamente às de outros cereais, como por exemplo, o sorgo (Kalaisekar et al., 2016).

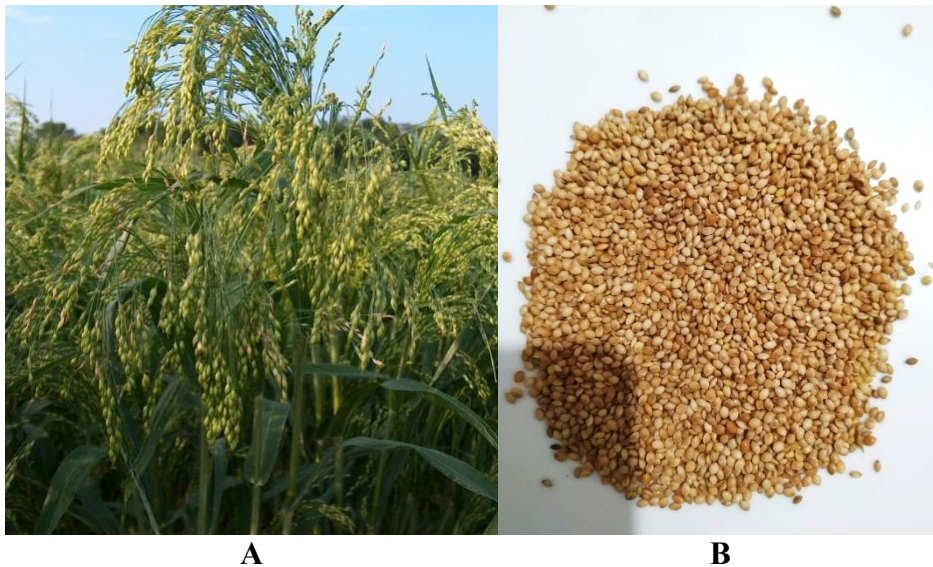


Figura 5. Parte aérea (A) e grãos/sementes (B) *Panicum miliaceum* L.

2.4.1. *Composição nutricional e química do Painço*

Nutricionalmente, o painço, é uma semente muito rica em proteínas e micronutrientes como o ferro e zinco em comparação com outros cereais (Amadou et al., 2013). Conteúdo de proteínas, representando aproximadamente 14% do seu conteúdo nutricional total, caracterizando-se assim por ser uma semente de qualidade superior com o equilíbrio ideal de aminoácidos essenciais, tendo grande quantidade de aminoácidos que contêm enxofre (metionina e cisteína) (Kalinova & Moudry, 2006; Patil, 2017).

2.5. Compostos e propriedades bioativas das sementes em estudo

2.5.1. Ácidos gordos

Os ácidos gordos são compostos que têm uma influência muito significativa na saúde do consumidor, sendo classificados em saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA). São os principais componentes dos fosfolípidos e triglicerídeos, e os PUFA, como por exemplo o ácido linoléico e α -linolénico, como não sintetizados pelo corpo humano, torna-se essencial o seu consumo através da alimentação. Os ácidos gordos em geral, contribuem para diversas funções metabólicas de obtenção de energia, mas também funções estruturais ao nível celular, devendo por isso ser consumidos diariamente (Chow, 2007; Tinoco et al., 2007). Os produtos cárneos apresentam teores elevados de SFA, enquanto os vegetais são ricas fontes em ácidos gordos insaturados, com efeitos benéficos reconhecidos e amplamente documentados para a saúde do consumidor (Azevedo, 2014).

As sementes estudadas nesse trabalho possuem potencial para serem promissoras em relação ao conteúdo de ácidos gordos. O painço, por exemplo, está descrito como uma boa fonte de ácidos gordos, contendo nomeadamente ácido palmítico, palmitoléico, araquídico e predominantemente o ácido linoleico (Silva, 2014).

2.5.2. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são compostos de metabolismo secundário de plantas, uma vez que não estão diretamente relacionados as funções de crescimento e desenvolvimento do tecido vegetal, ainda assim são compostos essenciais para as plantas, pois atuam como agentes de defesa das plantas contra os ataques aos seus tecidos, bióticos ou abióticos, como exemplo condições desfavoráveis de temperatura, luz e pH, inibição de oxidação lipídica e ainda ataques de patógenos, inibindo o crescimento de bactérias e fungos (Buchanan et al., 2015). São encontrados em grandes quantidades em frutos, vegetais e seus derivados, conferem cor, adstringência, aroma e estabilidade (Soethe et al., 2016). São classificados de várias maneiras (**Figura 6**), por exemplo, de acordo com os grupos funcionais ligados ao fenol, ou com base no número de unidades de fenol na

molécula. Possuem várias subclasses, entre elas algumas das mais conhecidas como as antocianidinas, os flavonóides e isoflavonas. Como moléculas com um elevado potencial antioxidante, os compostos fenólicos estão sempre sendo associados a muitos efeitos benéficos para a saúde, diretamente correlacionado com a sua capacidade de funcionar como agentes quelantes, e por isso inibirem a ação oxidativas das espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Soutinho, 2012).

As sementes de alpiste, na cultura medicinal tradicional são muito utilizadas para o tratamento de diabetes e hipertensão (Salas et al., 2014), sabendo-se que é uma fonte rica em compostos fenólicos (aproximadamente 67% são fenólicos livres) e de carotenoides. No entanto, poucos estudos se debruçaram sobre a caracterização do perfil fenólico desta semente (Chen et al., 2016).

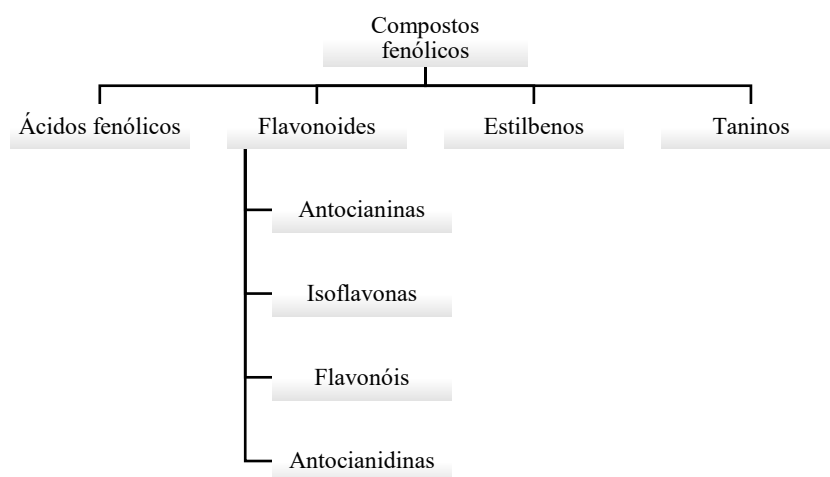


Figura 6. Diferentes classes de compostos fenólicos.

2.5.3. *Propriedades antioxidantes*

As sementes de cereais apresentam diversos efeitos benéficos para a saúde quando incorporados numa base de dieta regular, não só pelas suas características nutricionais, mas também por possuírem diversos compostos com variadas propriedades bioativas, como por exemplo antioxidantes (Gan et al., 2017).

Distúrbios de saúde relacionados com o stress oxidativo são causados pela acumulação de radicais livres no organismo, sendo estes compostos considerados como um dos fatores primários para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como a

arteriosclerose, doenças neurodegenerativas nomeadamente, Alzheimer e Parkinson, causando ainda a morte celular e lesões nos tecidos resultantes de enfartes do miocárdio, envelhecimento, processos inflamatórios e cancro. Existem vários factores que contribuem para a formação destes radicais livres (**Figura 7**), destacando-se a alimentação deficiente, stress físico e oxidativo mediado por poluentes ambientais, químicos, toxinas, radiação, e mesmo stress psicológico (Chorilli et al., 2007).

As moléculas antioxidantes por sua vez, por serem capazes de evitar o desenvolvimento de processos oxidativos, possuem a função protetora, atuando na inibição e/ou eliminação da formação dessas espécies reativas. Vários fatores abióticos são assim os responsáveis pela proliferação destas ROS, na qual os antioxidantes atuam como neutralizadores do efeito deteriorador das ROS, desempenhando assim um papel crucial na preservação de funções celulares essenciais para a manutenção de todos os sistemas biológicos (Neha et al., 2019).

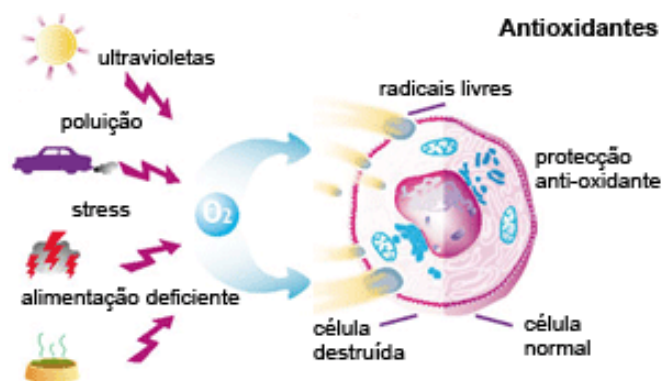


Figura 7. Factores que promovem a produção de radicais livres (Leiner, 2014).

Estudos realizados na fração lipídica extraída da semente de alpiste, demonstraram o potencial antioxidante e antibacteriano desta espécie de PANC, que pode ser aplicado posteriormente como um produto agroalimentar, medicinal ou mesmo cosmético (Salah et al., 2018).

O níger, por sua vez, está descrito como uma fonte de tocoferóis (Ramadan & Mörsel, 2003), os quais em sinergismo com os fosfolípidos da membrana plasmática, apresentam elevada capacidade no controlo da oxidação lipídica, e atuam na prevenção de diversas doenças, possuindo capacidade para atuar como antimicrobianos, antivirais e auxiliam na estabilidade da fração lipídica da semente (Cui & Decker, 2016; Pimentel et al., 2016; Getinet & Sharma, 1996). Esta fração lipídica, para além dos tocoferóis, possui

também níveis elevados de triacilgliceróis, aos quais são atribuídos efeitos pró e antioxidantes (Rathjen & Steinhart, 1997).

O painço também é classificado como uma boa fonte de compostos antioxidantes, como por exemplo ácidos fenólicos e flavonóides glicosilados, também conhecidos pelas suas capacidades prebióticas e no auxílio ao funcionamento dos probióticos com benefícios para a saúde do consumidor (Amadou et al., 2013).

2.5.4. *Potencial citotóxico*

O desenvolvimento de um processo cancerígeno cancro é complexo e com diferentes estágios de desenvolvimento e propagação (Ide et al., 2001) que pode ser iniciado por erros na molécula de ADN, por exemplo, após exposição a poluentes ambientais, radiação UV ou espécies reativas de oxigénio formadas endogenamente. Estes erros ao nível do ADN podem levar a mutações que quando acumuladas podem levar à transformação de células normais em células tumorais. Um fator de risco adicional para o desenvolvimento de cancro pode ser a presença de inflamação (Multhoff et al., 2012).

Os estudos de citotoxicidade são muito prementes para determinar o potencial tóxico de extratos de plantas ou compostos biologicamente ativos isolados das mesmas. É uma ferramenta também muito valiosa para a diferenciação entre a capacidade de provocar apoptose ou necrose nas células tumorais *in vitro*. Para além disso, permite a determinação da cinética de dependência da dose e do tempo de morte celular, permitindo uma previsão da toxicidade real dos extratos em estudo (Ahn et al., 2019). Para serem utilizados em produtos para consumo humano, os compostos vegetais naturais e seus derivados devem ser bio seguros, não apresentando toxicidade e genotoxicidade (Gateva et al., 2019).

2.5.5. *Potencial antimicrobiano*

As propriedades antimicrobianas das plantas estão relacionadas com a capacidade de agir contra microrganismos patogénicos. Os compostos com potencial antimicrobiano podem atuar de diferentes formas para grupos particulares de

microrganismos, provocando diferentes danos consoante o microrganismo sobre o qual está a atuar (Shimamura et al., 2007), por exemplo para além de danificar os sistemas enzimáticos celulares e comprometer o material genético de uma célula bacteriana e ou fúngica, pode também danificar a bicamada da membrana celular (Sánchez et al., 2010).

Os compostos presentes nas plantas que normalmente apresentam este potencial são as saponinas, taninos, alcaloides, alcenilfenóis, glicoalcalóides, flavonóides, sesquiterpenos, lactonas e terpenóides (Tajkarimi et al., 2010). Os compostos fenólicos apresentam, na sua grande maioria, atividade antimicrobiana, tendo a capacidade de penetrarem na membrana celular dos microrganismos, causando danos nas estruturas da mesmas, provocando alterações na permeabilidade, pH intercelular da célula, potencial de membrana e também na síntese de adenosina trifosfato (ATP), tudo isto podendo levar a inibição do crescimento do microrganismo ou mesmo morte celular (Sánchez et al., 2010).

2.6. Produtos de panificação

2.6.1. *Importância de aplicação de PANC na indústria de panificação*

As plantas e produtos de origem vegetal, representam uma grande parte dos produtos alimentares consumidos regularmente por todo o mundo, sendo que grãos e sementes, que na sua forma, natural ou processados (farinhas por exemplo), estão entre o grupo de produtos de origem vegetal mais consumidos. Um estudo realizado por Biswas & Rahmatullah (2011), demonstrou que num período de escassez de alimentos, as PANC apresentam-se como uma alternativa viável e eficiente para a substituição dos produtos alimentares que consumimos hoje em dia.

Com toda a potencialidade e as características que as PANC apresentam, a sua aplicabilidade em produtos alimentares é ilimitada. A indústria da panificação apresenta-se assim como uma das muitas áreas a abordar para a aplicação destas sementes, uma vez que apresentam uma grande variedade de produtos totalmente baseados no uso de sementes transformadas em farinha, uma grande flexibilidade na modificação das formulações e receitas dos mesmos, e também porque é transversal a todas as faixas etárias de consumidores e por isso, o nicho de mercado para o desenvolvimento de novos produtos alimentares é enorme (Islam et al., 2007)

Este tipo de plantas e mais especificamente as sementes, podem também ser usadas como fontes de óleos e gorduras, usadas como especiarias, como substitutas do sal, para o fabrico de bebidas, como tonificantes ou ainda em infusões (Kinupp & Barros, 2004). Por outro lado, existem cada vez mais consumidores que possuem certas intolerâncias que não lhes permitem consumir produtos de panificação por conterem por exemplo trigo ou sementes de elevado conteúdo em glúten, sendo denominadas de sensibilidade não celíaca ao glúten (NCGS - *Non-celiac gluten sensitivity*) ou sensibilidade ao glúten (GS - *sensitivity gluten*), respetivamente. O crescimento da procura por produtos com baixo ou nenhum conteúdo em glúten, ou com farinhas provenientes de sementes não convencionais, levou a indústria alimentar a readaptar-se a estes novos consumidores mais exigentes com os produtos alimentares que consomem (Bulsa, 2015; Gao et al., 2018).

Estudos realizados com a substituição parcial ou integral de trigo por outras sementes como o alpiste, soja ou cevada apresentaram diferenças nas características físicas e nutricionais, como a diminuição de volume do produto obtido e modificação da cor quer na crosta e no miolo (Aal et al., 2011; Islam et al., 2007; Gill et al., 2002). As substituições devem ser considerados como uma boa alternativa, devido esse principal ingrediente da panificação atualmente (farinha de trigo) possuir proteínas de baixa qualidade nutricional, por causa da sua deficiência em aminoácidos essenciais (Borges et al., 2012). No estudo realizado por Borges et al. (2012), verificaram mudanças na composição nutritiva de pães realizados com farinha de quinoa nas proporções 100:00, 90:10 e 85:15. A substituição por farinha de quinoa na formulação dos pães aumentou os teores de cinzas, fibras alimentar total, lípidios e proteínas e reduziu os níveis de carboidratos, os melhores resultados foram obtidos dos testes com maior concentração da farinha na mistura. Pode se observar também um discreto aumento nos teores de alguns aminoácidos essenciais. Concluindo-se assim que a substituição de uma porção da farinha de trigo por farinha de uma semente alternativa pode fornecer as condições ideais para melhorar as propriedades nutricionais do produto de panificação obtido (Islam et al., 2007).

3. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo principal a caracterização de plantas alimentares não convencionais (PANC): sementes de níger (*Guizotia abyssinica* (L.f.) Cass.), painço (*Panicum miliaceum* L.) e alpiste (*Phalaris canariensis* L.) e avaliar o potencial da sua aplicação em produtos de panificação. Como objetivos específicos, abaixo estão descritas todas as metodologias implementadas no presente trabalho (**Figura 8**):

- Preparação das farinhas de alpiste, níger e painço. Análise de granulometria e índice de absorção de água (IAA) das mesmas.
- Avaliação nutricional das farinhas das sementes por métodos AOAC, nomeadamente, cinzas, gordura total, proteínas, hidratos de carbono e valor energético;
- Determinação da composição química em:
 - Açúcares por HPLC acoplada a um detetor RI;
 - Ácidos orgânicos por UFLC acoplado a um detetor DAD;
 - Ácidos gordos por GC acoplada a um detetor FID;
 - Tocoferóis (vitamina E) por HPLC acoplado a um detetor de fluorescência;
- Preparação de extratos hidroetanólicos (80:20 v/v) a partir das farinhas de alpiste, níger e painço;
- Determinação do perfil fenólico das farinhas por HPLC-DAD/ESI-MS;
- Avaliação *in vitro* das propriedades bioativas de extratos hidroetanólicos obtidos a partir das sementes em estudo:
 - Antioxidante: inibição da peroxidação lipídica através do ensaio das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA);
 - Hepatotóxico: avaliado utilizando cultura primária obtida de células de fígado de porco - PLP2;
 - Antimicrobiano: usando estirpes de bactérias e fungos alimentares ATCC através do método da microdiluição;
- Desenvolvimento de produtos de panificação a base de farinhas de sementes de alpiste, níger e painço e desenvolvimento do pão controle. Avaliação dos parâmetros físicos de cor (sistema CIELab), textura, massa e volume, em comparação com produto à base de farinha de 100% trigo.

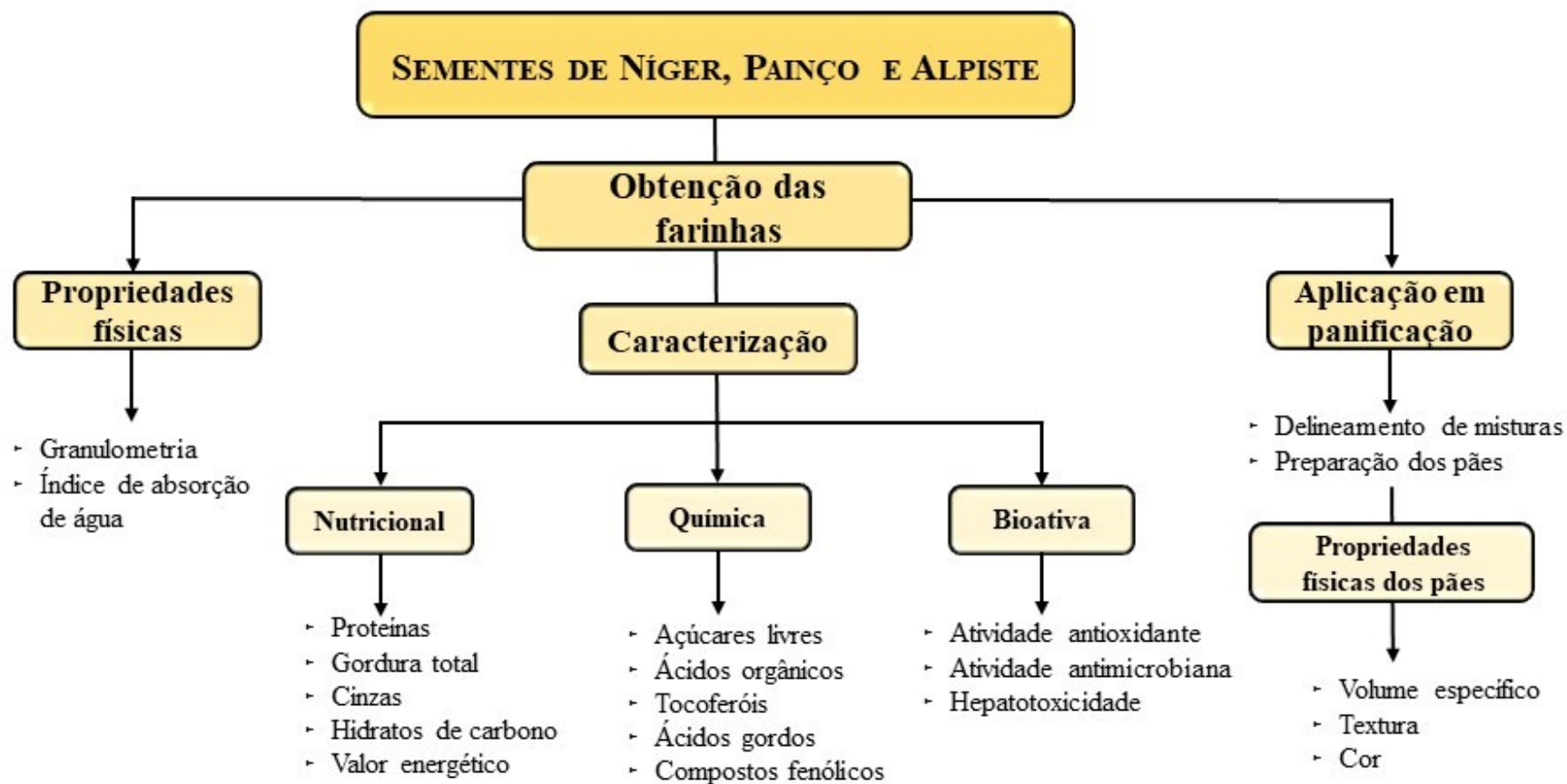


Figura 8. Representação esquemática do plano de trabalhos desenvolvidos.

MATERIAL E MÉTODOS



4. Material e métodos

4.1. Padrões e Reagentes

Para análise de compostos fenólicos, o acetonitrilo (99,99%) de grau HPLC e ácido fórmico foram adquiridos na Fisher Scientific (Lisboa, Portugal) e Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), respetivamente, os padrões de compostos fenólicos (ácido clorogénico, ácido caféico, apigenin-6-*C*-glucósido) na Extrasynthèse (Genay, França). A mistura padrão de referência de éster metílico de ácidos gordos (FAME) 37 (padrão 47885-U) foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), bem como os isómeros dos ácidos gordos individuais, tocoferóis (α -, β -, λ - e δ -isoformas), açúcares (D(+)-sacarose e D(+)-melezitose) e padrões de ácidos orgânicos (ácido oxálico, ácido chiquímico, ácido fumárico, e ácido quínico). O tocol racêmico, 50 mg/mL, foi comprado na Matreya (Pleasant Gap, PA, USA). Os solventes *n*-hexano (95%) e acetato de etilo (99,8%) de grau HPLC foram adquiridos na Lab-Scan (Lisboa, Portugal). No ensaio de inibição da hemólise oxidativa o reagente dicloro-hidrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) foi adquirido na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Para os ensaios hepatotoxicidade foram utilizados soro fetal de bovino (FBS), solução salina balanceada de Hank (HBSS), tripsina, solução de penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100 μ g/mL), RPMI-1640 (meio Instituto Memorial Parque Roswell) e meio DMEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco) adquiridos na Hyclone (Chicago, Illinois, EUA). O ácido acético, elipticina, sulforodamina B (SRB), dexametasona, lipopolissacarídeo (LPS), Azul de Trypan e Trisaminometano (Tris) foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Para a formulação dos pães, foi utilizada farinha de trigo especial, obtida do moinho Rio Azul – PR/Brasil e os demais ingredientes foram adquiridos de comércio local da cidade de Medianeira - PR/Brasil. A água destilada utilizada foi tratada num sistema de purificação Milli-Q (Millipore, model A10, Billerica, MA, USA).

4.2. Preparação das farinhas e avaliação de parâmetros físicos

As sementes de níger (*Guizotia abyssinica* (L.f.) Cass), painço (*Panicum miliaceum* L.) e alpiste (*Phalaris canariensis* L.) foram adquiridas no comércio local da

cidade de Medianeira - PR/Brasil e preparadas para farinhas (posteriormente utilizadas para a preparação de produtos de panificação). As sementes foram então congeladas durante 24 horas para solidificar a fração lipídica e facilitar o seu processamento no moinho, no qual foram posteriormente reduzidas a pó com um tamanho de aproximadamente 35 mesh. Finalmente, foram armazenadas em local fresco e seco até posterior análise (**Figura 9**).



Figura 9. Sementes de *G. abyssinica* (A1), *P. miliaceum* (B1) e *P. canariensis* (C1), e respectivas farinhas (A2, B2 e C2, respetivamente).

4.2.1. Análise granulométrica

Para determinar o tamanho das partículas (classificação granulométrica) utilizou-se um agitador de peneiras. Pesou-se aproximadamente 85 g de amostra de cada farinha. As peneiras e os fundos, previamente pesados, foram montados na plataforma vibratória de forma decrescente (do maior mesh - 100 para o menor - 20). Utilizou-se o conjunto de peneiras com 20, 30, 35, 50, 60 e 100 “Mesh Tyler” (abertura de 850, 600, 500, 300, 250 e 150 μm , respetivamente) e a base. As amostras foram tratadas

individualmente, sendo colocadas na primeira peneira (20 mesh), onde se entrelaçou borrachas na tampa das peneiras para total vedação do conjunto de peneiras. O tempo de peneira foi de 15 min. As quantidades retidas em cada peneira e base foram pesadas separadamente e expressas em percentagem, conforme descrito por Germani et al. (1997).

4.2.2. *Índice de absorção de água*

O Índice de Absorção de Água (IAA) de cada farinha foi determinado de acordo com o método descrito por Okezie & Bello (1988). Pesou-se 0,5 g de cada amostra para um tubo de falcon com tampa e adicionou-se 25 mL de água destilada. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado durante 1 min em agitador vórtex e, em seguida, centrifugado a 5300 rpm durante 20 minutos (centrifuga Cientec 5000R). O líquido sobrenadante foi descartado, e o material remanescente pesado numa balança semi-analítica. Finalmente, o IAA foi calculado de acordo com a equação (1).

$$IAA = \frac{\text{massa da amostra úmida (g)} - \text{massa inicial da amostra (g)}}{\text{massa da amostra úmida (g)}} \quad (1)$$

4.3. Determinação do valor nutricional e composição química das farinhas

4.3.1. *Análise do valor nutricional*

A composição nutricional das farinhas foi determinada usando os métodos oficiais descritos pela AOAC (2016). Para tal, foi determinado o teor de humidade, proteína, gordura total, cinzas, hidratos de carbono e valor energético.

A determinação da humidade presente na amostra foi realizada colocando uma quantidade conhecida de amostra (2 g) numa balança de humidade digital (PMB series, ae ADAM), por um período de aproximadamente 7 min. O teor de humidade foi determinado por diferença de peso da amostra e expresso em percentagem (%).

A análise do teor de proteínas foi realizada segundo o método macro-Kjeldahl (AOAC 978.04), o qual se baseia na conversão do azoto total. Na digestão da matéria orgânica, à amostra (0,5 g) foram adicionados 15 mL de ácido sulfúrico, que irá reter o

azoto sob a forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. No aparelho de macro-Kjeldahl é adicionado NaOH, por volumetria de retrocesso, que irá libertar o azoto sob forma de NH_3 , posteriormente coletado por destilação a vapor numa solução de H_2SO_4 0,1N. Finalmente, é feita uma titulação com NaOH 0,1N, usando vermelho de metilo como indicador para calcular a quantidade de azoto, utilizando como fator de correção N (quantidade de azoto) x 6,25, e os resultados expressos em g/100 g peso seco.

A gordura total foi determinada através da extração de uma massa conhecida da amostra (3g), utilizando um aparelho de Soxhlet, com éter de petróleo, durante aproximadamente 8 horas (entre 16 a 20 voltas no aparelho de Soxhlet), uma temperatura de cerca 120 °C (AOAC 920.85). A fração volátil foi evaporada e a fração lipídica colocada em estufa até peso constante. Os resultados foram expressos em g/100 g de peso seco.

O teor de cinzas foi determinado por incineração de cerca de 0,5 g de amostra em mufla a 600 °C (AOAC 923.03) e, finalmente, o teor de hidratos de carbono foi calculado por diferença de todos os parâmetros obtidos anteriormente. Em ambos, os resultados foram expressos em g/100 g de peso seco.

O valor energético foi calculado segundo o descrito pelo Regulamento (UE) n 1169 (2011) e de acordo com a equação (2):

$$\text{Energia (kcal)} = 4 \times (\text{g proteína} + \text{g hidratos de carbono}) + 9 \times (\text{g de gordura}) \quad (2)$$

4.3.2. Açúcares livres

A partir da amostra utilizada para extração de Soxhlet (no qual se retirou a fração lipídica), foi pesado aproximadamente 1 g de massa e adicionou-se 1 mL de solução de padrão interno (melezitose, 25 mg/mL). Posteriormente procedeu-se à extração, no qual foi adicionada à amostra 40 mL de etanol 80%, em banho-maria a 80 °C durante 1 hora e 30 min, com agitação intercalada a cada 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (Centrífuga refrigerada K24OR, Centurion, Sussex Ocidental, Reino Unido) durante 10 min a 3500 rpm, filtradas, e o sobrenadante transferido para um balão de vidro no qual se procedeu à evaporação do etanol a 50 °C sob pressão reduzida (Evaporador rotativo Büchi R-210, Flawil, Suíça). A água obtida após evaporação do sobrenadante, foi então submetida a um processo de deslipidificação, onde foi lavada três

vezes sucessivas com 10 mL de éter etílico. As amostras foram colocadas a 40 °C para remoção do éter etílico residual, e o resíduo redissolvido em água destilada para aferido a 5 mL e, posteriormente, filtrado em filtros de nylon de 0,2 µm para vials para posterior análise do perfil em açúcares no sistema de HPLC.

A determinação cromatográfica dos açúcares livres nas farinhas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI, Knauer, sistema Smartline 1000, Berlim, Alemanha), conforme descrito pelos autores Barros et al. (2013). O sistema de HPLC (Knauer, sistema Smartline) usado está equipado com um detetor de RI (Knauer Smartline 2300) e uma coluna 100-5 NH₂ Eurospher (4,6 × 250 mm, 5 µm, Knauer). A fase móvel utilizada foi acetonitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v) com um caudal de 1 mL/min em modo isocrático. A identificação dos açúcares foi realizada através da comparação dos tempos de retenção relativos dos picos da amostra com padrões autênticos e a quantificação realizada pela normalização interna da área do pico cromatográfico usando o pico da melezitose (PI) como padrão. Os resultados foram expressos em g por 100 g de peso seco da amostra.

4.3.3. Ácidos orgânicos

Foram pesadas aproximadamente 1 g de massa de cada amostra seca de farinha para um goblé protegido da luz (previamente envolto em papel de alumínio) e adicionou-se 25 mL de ácido metafosfórico (4,5%, v/v) numa concentração de 10 mg/mL, a uma temperatura ambiente de cerca de 25 °C. A mistura foi colocada sob agitação magnética durante 20 minutos e posteriormente filtrada para um tubo de ensaio de 20 mL. Para análise cromatográfica, as amostras foram filtradas para um vial âmbar (1,5 mL) através de filtro de nylon de 0,2 µm para posterior análise em HPLC.

A determinação cromatográfica do perfil em ácidos orgânicos foi realizada por cromatografia líquida ultra-rápida acoplada a um detetor de diodos (UFLC-DAD; Shimadzu Cooperation, Kyoto, Japão) como previamente descrito por Barros et al. (2013). A separação dos compostos foi efetuada através de uma coluna de fase reversa C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex), termostaticada a 35 °C. A detecção ocorreu através de um detetor de diodos (DAD) programado para adquirir os comprimentos de onda predefinidos de 215 nm e 245 nm. O solvente de eluição utilizado em modo isocrático

foi o ácido sulfúrico (3,6 mM, H₂SO₄). A identificação dos ácidos orgânicos e a respetiva quantificação foi determinada por comparação dos tempos de retenção e espectros UV com padrões comerciais. A quantificação foi realizada por comparação da área do pico no comprimento de onda programado com o padrão comercial correspondente, utilizando retas de calibração de 7 níveis do: Ácido oxálico ($y = 9 \times 10^6 x + 45973$, $R^2 = 0,9901$, LOD = 6,3 µg/mL; LOQ = 20,8 µg/mL); Ácido quínico ($y = 610607x + 46061$, $R^2 = 0,9995$, LOD = 11,3 µg/mL; LOQ = 37,6 µg/mL); ácido chiquímico ($y = 7 \times 10^7 x + 175156$, $R^2 = 0,9999$, LOD = 10,2 µg/mL; LOQ = 56,5 µg/mL); e ácido fumárico ($y = 154862x + 1 \times 10^6$, $R^2 = 0,9977$, LOD = 42,5 µg/mL; LOQ = 141,7 µg/mL). Os resultados foram expressos em g por 100 g de peso seco da amostra.

4.3.4. Ácidos gordos

Para a determinação do perfil de ácidos gordos, o extrato lipídico obtido após extração por Soxhlet (ver secção 4.3.1.) foi submetido a um processo de derivatização para obtenção de ácidos gordos passíveis de volatilização, denominados FAME (*Fatty acid methyl ester* – ésteres metílicos de ácidos gordos). Para isso, ao extrato lipídico foi adicionado 5 mL de uma solução de metanol/ácido sulfúrico/tolueno na proporção 2:1:1 (v/v/v), e colocado em banho-maria a 50 °C durante 12 horas sob agitação de 160 rotações por minuto (rpm). Após o qual, com o intuito de potencializar a separação das fases, foi adicionado 3 mL de água destilada e 3 mL de éter etílico no qual se dissolveram os FAME. Para eliminar qualquer resíduo de água, o sobrenadante foi colocado em contacto com uma pequena porção de sulfato de sódio anidro, recuperando-se a amostra e filtrando-a (filtro de nylon 0,2 µm) para um vial com tampa de membrana de teflon. Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização por chama (GC-FID, instrumento DANI modelo GC 1000, Milão, Itália), conforme descrito por Barros et al. (2013).

A identificação do perfil de ácidos gordos foi feita através de um sistema GC (Modelo DANI GC 1000) equipado com um injetor *split/splitless*, detetor de ionização por chama (FID, 260 °C) e uma coluna Macherey Nagel (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm d_f). O forno foi programado com os seguintes parâmetros: a temperatura inicial da coluna foi 100 °C, durante 2 min; em seguida, aumentou-se a temperatura a 10 °C/min até 140 °C, 3

°C/min até 190 °C, 30 °C/min até 260 °C durante 2 min. O hidrogénio (gás de transporte) tinha um caudal de 4,0 mL/min (0,61 bar), medido a 50 °C. A injeção split (1:50) foi realizada a 250 °C. Para cada análise injetou-se 1 µL da amostra. A identificação de ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos da mistura padrão de 37 FAMES e das amostras. Para o processamento dos resultados utilizou-se o programa software Clarity 4.0.1.7 (DataApex, Podohradská, República Checa), tendo sido expressos os resultados em percentagem relativa (%) de cada ácido gordo detetado.

4.3.5. Tocoferóis

Para a extração dos tocoferóis, pesaram-se 0,5 g de amostra seca para um tubo de falcon, ao qual se adicionou 100 µL de butil-hidroxitolueno (BHT, 10 mg/mL em hexano), 400 µL de tocol (50 µg/mL em hexano, padrão interno) e 4 mL de metanol. A mistura foi colocada sob agitação durante 1 minuto no vórtex, após o qual foi adicionado 4 mL de hexano e 2 mL de solução aquosa concentrada de cloreto de sódio (NaCl), e agitado novamente no vórtex. Centrifugou-se a mistura durante 5 minutos a 4000 rpm e transferiu-se o sobrenadante para um vial de vidro, ao qual tinha sido adicionado duas colheres de sulfato de sódio anidro, e a amostra foi re-extraída mais duas vezes com 4 mL de hexano e 2 mL de solução aquosa concentrada de cloreto de sódio (NaCl). A cada extração o sobrenadante foi recolhido para o vial de vidro.

O extrato obtido foi então seco e concentrado em corrente de azoto para remoção do *n*-hexano, e redissolvido novamente em 2 mL de hexano. Foi filtrado para vial âmbar (1,5 mL) através de filtro de nylon de 0,22 µm para posterior análise em HPLC.

Os tocoferóis foram determinados utilizando o procedimento de extração e caracterização cromatográfica, seguindo o procedimento descrito pelos autores Barros et al. (2013). A análise cromatográfica foi realizada num sistema HPLC acoplado a um detector de fluorescência, e uma coluna em fase normal de Poliamida II (250 x 4,6 mm, 5 µm, YMC da Waters) a 35 °C (forno 7971 R Grace), sendo que o sistema foi programado para excitação ao comprimento de onda de 290 nm e emissão a 330 nm. A fase móvel consistiu numa mistura de *n*-hexano e acetato de etilo (70:30 v/v), e um caudal de 1 mL/min. A análise dos resultados foi efetuada através do software Clarity 2.4 (DataApex), a quantificação foi baseada no sinal de fluorescência por comparação

cromatográfica com tocol (padrão interno). A identificação e quantificação foram baseadas na resposta do sinal de fluorescência de cada padrão, usando o método padrão interno (tocol) e usando curvas de calibração obtidas a partir de padrões comerciais de cada composto. Os resultados foram expressos em mg por 100 g de peso seco.

4.4. Avaliação do potencial bioativo e perfil em compostos fenólicos

4.4.1. *Preparação dos extratos hidroetanólicos*

Os extratos hidroetanólicos foram preparados usando 1 g de amostra seca de cada farinha com 30 mL de uma solução etanol:água (80:20, v/v), em agitação magnética durante 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, filtrou-se usando papel de filtro Whatman nº 4 e repetiu-se a extração da amostra usando o mesmo volume de solvente e ao mesmo tempo de agitação. Os extratos combinados foram evaporados através de um evaporador rotativo (Buchi, série 3000, Suíça), até à evaporação total do etanol sob vácuo a 50 °C. A fase aquosa obtida foi congelada e liofilizada para posterior análise da sua capacidade antioxidante e perfil fenólico.

4.4.2. *Avaliação da atividade antioxidante*

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos foi realizada através de dois métodos distintos: Inibição da peroxidação lipídica através de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA). Na análise de TBARS avalia-se a capacidade do extrato atuar contra os oxidantes presentes na fração lipídica das células de cérebro de porco (Martins et al., 2016), por sua vez, no ensaio OxHLIA, avalia-se a capacidade do extrato penetrar nas membranas dos eritrócitos de ovelha de forma a neutralizar os oxidantes responsáveis pela sua destruição (Takebayashi et al., 2012).

4.4.2.1. Inibição da peroxidação lipídica através de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para a análise da atividade antioxidante através do método TBARS, utilizou-se o protocolo descrito por Sarmiento et al. (2015). Os extratos hidroetanólicos liofilizados foram redissolvidos em etanol:água (80:20, v/v) para obtenção de uma solução mãe de 0,5 mg/mL, diluindo-se sucessivamente para obtenção de seis concentrações abaixo da mesma.

Paralelamente, foi preparada uma suspensão de cérebro de porco (*Sus scrofa*) no qual foi adicionado uma porção de cérebro juntamente com tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) numa proporção de 1:2 (m/v), centrifugando-se a mistura a 3500 rpm durante 10 min a uma temperatura de 10 °C para evitar a rancificação da mistura.

Em tubos eppendorf foi colocado 200 µL de cada uma das soluções de extrato hidroetanólico, às quais se adicionaram 100 µL de ácido ascórbico (0,1 mM), 100 µL de sulfato de ferro (FeSO₄ – 10 mM) e 100 µL do sobrenadante do homogeneizado de cérebro de porco e incubou-se à 37,5 °C durante 1 hora. Após incubação, foi adicionado 500 µL de ácido tricloroacético (28% m/v) para parar a reação e 380 µL de ácido tiobarbitúrico (2% m/v, TBA), e os tubos foram colocados em banho maria à 80 °C durante 20 minutos, de forma a promover a reação entre o TBA e o malondialdeído (MDA – espécie reativa de oxigénio resultante da peroxidação lipídica que ocorre no tecido cerebral do porco). Posteriormente, centrifugou-se a mistura a 3500 rpm durante 5 min, para separar os resíduos do sobrenadante. A medição da intensidade da cor do complexo MDA – TBA fez-se a 532 nm. A percentagem de inibição da peroxidação lipídica foi calculada através da seguinte equação (3):

$$\% \text{ inibição da peroxidação lipídica} = \frac{A - B}{A} \times 100 \quad (3)$$

onde A e B dizem respeito à absorvância do controlo (água) e da solução de extrato, respetivamente. A concentração de extrato correspondente a 50% de inibição da peroxidação lipídica (IC₅₀) foi calculada a partir do gráfico da percentagem de inibição da formação de TBARS em função da concentração de extrato. Como controlo positivo foi usado o trolox e os resultados foram expressos em µg/mL.

4.4.2.2. Inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA)

A atividade anti-hemolítica foi avaliada através do ensaio de OxHLIA previamente descrito por Lockowandt et al. (2019). Alíquotas de sangue de ovelha foram recolhidas em animais saudáveis e centrifugadas a 1000 rpm durante 5 min a uma temperatura de 10 °C para obtenção dos eritrócitos (o plasma e a camada leucoplaquetária foram descartados). Os eritrócitos foram primeiramente lavados com NaCl (150 mM) e três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4). O sedimento de eritrócito foi depois ressuspensão em PBS 2,8% (v/v).

Numa placa de 48 poços de fundo plano, 200 µL da solução de eritrócitos foram misturados com 400 µL de solução PBS (controlo negativo), de amostras antioxidantes dissolvidas em PBS ou água (para hemólise completa). O Trolox foi usado como controlo positivo. Realizou-se uma pré-incubação das placas a 37 °C durante 10 min com agitação, adicionando-se em seguida dicloridrato de 2,2'-Azobis (2- amidinopropano) (AAPH, 160 mM em PBS, 200 µL) e incubando-se de seguida nas mesmas condições. A densidade ótica foi então medida a 690 nm em intervalos de 10 min por cerca de 400 min (Takebayashi et al., 2012).

O cálculo da percentagem de população de eritrócitos que permanece intacta (P) foi calculada segundo a seguinte equação (4):

$$P (\%) = (S_t - CH_0 / S_0 - CH_0) \times 100 \quad (4)$$

onde S_t e S_0 correspondem a densidade ótica da amostra aos tempos t e 0 min, respetivamente, e CH_0 é a densidade ótica da hemólise completa a 0 min. Os resultados foram expressos como tempo de atraso da hemólise (Δt), o qual foi calculado de acordo com a seguinte equação (5):

$$\Delta t (\text{min}) = H_{t50} (\text{amostra}) - H_{t50} (\text{controlo}) \quad (5)$$

onde H_{t50} corresponde ao tempo hemolítico de 50% (min) obtido graficamente a partir da curva de hemólise de cada concentração de amostra de antioxidante. Os valores de Δt foram posteriormente correlacionados linearmente com as diferentes concentrações de

amostra, a partir das quais foi calculada a concentração com capacidade de retardar a hemólise em 60 min (IC₅₀ (60 min), µg/mL).

4.4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

4.4.3.1. Atividade antibacteriana

Para a determinação da atividade antibacteriana (Carocho et al., 2015), três bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* - ATCC 11632; *Bacillus cereus* - isolado clínico; e *Listeria monocytogenes* - ATCC 7973) e três bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* - ATCC 25922; *Salmonella typhimurium* - ATCC 13311; e *Enterobacter cloacae* - ATCC 35030) foram estudadas. As seis estirpes de bactérias foram adquiridas pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Investigação Biológica “Siniša Stanković” da Universidade de Belgrado na Sérvia. Usando o método de microdiluição, foi determinada a concentrações mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) para cada bactéria sob cada extrato.

A concentração das culturas bacterianas foi ajustada espectrofotometricamente a 625 nm até uma concentração de 1×10^5 UFC/mL. Os inóculos diluídos foram cultivadas em meio sólido para verificar a ausência de contaminação. As diferentes diluições do extrato hidroetanólico foram pipetadas para uma placa de poços contendo 100 µL de caldo de soja tríptico (TSB) e, em seguida, adicionou-se 10 µL de inóculo. Incubaram-se as microplacas por 24 h a uma temperatura de 37 °C. Para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI - menor concentração que produziu uma inibição significativa (em torno de 50%) do crescimento da bactéria em comparação com o controle positivo) foram adicionados 40 µL de cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT) (0,2 mg/mL) e incubou-se a 37 °C durante 30 min. As concentrações mínimas inibitórias obtidas no teste de suscetibilidade de várias bactérias ao extrato foram determinadas também por um ensaio colorimétrico de viabilidade microbiana baseado na redução da cor do INT e comparado com um controle positivo para cada estirpe bacteriana. A concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada por subcultura em série, colocando 10 µL de cada poço que não apresentou mudança de cor em 100 µL de TSB. A menor concentração

que não apresentou crescimento após essa subcultura foi considerada como a CMB. Os compostos E211 (benzoato de sódio) e E224 (metabissulfito de potássio), ambos usados como aditivos alimentares, foram os controlos positivos, e o dimetilsulfóxido (DMSO, 5%) usado como controlo negativo. Os resultados de CMI e CMB foram expressos em mg por mL.

4.4.3.2. Atividade antifúngica

Para a determinação da atividade antifúngica (Carocho et al., 2015), seis estirpes fúngicas (*Aspergillus fumigatus* - isolado humano; *Aspergillus niger* - ATCC 6275; *Aspergillus versicolor* - ATCC 11730; *Penicillium funiculosum* - ATCC 36839; *Trichoderma viride* - IAM 5061; e *Penicillium verrucosum* var. *ciclopium* - isolado alimentar) foram utilizadas. Os fungos foram adquiridos pelo Laboratório de Micologia do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Investigação Biológica “Siniša Stanković” na Universidade de Belgrado na Sérvia e mantidos em meio malte ágar (MA), armazenados a 4 °C e sub-cultivadas uma vez por mês. Os esporos fúngicos foram lavados da superfície das placas de ágar com solução salina estéril a 0,85 % contendo Tween 80 a 0,1 % (v/v). A suspensão de esporos foi ajustada com uma solução salina estéril para uma concentração de aproximadamente $1,0 \times 10^5$ num volume final de 100 μ L por poço. Os inóculos foram armazenados a 4 °C. As diluições dos inóculos foram cultivadas em MA sólido para verificar a ausência de contaminação do inóculo.

Através da técnica de diluição sucessivas em microplacas de 96 poços, determinou-se a concentração mínima inibitória (CMI). Adicionou-se ao meio de malte com o inóculo fúngico a amostra de extrato e as microplacas foram incubadas durante 72 h a uma temperatura de 28 °C. As concentrações mais baixas sem crescimento visível (usando um microscópio binocular) foram definidas como CMI. As concentrações mínimas fungicidas (CMFs) foram determinadas por subcultura em série de 2 μ L de cada poço que não apresentou mudança de cor, em microplacas contendo 100 μ L de caldo de malte por poço e posterior incubadas durante 72 h a 28 °C. A menor concentração sem crescimento visível foi definida como CMF, indicando 99,5% de morte do inóculo original. Os compostos E211 (benzoato de sódio) e E224 (metabissulfito de potássio), ambos usados como aditivos alimentares, foram os controlos positivos, e o

dimetilsulfóxido (DMSO, 5%) usado como controlo negativo. Os resultados de CMI e CMF foram expressos em mg por mL.

4.4.4. Avaliação da atividade hepatotóxica

Para a avaliação *in vitro* do potencial hepatotóxico foi utilizado o ensaio da Sulforrodamina B (SRB) descritos pelos autores (Abreu et al., 2011). Os extratos foram analisados em concentrações de 8 a 0,125 mg/mL. As células não tumorais foram preparadas a partir de fígado de porco obtido no matadouro local, tendo sido designadas por PLP2. O tecido de fígado foi lavado com solução HBSS (Hank's balanced salt solution) contendo 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e dividido em explantes. Alguns destes explantes foram colocados em frascos de tecido de 25 cm², com meio DMEM suplementado com sêrum fetal de bovino 10%, 2 mM de aminoácidos não essenciais e 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e incubados a temperatura de 37 °C com atmosfera humidificada com 5% de CO₂. Fez-se um acompanhamento do crescimento celular, renovando-se o meio a cada dois dias. Posteriormente foram transferidos para as microplacas de 96 poços 190 µL da cultura celular com densidade adequada (1,0x10⁴ células/poço), e a análise efectuada para cada uma das diluições do extrato seguindo o ensaio SRB. Para cada linha celular testada foram obtidas curvas de dose-resposta tendo sido calculados os valores de GI₅₀, correspondentes à concentração de extrato que inibe 50% da proliferação celular (Abreu et al., 2011).

4.4.5. Determinação do perfil em compostos fenólicos

Para a análise cromatográfica foi utilizado um sistema Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) equipado com uma bomba quaternária, um injetor automático (a 5 °C), um desgasificador e um compartimento de coluna com termóstato automatizado. A deteção dos compostos foi efectuada com detetor de díodos (DAD), usando os comprimentos de onda de 280 nm, 330 nm e 370 nm. Para a separação dos compostos, utilizou-se uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 de fase reversa C₁₈ (4,6 x 150 mm, 3 µm; Milford, EUA) termostaticada a 35 °C. A fase móvel utilizada foi (A) ácido fórmico/água (0,1%) e (B) acetonitrilo. O gradiente de eluição estabelecido foi

isocrático: 10% a 15% B até 5 min, 15-20% B até 5 min, 20-25% B 10 min, 25-35% B 10 min, 35-50% B 10 min e reequilíbrio da coluna por 10 min, sendo definida uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. O sistema de HPLC descrito encontrava-se também interligado a um espectrômetro de massa (MS).

A detecção de MS foi feita utilizando uma espectrômetro de massa Ion Trap Linear LTQ XL (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA), equipada com uma fonte ESI (fonte de ionização electrospray). O gás de arraste utilizado foi azoto (50 psi). O sistema trabalhou com uma voltagem de spray de 5 kV, a uma temperatura inicial de 325 °C e tensão capilar de -20 V. A voltagem do *tube lens offset* foi mantida a -66 V. Os espectros foram gravados em modo de ião negativo entre 100 e 1500 *m/z*. A energia de colisão utilizada foi de 35 (unidades arbitrárias). Os dados foram recolhidos e analisados utilizando o programa Xcalibur® (Thermo Finnigan, San Jose, CA, EUA). Para a identificação dos compostos procedeu-se à comparação dos dados obtidos (tempos de retenção, espectros UV-Vis e espectros de massa) com dados disponíveis na literatura e, quando disponíveis, com os padrões. Para análise quantitativa, obtiveram-se as curvas de calibração por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas: Ácido clorogénico ($y = 168823x - 161172$, $R^2 = 0,9999$, LOD = 0,20 µg/mL; LOQ = 0,68 µg/mL); Ácido cafeico ($y = 388345x + 406369$, $R^2 = 0,9939$, LOD=0,78 µg/mL; LOQ = 1,97 µg/mL); Apigenina-6-C-glucósido ($y = 107025x + 61531$, $R^2 = 0,9989$; LOD = 0,19 µg/mL; LOQ = 0,63 µg/mL), baseadas nos sinais UV-Vis e utilizando o comprimento de onda máximo de absorção de cada composto padrão. Nos casos em que não se verificou disponibilidade de padrões para os respetivos compostos, a quantificação foi feita através de curvas de calibração de compostos do mesmo grupo fenólico. Os resultados foram expressos em mg de composto por mg/g de extrato.

4.5. Aplicação das farinhas de PANC em produtos de panificação

Para elaboração dos pães foram feitas duas formulações, uma para o pão controlo e outra para as demais amostras (**Tabela 2**). Utilizou-se uma Panificadora Doméstica Britânia Multipane 2P, ajustada na opção II para 900 g e cor escura, com programação no ciclo 11, indicado para preparar pães com a casca mais fina e macia. Esta opção prepara a massa na etapa de mistura, fermenta a massa e finalmente, coze o pão, totalizando 3 horas para elaboração dessas três etapas. Após a cozedura, os pães foram desenformados

a frio e deixados em repouso durante 1 h para total arrefecimento e posterior análises. No pão controle não foi adicionado farinha de PANC. Nas demais formulações, usou-se farinhas de PANC (farinha de níger, painço e alpiste) como substituição parcial da farinha de trigo (20%). Em testes preliminares, o uso de mais de 20% da farinha de PANC afetava severamente a qualidade do pão, tendo sido utilizado 20% como a proporção máxima de farinha de PANC para a realização deste estudo.

Tabela 2. Formulação para preparo do pão controle e pães com farinha de PANC.

Ingredientes	Controlo (g)	20% de PANC (g)
Farinha de trigo	375,00	300,00
Farinha de PANC	0	75,00
Água	217,50	217,50
Óleo	33,75	33,75
Açúcar	22,50	22,50
Sal	7,50	7,50
Fermento biológico seco	7,50	7,50

4.5.1. Delineamento de misturas

Para avaliar o efeito combinado dessas três variáveis (farinha de níger, painço e alpiste) nas características físicas, foi aplicado um delineamento estatístico experimental pelo método simplex centroide {3,2} conforme Scheffé (1963) aumentado com pontos interiores (**Figura 10**). A metodologia descreve o comportamento de um sistema no qual estão combinadas as variáveis independentes (x_i ; x_j ; x_k) e a variável dependente ou resposta (Y_i). A resposta é uma função dos níveis nos quais estes fatores foram combinados e definidos.

De acordo com Cornell (2011), cada resposta (Y) foi modelada como uma função de fatores codificados (x_i ; x_j ; x_k) pela média da equação (6).

$$Y = \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i<j}^3 \sum_{i<j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i<j<k}^3 \sum_{i<j<k} \beta_{ijk} x_i x_j x_k \quad (6)$$

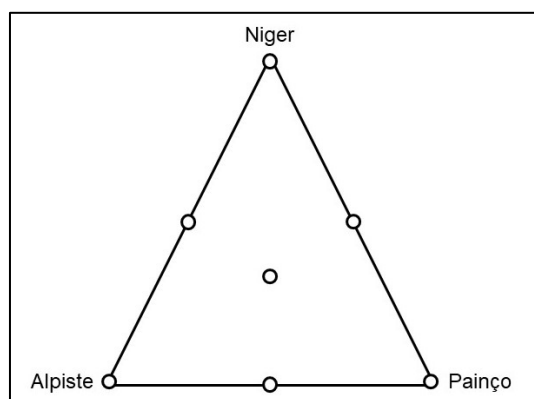


Figura 10. Método simplex centrado {3,2} para delineamento de misturas.

As composições foram formuladas empregando a metodologia de delineamento de misturas do desenho experimental conforme Calado & Montgomery (2003). As combinações das misturas de acordo com o delineamento das farinhas e a quantidade em massa que foi adicionada de cada farinha de PANC encontram-se na **Tabela 3**. Portanto, o delineamento para três componentes foi composto de 7 ensaios, sendo a Amostra 1 (20% níger), Amostra 2 (20% painço), Amostra 3 (20% alpiste), Amostra 4 (10% níger e 10% painço), Amostra 5 (10% níger e 10% alpiste), Amostra 6 (10% painço e 10% alpiste) e Amostra 7 (6,6% níger, 6,6% painço e 6,7% alpiste).

Tabela 3. Composições de PANC nas farinhas obtidas através do planejamento em simplex centrado aumentado.

Amostra	Níger (%)	Massa (g)	Painço (%)	Massa (g)	Alpiste (%)	Massa (g)
Controlo	0	-	0	-	0	-
Amostra 1	100	75	0	-	0	-
Amostra 2	0	-	100	75	0	-
Amostra 3	0	-	0	-	100	75
Amostra 4	50	37,5	50	37,5	0	-
Amostra 5	50	37,5	0	-	50	37,5
Amostra 6	0	-	50	37,5	50	37,5
Amostra 7	33,3	25	33,3	25	33,4	25

4.5.2. Características físicas dos pães

A cor do miolo do pão foi determinada em fatias de aproximadamente 25 mm através de um colorímetro (modelo CR-400, Konica Minolta Sensing Inc) utilizando os

parâmetros de cor L^* (luminosidade, $L = 0$ é preto e $L = 100$ é branco), a^* (vermelhidão ou verde, $a = -60$ é verde e $a = 60$ é vermelho) e b^* (amarelo ou azul, $b = -60$ é azul e $b = 60$ é amarelo) (Ayadi et al., 2009).

O volume total dos pães foi obtido pelo método de deslocamento de sementes (Método 10-05 - AACC, 2001). Para análise do volume total, cada pão foi previamente pesado em balança analítica de precisão, e em seguida, utilizando o método de deslocamento de sementes, colocou-se o pão dentro do recipiente com volume conhecido e preencheu-se o volume restante utilizando as sementes. Medindo o volume da semente utilizada pode-se encontrar o volume total do pão através da diferença entre o volume do recipiente e o volume das sementes utilizadas para preencher o mesmo. Para estabelecer o volume específico do pão, dividiu-se o volume total do pão (cm^3) pela sua massa (g) após a cozedura (Chen et al., 2019).

Finalmente, a análise de textura dos pães foi realizada após a cozedura pelo teste de compressão do miolo (Método 74-09, AACC, 2001). Para tal, um texturômetro TA.XT.plus (Stable Micro Systems, UK), equipado com uma célula de carga de 5 kg e uma sonda cilíndrica de 36 mm de diâmetro foi utilizado. Os pães foram cortados em fatias com uma altura de 25 mm, e em seguida, a textura do pão foi determinada no modo de início e retorno. Os parâmetros utilizados foram velocidade de pré-teste: 1 mm/s, velocidade do teste: 1,7 mm/s, velocidade de pós-teste: 10 mm/s. As fatias de pães a serem analisadas foram ajustadas no equipamento. A força de contato foi ajustada para 5 g e a distância de retorno para 30 mm. A sonda cilíndrica foi usada para comprimir a amostra em 40% da sua altura original. A análise foi efetuada após recolha de dados pelo software de análise de texturas *Exponent Connect Lite* conectado ao texturômetro.

4.6. Análise estatística

Para cada análise com a amostra seca e respetivo extrato hidroetanólico, todos os ensaios foram realizados em triplicado, sendo que os resultados foram expressos como valores médios e desvio padrão (DP). As diferenças significativas entre amostras foram analisadas através da análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste HSD de Tukey com $p = 0,05$ utilizando o IBM SPSS Statistics for Windows, Versão 23.0. (IBM Corp., Armonk, Nova York, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO



5. Resultados e Discussão

5.1. Análise granulométrica e índice de absorção de água das farinhas de PANC

Os resultados referentes à granulometria das partículas das três farinhas obtidas a partir de sementes de níger, painço e alpiste estão descritos na **Tabela 4**. De acordo com Silva et al. (2009), o estudo granulométrico das farinhas usadas para panificação é dos pontos mais relevantes nas propriedades físicas das mesmas, uma vez que o tamanho das partículas constituintes da farinha interferirá em diversos parâmetros de qualidade, tais como no índice de absorção de água e, por consequência, na textura, na qualidade sensorial, e no aspecto visual do pão.

Tabela 4. Granulometria e índice de absorção de água (IAA) das farinhas de PANC.

Malha	Abertura (mm)	% Retido		
		Níger	Painço	Alpiste
20	0,850	24,36	17,17	7,90
30	0,600	34,73	19,94	19,37
35	0,500	31,84	30,85	45,88
50	0,300	7,84	16,14	10,25
60	0,250	0,40	2,15	1,99
100	0,150	0,14	10,22	12,98
Fundo	<0,150	0,70	3,54	1,63
IAA (%)		61,63	53,77	52,24

Foi possível observar que a maior percentagem de massa de farinha de níger ficou retida na peneira de malha 30, 34,73%, enquanto que para as farinhas elaboradas com sementes de painço e de alpiste a maior porcentagem de massa retida ficou na peneira de malha 35, 30,85% e 45,88% respectivamente. Clerice e El-Dash (2008) realizaram um estudo semelhante com farinha integral produzida a partir de grãos de arroz, no qual apresentou 63% de retenção em malha 60 e 80, e 37% em malha acima de 100. Em comparação com o presente trabalho, as farinhas de PANC tiveram uma grande percentagem de retenção em malhas de maior abertura (níger, painço e alpiste apresentaram respectivamente 91%, 68% e 73% de retenção entre as malhas de 20 e 35), o que significa que as partículas obtidas são de maior calibre quando comparadas com a farinha de arroz integral, mas ainda assim são designadas de sólidos finos. Estas

diferenças entre farinhas estão relacionadas com as características dos grãos, principalmente devido à sua resistência mecânica referentes as fibras alimentares (Zhang et al., 2018). Parâmetros como dureza do grão e preparação da matéria prima antes do processo de trituração podem interferir no tamanho das partículas da farinha (Greffeuille et al., 2007; Hrušková et al., 2006). É de ressaltar que o método utilizado para a trituração do grão também vai influenciar no diâmetro das partículas, tanto em relação ao equipamento utilizado como às condições adotadas (Marangoni, 2007).

Também foi aferido o índice de absorção de água (IAA) nas farinhas de PANC (**Tabela 4**), sendo que este índice indica a integridade dos grãos de amido e a capacidade dos mesmos de absorverem água quando gelatinizados. Nas amostras em estudo este índice foi de 61,63%, 53,77% e 52,24% para níger, painço e alpiste, respectivamente. Pode também ser observado que existe uma relação entre o IAA e o tamanho das partículas, no qual o IAA diminui em tamanhos de partículas menores. A semente de níger que apresentou maior granulometria, como descrito anteriormente, apresentou também o maior índice de absorção de água. Comparativamente com a farinha de trigo, convencionalmente usada para a preparação de produtos de panificação, os valores obtidos são um pouco mais baixos, tendo sido descritos índices de absorção de água de aproximadamente 77% (Manupriya et al., 2020). Teoricamente, os valores obtidos para a amostra de níger são favoráveis, uma vez que de acordo com o Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), as farinhas que apresentem valores de absorção de água menores que 55% não são as mais indicadas para a panificação, mas sim para a preparação de biscoitos ou em misturas com outras farinhas (menor atividade de água). Com baixos IAA as farinhas têm pouca capacidade de absorção e conseqüentemente, de dissolução dos ingredientes e de união das partículas ao glúten (molécula necessária para a estrutura do pão). Ainda, as farinhas que possuem um elevado teor de fibras dietéticas podem aumentar o índice de absorção de água e por conseguinte, estes dois aspectos juntos alteram de forma negativa o desenvolvimento de pães (Zhang et al., 2018). As sementes de painço e alpiste necessitariam por isso de serem misturadas com outras farinhas para um desenvolvimento melhor de produtos de panificação.

5.2. Perfil nutricional de farinhas de sementes de níger, painço e alpiste

Os resultados do perfil nutricional das sementes de níger, painço e alpiste estão apresentados na **Tabela 5**. Como era expectável, todas as amostras de semente em estudo apresentaram níveis muito baixos de humidade, $11,3 \pm 0,4$ g/100 g ps na amostra de alpiste, $10,9 \pm 0,5$ g/100 g ps na amostra de painço e $6,9 \pm 0,2$ g/100 g ps na amostra de níger. Os hidratos de carbono foram identificados como o macronutriente maioritário para as amostras de painço ($76,5 \pm 0,3$ g/100 g ps) e alpiste ($64,9 \pm 0,3$ g/100 g ps), seguido pelas proteínas, $16,60 \pm 0,04$ e $22,5 \pm 0,4$ g/100 g ps, respetivamente. No entanto, para as sementes de níger, não foi verificado o mesmo perfil, apresentando as gorduras totais como os compostos maioritários em termos de valor nutricional ($37,5 \pm 0,1$ g/100 g ps), seguido pelos hidratos de carbono ($36,5 \pm 0,3$ g/100 g ps) e proteínas ($22,9 \pm 0,3$ g/100 g ps). Em consequência deste elevado conteúdo em gordura total, foi também na amostra de sementes de níger que se obteve o maior valor energético (575 ± 1 kcal/100 g ps). Esta grande diferença das sementes de níger está de acordo com os autores que reportam que as sementes de níger são das principais oleaginosas de grande importância comercial, com um elevado conteúdo em gordura (Bhagya & Sastry, 2003; Ramadan & Mörsel, 2003; Getinet & Sharma, 1996) e com uma percentagem de proteína cerca de 30% do conteúdo em macronutrientes (Bhagya & Sastry, 2003). As cinzas tiveram baixa representatividade em todas as amostras estudadas.

Tabela 5. Valor nutricional das sementes de níger, painço e alpiste (MD \pm DP).

	Níger	Painço	Alpiste
Humidade (g/100 g ps)	$6,9 \pm 0,2^b$	$10,9 \pm 0,5^a$	$11,3 \pm 0,4^a$
Gordura total (g/100 g ps)	$37,5 \pm 0,1^a$	$4,3 \pm 0,1^c$	$6,9 \pm 0,3^b$
Proteína (g/100 g ps)	$22,9 \pm 0,3^a$	$16,60 \pm 0,04^b$	$22,5 \pm 0,4^a$
Cinzas (g/100 g ps)	$3,2 \pm 0,2^b$	$2,6 \pm 0,4^c$	$5,7 \pm 0,3^a$
Hidratos de carbono (g/100 g ps)	$36,5 \pm 0,3^c$	$76,5 \pm 0,3^a$	$64,9 \pm 0,3^b$
Valor energético (kcal/100 g ps)	575 ± 1^a	411 ± 1^b	412 ± 2^b

ps- peso seco; em cada linha letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,005$).

Os teores de humidade das três amostras analisadas revelaram-se menores ao valor máximo permitido pela legislação vigente em Portugal (DRE, 2003), que é de cerca de 14,5%. Este parâmetro é considerado um dos principais responsáveis pelas alterações

nas características nutricionais, organolépticas, físicas e microbiológicas das farinhas, sendo um fator de aceleração de reações químicas (Costa et al., 2008). É por isso relevante para conservação das farinhas e tempo de prateleira estimado do produto final.

Em estudos anteriores com sementes de alpiste, realizado por Batista et al. (2020), os resultados relativamente ao seu valor nutricional foram concordantes com os apresentados neste trabalho, apresentando os hidratos de carbono como os principais macronutrientes ($65,99 \pm 0,2\%$) e cinzas com a menor representatividade ($6,31 \pm 0,13\%$). Aal et al. (2011) apresentou níveis concordantes para as proteínas (22,7 g/100 g ps) em duas cultivares de sementes de alpiste, com pêlo e sem pêlo. O mesmo autor, faz também uma comparação com sementes de trigo, onde os teores de proteínas e cinzas são menores do que os obtidos neste estudo, mas maiores relativamente aos teores de gordura.

Relativamente às amostras de painço, Saleh et al. (2013), no seu artigo de revisão sobre a qualidade nutricional do painço, seu processamento e potenciais benefícios para a saúde, revela níveis de hidratos de carbono, gorduras, proteínas e energia (63,8 g; 3,5 g; 12,5 g; 364 kcal /100 g, respetivamente) menores do que as obtidas no presente estudo. No entanto, o macronutriente maioritário foram também os hidratos de carbono, seguidos das proteínas. O teor em cinzas apresentou-se em menor quantidade.

Finalmente, Bhagya & Sastry (2003) descreveu teores de composição nutricional de sementes de níger, muito semelhantes às aqui descritas, nomeadamente no teor, proteína (24,0 g/100 g ps) e cinzas (3,1 g/100 g ps). Fatima et al. (2015), no seu estudo com duas espécies de níger (uma importada e outra cultivada no EUA) revelou teores de gordura semelhantes às aqui descritas, no entanto distintos entre as cultivares (36,5 - 38,2 g/100 g ps) os quais demonstram a diferença obtida em análises feitas com diferentes espécies.

5.3. Perfil em açúcares, ácidos orgânicos, ácidos gordos e tocoferóis

Os resultados da composição em açúcares livres e ácidos orgânicos das sementes de níger, painço e alpiste estão presentes na **Tabela 6**. Os açúcares interferem em diversos processos durante o ciclo de vida das plantas, armazenando sobretudo energia para auxiliar na sintetização de outros compostos orgânicos (Shah et al., 2019). Em relação ao perfil em açúcares livres, foi apenas identificado um dissacarídeo (sacarose) nas três amostras, sendo a amostra de níger a que revelou maior conteúdo, $1,90 \pm 0,01$ g/100 g ps.

Nos estudos realizados por Ramadan & Mörsel (2003) com semente de níger, identificaram apenas a glicose como açúcar, estando o seu teor altamente dependente do genótipo e tempo de germinação da semente (Ceccaroni et al., 2020). A semente de alpiste apresentou um teor para a sacarose de $0,54 \pm 0,01$ g/100 g ps, valor menor do que o descrito por Aal et al. (1997), no qual revela outros açúcares solúveis como a frutose e glicose, estando a sacarose como açúcar maioritário. A semente de painço revelou o menor teor de açúcar ($0,37 \pm 0,01$ g/100 g ps), no entanto a sua presença já tinha sido descrita por outros autores (Ceccaroni et al., 2020).

Tabela 6. Composição de açúcares livres e ácidos orgânicos das sementes das sementes de níger, painço e alpiste (MD \pm DP).

Açúcares Livres (g/100 g ps)	Níger	Painço	Alpiste
Sacarose	$1,90 \pm 0,01^a$	$0,37 \pm 0,01^c$	$0,54 \pm 0,01^b$
Ácidos Orgânicos (g/100 g ps)			
Oxálico	$0,324 \pm 0,003^b$	$0,32 \pm 0,01^b$	$0,35 \pm 0,02^a$
Quínico	$0,050 \pm 0,003^c$	$2,4 \pm 0,1^b$	$2,70 \pm 0,03^a$
Chiquímico	$1,04 \pm 0,04$	nd	nd
Fumárico	$0,0010 \pm 0,0001$	vg	nd
Total	$1,41 \pm 0,05^c$	$2,7 \pm 0,2^{a,b}$	$3,0 \pm 0,1^a$

ps – peso seco; nd – não detetado; vg- quantidades vestigiais; Curvas de calibração para ácidos orgânicos: Ácido oxálico ($y = 9 \times 10^6 x + 45973$, $R^2 = 0,9901$, LOD = 6,3 $\mu\text{g/mL}$; LOQ = 20,8 $\mu\text{g/mL}$); Ácido quínico ($y = 610607x + 46061$, $R^2 = 0,9995$, LOD = 11,3 $\mu\text{g/mL}$; LOQ = 37,6 $\mu\text{g/mL}$); ácido chiquímico ($y = 7 \times 10^7 x + 175156$, $R^2 = 0,9999$, LOD = 10,2 $\mu\text{g/mL}$; LOQ = 56,5 $\mu\text{g/mL}$); e ácido fumárico ($y = 154862x + 1 \times 10^6$, $R^2 = 0,9977$, LOD = 42,5 $\mu\text{g/mL}$; LOQ = 141,7 $\mu\text{g/mL}$). Em cada linha letras diferentes significam diferenças significativas entre espécies ($p < 0,05$).

A par dos açúcares, também os ácidos orgânicos desempenham funções muito importantes no metabolismo das plantas, tanto como produtos intermediários ou finais, como parte importante das interações microbianas e produção de energia (Chahardoli et al., 2020), para além de contribuírem para as características organolépticas como sabor e aroma devido aos seus grupos ácidos (Vallarino & Osorio, 2019). Foram identificados no total quatro ácidos orgânicos, nomeadamente, quínico, oxálico, chiquímico e fumárico. Foi apenas na amostra de sementes de níger que se observaram os quatro compostos, no entanto foi a amostra que revelou menor quantidade em ácidos orgânicos totais ($1,41 \pm 0,05$ g/100 g ps). As amostras de painço e alpiste revelaram teores muito semelhantes em ácidos orgânicos totais (apesar das diferenças estatísticas significativas), $2,7 \pm 0,2$ e $3,0 \pm 0,1$ g/100 g ps, respetivamente, sobretudo devido à presença de ácido quínico, $2,4 \pm 0,1$

e $2,70 \pm 0,03$ g/100 g ps, respectivamente, que representou mais de 89% do total. O ácido quínico tem sido descrito como tendo muitas propriedades benéficas para a saúde do consumidor, entre as quais, efeitos anti-inflamatório e antioxidante (Jang et al., 2017), o que revela a importância do uso destas sementes na indústria alimentar e na sua aplicação em novos produtos que vão de encontro às preocupações do consumidor.

Na **Tabela 7** estão descritos o perfil em ácidos gordos e tocoferóis (compostos mais lipossolúveis, correspondendo à fração lipídica das amostras) das sementes de níger, painço e alpiste. No geral, entre as três amostras, foram identificados 13 ácidos gordos. Como foi dito anteriormente, a semente de níger é das oleaginosas mais importantes em todo o mundo a nível comercial devido ao seu alto conteúdo em óleo e os efeitos benéficos a ele associado, e neste estudo pudemos verificar precisamente essa tendência, revelando não só o mais alto teor em gordura total, mas também o mais alto teor em ácidos gordos polinsaturados (PUFA), com $78,1 \pm 0,7\%$ relativa. Esta alta percentagem de PUFA deve-se sobretudo à presença de ácido linoleico (C18:2n6c, $78,1 \pm 0,7\%$), seguido de ácido palmítico (C16:0; $12,1 \pm 1,4\%$) e ácido esteárico (C18:0; $9,74 \pm 1,4\%$). De ressaltar que nas amostras de níger foram identificados somente 4 ácidos gordos. Nas amostras de painço, os valores ficaram divididos entre o conteúdo em ácidos gordos saturados (SFA) e monoinsaturados (MUFA), $44,97 \pm 1,01$ e $44,4 \pm 0,8\%$, respectivamente, sobretudo devido à presença de ácido oleico (C18:1n9c, $44,4 \pm 0,7\%$), e em seguida de ácido palmítico (C16:0; $26,1 \pm 0,4\%$), ácido linoleico (C18:2n6c; $10,6 \pm 0,3\%$), ácido heptadecanoico (C17:0; $10,4 \pm 0,6\%$) e ácido esteárico (C18:0; $5,4 \pm 0,2\%$). A amostra de alpiste, foi aquela que, infelizmente, revelou maiores teores em ácidos gordos saturados ($52,48 \pm 0,02\%$), e em seguida de MUFA ($46,1 \pm 0,1\%$), no entanto é um MUFA que surge como o composto maioritário, o ácido oleico (C18:1n9c, $45,59 \pm 0,11\%$), precedido de dois SFA's com concentrações significativas, ácido palmítico (C16:0, $34,51 \pm 0,13\%$) e ácido heptadecanoico (C17:0, $9,6 \pm 0,1\%$), que elevam a concentração deste tipo de moléculas na amostra. Os outros ácidos gordos identificados nas três amostras revelaram concentrações particularmente baixas, abaixo dos 5%.

A amostra de níger, mesmo sendo a amostra com a menor quantidade de ácidos gordos encontrados, foi a que se destacou entre as três amostras estudadas. Os ácidos gordos polinsaturados são compostos essenciais para a saúde humana, por desempenharem funções significativas como neurogênese e memória, mas também no desenvolvimento e manutenção da estrutura cerebral durante o estágio embrionário e

adultos (Khan & He, 2017). De acordo com alguns estudos, a ingestão insuficiente de ácidos gordos polinsaturados está diretamente relacionada com uma maior possibilidade de aparecimento de doenças cardiovasculares, cerebrais, inflamatórias e até mesmo cancro (Kraic et al., 2018). Por isso, a fração lipídica da semente de níger apresenta-se nutricionalmente valiosa, como já tinha sido referido.

Tabela 7. Composição em ácidos gordos (%) e tocoferóis das sementes de níger, painço e alpiste (MD ± DP).

	Níger	Painço	Alpiste
Ácido caprónico (C6:0)*	nd	1,7 ± 0,2	1,18 ± 0,03
Ácido caprílico (C8:0)*	nd	0,96 ± 0,03	0,82 ± 0,04
Ácido cáprico (C10:0)	nd	nd	0,11 ± 0,01
Ácido hendecanóico (C11:0)*	nd	0,23 ± 0,02	0,19 ± 0,01
Ácido tridecanóico (C13:0)	nd	nd	0,055 ± 0,001
Ácido mirístico (C14:0)*	nd	0,19 ± 0,01	0,515 ± 0,002
Ácido pentadecílico (C15:0)	nd	nd	0,145 ± 0,01
Ácido palmítico (C16:0)	12,1 ± 1,4 ^c	26,1 ± 0,4 ^b	34,51 ± 0,13 ^a
Ácido margárico (C17:0)*	nd	10,4 ± 0,6	9,6 ± 0,1
Ácido esteárico (C18:0)	9,7 ± 1,4 ^b	5,4 ± 0,2 ^a	5,3 ± 0,2 ^a
Ácido oleico (C18:1n9)*	nd	44,4 ± 0,7	45,59 ± 0,11
Ácido linoleico (C18:2n6)	78,1 ± 0,7 ^a	10,6 ± 0,3 ^b	1,45 ± 0,13 ^c
Ácido cis-11-Eicosenóico (C20:1)	nd	nd	0,478 ± 0,002
SFA	21,8 ± 1,4^c	44,97 ± 1,01^b	52,48 ± 0,02^a
MUFA*	nd	44,4 ± 0,8	46,1 ± 0,1
PUFA	78,1 ± 0,7^a	10,6 ± 0,3^b	1,45 ± 0,13^c
Tocoferóis (mg/100 g ps)			
α-Tocoferol	93,18 ± 0,18 ^a	0,12 ± 0,01 ^b	0,08 ± 0,01 ^c
β-Tocoferol	1,06 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,01 ^c	0,52 ± 0,01 ^b
γ-Tocoferol	1,15 ± 0,29 ^b	3,00 ± 0,03 ^a	0,12 ± 0,01 ^c
δ-Tocoferol	0,70 ± 0,14 ^a	0,67 ± 0,03 ^a	0,19 ± 0,19 ^b
Total	96,09 ± 0,33^a	3,85 ± 0,04^b	0,91 ± 0,01^c

ps – peso seco; nd – não detetado; SFA – *saturated fatty acids* (ácidos gordos saturados); MUFA – *monounsaturated fatty acids* (ácidos gordos monoinsaturados); PUFA – *polyunsaturated fatty acids* (ácidos gordos polinsaturados). Em cada linha letras diferentes significam diferenças significativas entre espécies ($p < 0,05$). *valor de $p > 0,001$ pelo teste de t-student.

Estudos anteriores também evidenciaram os ácidos linoleico, palmítico e esteárico, como os ácidos maioritários em sementes de níger (Fatima et al., 2015; Sarin et al., 2009). Já para as sementes de painço, a literatura cita o ácido linoleico como o ácido em maior quantidade, seguido dos ácidos oleico e palmítico, (Kalinová, 2007). Em estudos realizados com a semente de alpiste, também foram identificados os ácidos oleico

e palmítico como os compostos maioritários, entretanto, para além desses dois a literatura também cita como principal ácido gordo o ácido linoleico (Aal et al., 2020; Salah et al., 2018). As diferenças encontradas a nível de perfil em ácidos gordos com a literatura, poderá ser devido à diferença geográfica das amostras estudadas, variedade, processamento e armazenamento das amostras, mas também ao grau de maturação das mesmas.

Todas as isoformas de tocoferóis (α , β , γ e δ) foram detetadas nas sementes de níger, alpiste e painço. Novamente, as sementes de níger, foram as que revelaram maiores teores de tocoferóis ($96,09 \pm 0,33$ mg/100 g ps), sobretudo devido à presença de α -tocoferol ($93,18 \pm 0,18$ mg/100 g ps), seguida de γ -tocoferol, β - e δ -tocoferol, que totalizaram uma concentração de 2,91 mg/100 g ps. Na amostra de painço, a molécula de γ -tocoferol foi a mais abundante ($3,00 \pm 0,03$ mg/100 g ps). Já para a amostra de alpiste, a isoforma de β -tocoferol foi a molécula em maior quantidade ($0,52 \pm 0,01$ mg/100 g ps).

O elevado teor em tocoferóis encontrado nas amostras de níger é confirmado pelo descrito por Mariod et al. (2017), que descreve aproximadamente 90% da composição total em tocoferóis devido à presença da isoforma α -tocoferol. Existem poucos estudos na literatura sobre o perfil de tocoferóis nas amostras de semente de níger inteiras. No entanto, num estudo com o óleo da semente, realizado por Marini et al. (2003), o valor transformado para mg/100 g variou entre os 76,2 a 82,3 mg/100 g que, comparado com a semente inteira é menor do que o aqui descrito. Entretanto, Ramadan & Mörsel (2004) descrevem valores superiores para o teor de β , γ e δ -tocoferol na fração lipídica da semente de níger (33,1; 57,0; e 18,5 mg/100 g, respetivamente) e valor inferior de α -tocoferol (86,1 mg/100 g). As sementes de painço também apresentaram um conteúdo considerável em tocoferóis. Em estudos anteriores realizados com o óleo de outra variedade de painço foi descrito um maior conteúdo em γ -tocoferol (48,79 mg/100 g óleo) (Liang et al., 2010). Algumas diferenças de valores são justificadas pelos diferentes métodos de extração e diferentes partes da planta analisada, bem como pelo facto de que os tocoferóis são facilmente oxidáveis pela ação de alguns fatores, como por exemplo, o calor e presença de luz e humidade (Bhavsar et al., 2017).

A vitamina E, como dito anteriormente, possui quatro tipos de isoformas (α - alfa, β - beta, γ - gama e δ - delta). Está abundantemente descrito que a isoforma α é responsável por 50% da ação antioxidante atribuída a estas biomoléculas, enquanto que, a isoforma β possui entre 25-50% e as isoformas γ e δ ronda os 10-35% (Ramadan et al.,

2013). Desta forma, sendo a isoforma α -tocoferol a mais ativa biologicamente, o corpo humano tem maior necessidade de obtê-la através da dieta. Desta forma, a vitamina E é importante por ser eficiente na prevenção de doenças além de se mostrar como composto com potencial antiinflamatório e potenciador imunológico (Azzi, 2018). Pode-se por isso observar que as sementes estudadas, principalmente as sementes de níger, são importantes fontes deste tipo de compostos bioativos.

5.4. Avaliação das propriedades bioativas

5.4.1. Atividade antioxidante

Os antioxidantes são compostos que inibem ou previnem o stresse oxidativo, através de mecanismos como inibição da peroxidação lipídica e eliminação de radicais livres, dependendo do agente oxidativo (Carocho et al., 2014). Há diversos métodos *in vitro* com o objetivo de identificar a capacidade antioxidante de uma amostra. Neste trabalho propôs-se a avaliação das propriedades antioxidantes *in vitro* por inibição da peroxidação lipídica em tecidos cerebrais de porco através da formação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e inibição da hemólise oxidativa em eritrócitos isolados do sangue de ovelha (OxHLIA). Os resultados dos ensaios de atividade antioxidante estão apresentados na **Tabela 8** e são expressos em IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$). Nos resultados descritos, encontra-se a concentração do extrato hidroetanólico necessário para inibir 50% da peroxidação lipídica no tecido lipídico do cérebro de porco e para proteger 50% da população de eritrócitos (provenientes de sangue de ovelha) da ação hemolítica causada pelo agente oxidante. Assim, quanto menor a concentração de IC_{50} , maior a capacidade de inibição da formação de TBARS e maior a ação anti-hemolítica e das amostras.

Os três extratos hidroetanólicos testados revelaram capacidade antioxidante para o ensaio de TBARS. Todas as amostras apresentaram elevada atividade no ensaio com diferenças significativas entre si. A amostra de alpiste foi a que revelou melhor capacidade com um IC_{50} de $0,092 \pm 0,002 \mu\text{g/mL}$, seguida de painço com IC_{50} de $0,187 \pm 0,001 \mu\text{g/mL}$ e níger com IC_{50} de $2,31 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$. Todas as amostras testadas apresentaram um IC_{50} inferior ao apresentado pelo padrão utilizado neste ensaio (Trolox;

3,73 ± 1,9 µg/mL), indicando que essas sementes são fontes promissoras de compostos com capacidade para inibir a peroxidação lipídica. No ensaio de OxHLIA, amostra de painço não revelou atividade. Enquanto a amostra de níger e alpiste apresentaram alguma atividade antioxidante com um IC₅₀ de 81 ± 5 e 488 ± 0,2 µg/mL, respetivamente. No entanto, comparativamente com o controlo positivo (Trolox; 21,8 µg/mL) as duas amostras apresentaram baixa capacidade anti-hemolítica.

Tabela 8. Atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos das sementes de níger, painço e alpiste (MD ± DP).

	Níger	Painço	Alpiste	Trolox
Atividade antioxidante (IC ₅₀ , µg/mL)				
TBARS	2,31 ± 0,03 ^a	0,187 ± 0,001 ^b	0,092 ± 0,002 ^c	3,73 ± 1,9
OxHLIA	81 ± 5*	sa	488 ± 0,2*	21,8 ± 0,2

sa – sem atividade. Os valores de IC₅₀ correspondem à concentração do extrato que atinge 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância na redução do ensaio de potência. Em cada linha letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,005$). *valor de $p > 0,001$ pelo teste de t-student.

Poucos são os estudos realizados em relação a atividade antioxidante destas sementes. Há trabalhos descritos na literatura com outras partes e/ou extratos destas plantas, como por exemplo, com as frações proteicas, leite e óleo extraído das sementes e com outros tipos de ensaios, como por exemplo DPPH (Salah et al., 2018; Valverde et al., 2017). Além das técnicas celulares para a análise da atividade antioxidante, também se podem realizar testes químicos para avaliar esta atividade. O ensaio da atividade captadora de radicais DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, baseia-se na descoloração do radical estável (DPPH) de cor violeta pela redução ocasionada por compostos antioxidantes (dadores de um átomo de hidrogénio) à hidrazina, composto de coloração amarela (Musa et al., 2016). Valverde et al. (2017) descreveu as frações proteicas e o potencial nutracêutico do leite de sementes de alpiste. Através de ensaios como o DPPH, a fração de peptídeos revelou alta atividade antioxidante. Num outro estudo (Salah et al., 2018), onde foi analisada a parte lipídica da semente de alpiste, é relatado que o óleo pode ser usado como um agente antioxidante natural. As propriedades presentes na fração lipídica podem contribuir para minimização do risco de doenças cardiovasculares e cancro. A amostra de painço, apesar de não ter revelado atividade para o ensaio de OxHLIA, apresenta-se como uma semente com bastante potencial, tendo Park et al. (2020) descrito atividade antioxidante nas sementes pelo ensaio do DPPH. Da mesma

forma, conforme abordado por Fatima et al. (2015), o uso das sementes de níger também apresentam um uso auspicioso, por terem a capacidade de ser uma fonte de antioxidantes para consumo na dieta humana.

5.4.2. Atividade antimicrobiana

Muitos estudos tem sido realizados nos últimos anos com a intenção de identificar e explorar agentes antimicrobianos para combater a resistência microbiana a antibióticos químicos de largo espectro. Desta forma, os extratos hidroetanólicos de níger, painço e alpiste, foram submetidas à análise da atividade antimicrobiana em doze estirpes no total, com a finalidade de encontrar a concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB). As bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*, assim como as bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Enterobacter cloacae* e os fungos *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma viride* e *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* foram utilizados a fim de determinar a potencial atividade antibacteriana e antifúngica. Os valores referentes as concentrações encontradas, estão descritos na **Tabela 9** e estão expressos em mg/mL. A atividade antimicrobiana associada a cada uma das amostras é maior quanto menor for o valor da concentração mínima inibitória (CMI).

De modo geral, as três amostras apresentaram valores baixos de concentração mínima inibitória tanto para atividade antibacteriana como para antifúngica. Revelando por isso, potencial contra todas as estirpes bacterianas e fúngicas testadas. A amostra de painço foi a que mais se destacou na atividade antibacteriana, contra as bactérias *B. cereus* e *E. coli* (0,75 mg/mL), e *L. monocytogenes* e *E. cloacae* (1,5 mg/mL). Na atividade antifúngica, não houve nenhuma amostra que mais se destacasse, no entanto, os extratos hidroetanólicos de níger e painço revelaram valores semelhante de CMI para todas as estirpes fúngicas. De ressaltar que os resultados obtidos para a atividade antifúngica nos extratos hidroetanólicos de níger e painço foram menores quando comparados com os controlos positivos utilizados (E211 e E224). Estes resultados são de extrema importância, pois as estirpes fúngicas em causa são as principais causadoras de deterioração microbiana em produtos de panificação (Nionelli et al., 2020) e por isso a introdução destas farinhas de semente, para além de adicionar valor, funcionaria também

como aditivo conservante do próprio produto final. Outras culturas de plantas da família Poaceae, como o arroz, milho e sorgo já são conhecidas por possuírem uma boa atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos, devido à sua composição em fitoalexinas, compostos com elevada capacidade conservante (Ejike et al., 2013), podendo este estudo ser indicador da necessidade da introdução destas farinhas na indústria alimentar, mais concretamente, na panificação.

Tabela 9. Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos hidroetanólicos das sementes de níger, painço e alpiste (mg/mL).

Atividade antibacteriana (mg/mL)	Níger		Painço		Alpiste		E211		E224	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Bactérias Gram-positivas										
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	6	3	6	3	6	4	4	1	1
<i>Bacillus cereus</i>	1,5	3	0,75	1,5	1,5	3	0,5	0,5	2	4
<i>Listeria monocytogenes</i>	3	6	1,5	3	3	6	1	2	0,5	1
Bactérias Gram-negativas										
<i>Escherichia coli</i>	1,5	3	0,75	1,5	1,5	3	1	2	0,5	1
<i>Salmonella typhimurium</i>	1,5	3	1,5	3	1,5	3	1	2	1	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	6	1,5	3	3	6	2	4	0,5	0,5
Atividade antifúngica (mg/mL)	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,75	1,5	0,75	1,5	0,75	1,5	1	2	1	1
<i>Aspergillus niger</i>	0,75	1,5	0,75	1,5	1,5	3	1	2	1	1
<i>Aspergillus versicolor</i>	0,75	1,5	0,38	0,75	0,75	1,5	2	2	1	1
<i>Penicillium funiculosum</i>	0,75	1,5	0,75	1,5	0,75	1,5	1	2	0,5	0,5
<i>Penicillium verrucosum var. cyclopium</i>	0,38	0,75	0,75	1,5	0,75	1,5	2	4	1	1
<i>Trichoderma viride</i>	0,75	1,5	1,5	3	0,75	1,5	1	2	0,5	0,5

CMI - concentração mínima inibitória; CMB - concentração mínima bactericida; CMF - concentração mínima fungicida; Controlos positivos: E211 (benzoato de sódio) e E224 (metabissulfito de potássio).

5.4.3. Hepatotoxicidade

Os resultados obtidos no ensaio de hepatotoxicidade não estão presentes em tabela, pois todos os extratos hidroetanólicos estudados não apresentaram atividade até à concentração máxima testada (400 µg/mL). Significando isto, que as sementes de níger, painço e alpiste não foram tóxicas contra a linha celular não tumoral estudada, sendo um resultado muito importante numa primeira validação destas farinhas para incorporação em matrizes alimentares sem que tal acarrete riscos para a saúde do consumidor.

5.4.4. Determinação do perfil fenólico

Os dados cromatográficos (tempo de retenção – Tr, λ_{\max} na região do visível, ião molecular e principais fragmentos MS²), tentativa de identificação e quantificação (mg/g de extrato) obtidos por HPLC-DAD-ESI/MS das amostras de níger e alpiste estão descritos na **Tabela 10**. O extrato hidroetanólico de painço não revelou nenhum composto fenólico à máxima concentração testada de 50 mg/mL. As duas amostras de sementes apresentaram um perfil em compostos fenólicos completamente distintos, sendo que na amostra de alpiste as quantidades de fenólicos encontradas foram somente vestigiais. Na amostra de níger 6 compostos fenólicos foram detetados, todos eles derivados do ácido cafeico ligados a outro grupo ácido. Na amostra de alpiste, dos 4 compostos identificados, um foi um derivado do ácido cafeico e três derivados C-glicosilados de apigenina. A tentativa de identificação dos compostos **1g/2g** ([M-H]⁻ a *m/z* 353) e **4g/5g/6g** ([M-H]⁻ a *m/z* 515) como ácidos *O*-caffeoil e ácidos *O*-dicaffeoilquínicos, respetivamente, foi realizada segundo as chaves hierárquicas desenvolvidas por Clifford et al. (2003, 2005). O pico **5g** revelou ser o composto maioritário desta amostra com 8,2 ± 0,1 mg/g extrato. O pico **3g** ([M-H]⁻ a *m/z* 559), foi tentativamente identificado como 3,9-diCOA (ou 4,9-diCOA) - Ácido di-cafeoil-2,7-anidro-3-deoxi-2-octulopiranosónico, tendo por base o previamente descrito por Zhang et al. (2007) em *Erigeron breviscapus* (Vaniot) Hand.-Mazz.

Tabela 10. Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do visível (λ_{max}), dados de espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação (mg/g extrato) de compostos fenólicos dos extratos hidroetanólicos das sementes de níger e alpiste (MD \pm DP).

Pico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação
<i>Níger</i>						
1g	6,7	326	353	191(100),179(7),173(5),135(5)	Ácido 3- <i>O</i> -Cafeoilquínico	5,87 \pm 0,01
2g	9,18	326	353	191(100),179(7),173(5),135(5)	Ácido 5- <i>O</i> -Cafeoilquínico	0,49 \pm 0,01
3g	15,02	326	559	515(4),455(2),397(100),379(2),335(9), 293(9),221(3),203(7),179(15)	3,9-diCOA (ou 4,9-diCOA) Ácido di-cafeoil- 2,7-anidro-3-deoxi-2-octulopiranosônico	2,69 \pm 0,04
4g	18,46	324	515	353(43),191(39),179(70),173(100),135(11)	Ácido 1,3- <i>O</i> -diCafeoilquínico	1,36 \pm 0,04
5g	19,79	327	515	353(21),191(100),179(44),173(9),161(5),135(15)	Ácido 3,4- <i>O</i> -diCafeoilquínico	8,2 \pm 0,1
6g	22,77	327	515	353(17),191(39),179(65),173(100),161(5),135(5)	Ácido 4,5- <i>O</i> -diCafeoilquínico	5,1 \pm 0,06
Total						23,79 \pm 0,02
<i>Alpiste</i>						
1p	4,26	314	341	179(100),161(10)	Hexósido do ácido caféico	vg
2p	15,56	340	563	443(9),413(100),311(5),293(55)	Apigenina- <i>C</i> -hexóxido- <i>O</i> -pentósido	vg
3p	16,01	340	563	443(8),413(100),311(6),293(49)	Apigenina- <i>C</i> -hexóxido- <i>O</i> -pentósido	vg
4p	17,71	335	431	341(20),311(100)	Apigenina- <i>C</i> -hexóxido	vg
Total						vg

vg – quantidades vestigiais. Curvas de calibração padrão: Ácido clorogénico ($y = 168823x - 161172$, $R^2 = 0,9999$, LOD = 0,20 $\mu\text{g/mL}$; LOQ = 0,68 $\mu\text{g/mL}$; picos 1g a 6g); Ácido caféico ($y = 388345x + 406369$, $R^2 = 0,9939$, LOD=0,78 $\mu\text{g/mL}$; LOQ = 1,97 $\mu\text{g/mL}$, pico 1p); Apigenina-6-*C*-glucósido ($y = 107025x + 61531$, $R^2 = 0,9989$; LOD = 0,19 $\mu\text{g/mL}$; LOQ = 0,63 $\mu\text{g/mL}$, picos 2p, 3p, e 4p).

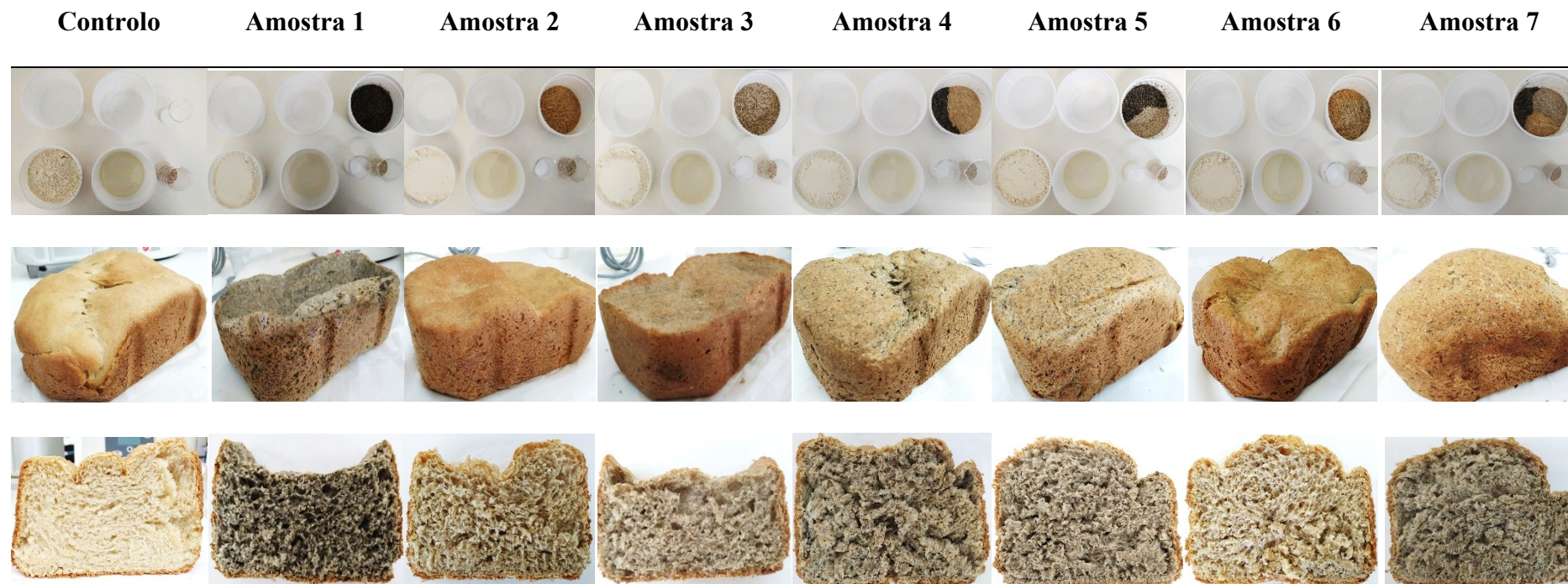
Relativamente à amostra de alpiste, o pico 1p foi tentativamente identificado como hexósido de ácido caféico, apresentando um ião pseudomolecular $[M-H]^-$ a m/z 341 e fragmentos MS^2 a m/z 179 e 161 (quebras características do ácido caféico), correspondendo à perda de uma hexoxe. Os derivados C-glicosilados de apigenina, apigenina-C-hexóxido-O-pentósido (**2p/3p**) e apigenina-C-hexóxido (**4p**), $[M-H]^-$ a m/z 563 e m/z 431, respetivamente, foram tentativamente identificados seguindo o previamente descrito por Ferreres et al. (2018).

5.5. Aplicação em pães

Seguindo a tendência atual de fortificação de pães, devido à necessidade de suprimir as deficiências em nutrientes disponíveis neste tipo de produto e também devido às preocupações dos consumidores de hoje (Benítez et al., 2018), nesta etapa do trabalho foram elaborados produtos de panificação com misturas de farinha de trigo refinada e farinhas de PANC. No total, foram elaborados 8 pães de acordo com o delineamento experimental utilizado, sendo um pão o controlo e os demais feitos com as substituições de 20% de farinha de trigo por farinhas de PANC. Na **Figura 11** estão apresentadas as fotos dos pães produzidos com 100% de farinha de trigo (controlo) e as substituições de 20% de farinha de trigo por: 20% de farinha de níger (amostra 1), 20% de farinha de painço (amostra 2), 20% de farinha de alpiste (amostra 3), 20% de farinha de níger e de painço (amostra 4), 20% de farinha de níger e alpiste (amostra 5), 20% de farinha de painço e alpiste (amostra 6) e 20% da farinha da mistura de níger, alpiste e painço (amostra 7).

Com o objetivo de comparar as oito formulações e visualizar as diferenças obtidas, realizou-se análises de cor: L^* , a^* e b^* , firmeza e volume específico.

Figura 11. Esquema dos ingredientes usados para a preparação dos pães, contendo diferentes percentagens de farinha de trigo e farinhas de sementes de alpiste, níger e painço e imagens dos produtos finais após cozedura.



Ingredientes - Controlo 1: Farinha de trigo, água, óleo, açúcar, sal e fermento biológico (BASE); Amostra 1: substituição de 20% farinha de níger + BASE; Amostra 2: substituição de 20% farinha de painço + BASE; Amostra 3: substituição de 20% farinha de alpiste + BASE; Amostra 4: substituição de 10% farinha de níger e 10% farinha de painço + BASE; Amostra 5: substituição de 10% farinha de níger e 10% farinha de alpiste + BASE; Amostra 6: substituição de 10% farinha de alpiste e 10% farinha de painço + BASE; Amostra 7: substituição de 6,6% farinha de níger, 6,6% farinha de painço e 6,7% farinha de alpiste + BASE.

5.5.1. Parâmetros de cor L^* , a^* e b^* , firmeza e volume específicos dos pães

Com a aplicação do delineamento experimental de misturas simplex-centroide, os modelos cúbicos especiais (**Figura 12**), são representados pelas equações 7, 8, 9, 10 e 11. Essas equações representam os parâmetros de firmeza (g), volume específico (cm^3/g) e cor L , a^* e b^* dos pães, respetivamente, e os coeficientes de determinação ajustados (R^2) para as equações foram de 0,969055, 0,978378, 0,992596, 0,808081, e 0,947157, respetivamente.

$$Y_{Firmeza} = 501,530x_1 + 201,713x_2 + 195,707x_3 - 251,647x_1x_2 - 412,223x_1x_3 + 104,667x_2x_3 - 588,290x_1x_2x_3 \quad (7)$$

$$Y_{Vol.esp} = 3,543x_1 + 3,990x_2 + 4,353x_3 + 1,373x_1x_2 + 2,713x_1x_3 - 0,020x_2x_3 + 4,480x_1x_2x_3 \quad (8)$$

$$Y_{L^*} = 45,617x_1 + 62,460x_2 + 64,620x_3 + 12,753x_1x_2 + 3,300x_1x_3 - 2,880x_2x_3 - 14,380x_1x_2x_3 \quad (9)$$

$$Y_{a^*} = -2,600x_1 - 3,043x_2 - 3,377x_3 - 2,700x_1x_2 - 0,700x_1x_3 - 1,200x_2x_3 + 0,210x_1x_2x_3 \quad (10)$$

$$Y_{b^*} = 14,367x_1 + 20,717x_2 + 21,843x_3 + 0,607x_1x_2 - 3,340x_1x_3 - 3,147x_2x_3 - 20,940x_1x_2x_3 \quad (11)$$

$$x_1 = 5 \text{ x [níger]}; x_2 = 5 \text{ x [painço]}; x_3 = 5 \text{ x [alpiste]}$$

Utilizou-se o modelo cúbico para a representação dos parâmetros físico dos pães analisados (**Figura 12**). Todos os pães elaborados apresentaram diferença significativas nos parâmetros físicos quando comparado com o pão controlo, à exceção do parâmetro de cor b^* . O volume específico dos pães variou de 3,54 a 4,63 cm^3/g , valores menores do que o pão controlo (5,22 cm^3/g). Há diversos parâmetros que influenciam na qualidade do pão, entre eles, o nível de crescimento do pão, que é um dos fatores mais importantes em relação à qualidade, pois está diretamente ligada a parâmetros como aparência, textura e sabor do pão (Chen et al., 2019). Os resultados do volume específico analisados nos pães, estão demonstrados na **Tabela 11**. Os valores encontrados mostram que a aplicação das farinhas de PANC influenciam no volume dos pães e no volume específico, o qual

foi menor que do pão controle em todas as amostras. O volume específico do pão controle foi de 5,22 cm³/g, e quando adicionada a farinha de PANC os valores decresceram. O pão com substituição parcial de 20% níger foi o mais afetado, o volume do pão diminuiu 32,2% em comparação ao pão controle. O pão com 20% de farinha de painço, foi o segundo mais afetado, com uma diminuição de 23,6% em relação a controle. E a amostra com substituição de 20% de farinha de alpiste teve uma diminuição menos drástica de 16,7%.

De acordo com Oliveira et al. (2008), um alto teor de fibras na farinha utilizada na produção de pães, poderá reduzir o volume do mesmo, devido ao aumento da absorção de água e menor tolerância à fermentação. Isto deve-se ao facto de que as fibras, devido à sua estrutura de forma alongada, afetam de forma negativa o aprisionamento dos gases que são produzidos durante a fermentação, os quais auxiliam no maior volume do pão (Vilhalva et al., 2011). Portanto, a diferença no volume no pão com 20% de farinha de níger, é devido as propriedades que afetam o volume do pão como fibras e o teor de absorção de água das sementes de níger serem relativamente altas (Bhagya & Sastry, 2003) e confirmadas no presente estudo (cerca de 64%). Nos estudos realizados por Chen et al. (2019), também foi observado uma diminuição grande de 43,7% no volume do pão quando substituído 20% de farinha de trigo por farinhas de PANC (cascas de manga), estando relacionado com o alto teor de fibras da farinha e alto poder hidrofílico. Alguns autores referem que a utilização de emulsificantes pode ajudar a estabilização da interface entre os gases e a massa e por isso não se perder volume específico quando farinhas de alto teor em fibra ou compostos lipofílicos são utilizadas (Tebben et al., 2018).

A análise de variância da regressão polinomial demonstrou que apenas a interação entre painço e alpiste (amostra 6) contribuíram significativamente para o volume específico. O pão desenvolvido com interação de níger e alpiste (amostra 5) foi o que apresentou melhor desempenho em relação a este parâmetro (**Figura 12A**). Quanto maior o volume específico, mais volume o pão terá em relação à sua massa, ou seja, mais alvéolos este pão terá. Este facto pode ser associado com a textura do pão, mas também com o potencial de incorporação de ar e características hidrofílicas da farinha os quais correlacionam ambos os fatores (Sciarini et al., 2010). Esta tendência pode ser observada nos resultados obtidos para firmeza dos pães (**Figura 12B**), onde o pão desenvolvido com 20% de níger (amostra 1) apresentou o menor valor de volume específico e o maior valor

para firmeza. Além da interação entre alpiste e painço (amostra 6), a interação entre os três componentes (amostra 7) também contribuiu significativamente para firmeza.

A análise dos parâmetros de cor (**Tabela 11**), nomeadamente L^* , a^* e b^* , são de todo relevantes, dado que estão diretamente associados à potencial aceitação de novos produtos por parte dos consumidores. Os parâmetros de cor dos pães podem estar relacionados com os ingredientes e as suas condições de processamento. Atividades como a reação de Maillard desenvolvem-se durante o processo, alterando a cor dos pães de acordo com o teor de açúcares, proteínas presentes e a temperatura de cozedura (Shen et al., 2018). Valores negativos de a^* indicam tendência ao verde, valores positivos de b^* indicam tendência ao amarelo e o L^* indica a luminosidade.

Quanto à luminosidade (L^*), verificou-se que todas as amostras se apresentaram menos brilhantes do que a amostra controlo. Os valores de L^* diminuíram conforme o aumento do vermelho e amarelo, tendo sido essa tendência confirmada por Protonotariou et al., (2015) no seu trabalho com farinha de trigo integral. A amostra 1, pão desenvolvido com farinha de níger, foi a que apresentou uma menor tendência à cor verde, com o maior valor de a^* e com menor tendência ao amarelo, com o menor valor de b^* , portanto, as formulações desenvolvidas com níger (amostras 1, 4, 5 e 7) tenderam a ter menos luminosidade. Os pães com substituição parcial por farinha de níger foram os que tiveram maior diferença em relação ao controlo, sobretudo no parâmetro L^* (luminosidade). As amostras 5 e 7 contribuíram significativamente para o parâmetro a^* , sendo que para o parâmetro b^* as interações nas amostras 4, 5, 6 e 7 foram significativas.

Este estudo permitiu perceber, com a substituição de 20% de farinha de trigo por farinha de PANC, as alterações provocadas nas características físicas e de cor dos pães desenvolvidos. No entanto, estudos futuros serão necessários para encontrar a formulação que tenha as características de firmeza, volume específico e de cor mais semelhantes aos pães elaborados com 100% de farinha de trigo, e que vão de encontro às preferências dos consumidores.

Tabela 11. Valores médios da firmeza do miolo (g), volume específico (cm³/g) e parâmetros de cor (*L**, *a** e *b**) para pães com diferentes proporções de farinhas de sementes de níger, painço e alpiste (MD ± DP).

Amostra	<i>L*</i>	<i>a*</i>	<i>b*</i>	Firmeza	Volume Específico
Controlo	70,66 ± 0,49 ^a	-5,44 ± 0,19 ^d	17,40 ± 0,59 ^c	101,05 ± 2,14 ^f	5,22 ± 0,15 ^a
1 (1, 0, 0)	45,62 ± 0,45 ^g	-2,60 ± 0,05 ^a	14,37 ± 0,18 ^c	501,53 ± 2,73 ^a	3,54 ± 0,09 ^f
2 (0, 1, 0)	62,46 ± 0,60 ^c	-3,04 ± 0,10 ^b	20,72 ± 0,44 ^b	201,71 ± 2,56 ^e	3,99 ± 0,04 ^e
3 (0, 0, 1)	64,62 ± 0,28 ^b	-3,38 ± 0,18 ^c	21,84 ± 0,51 ^a	195,71 ± 2,76 ^e	4,35 ± 0,01 ^c
4 (0,5, 0,5, 0)	57,23 ± 0,98 ^e	-3,50 ± 0,06 ^c	17,69 ± 0,65 ^c	288,71 ± 2,73 ^b	4,11 ± 0,05 ^d
5 (0,5, 0, 0,5)	55,94 ± 0,39 ^f	-3,16 ± 0,31 ^b	17,27 ± 1,04 ^c	245,56 ± 4,81 ^c	4,63 ± 0,04 ^b
6 (0, 0,5, 0,5)	62,82 ± 0,40 ^c	-3,51 ± 0,08 ^c	20,49 ± 0,22 ^b	224,88 ± 6,23 ^d	4,17 ± 0,07 ^d
7 (0,33, 0,33, 0,34)	58,50 ± 0,06 ^d	-3,51 ± 0,11 ^c	17,55 ± 0,52 ^c	215,73 ± 6,22 ^{d,e}	4,58 ± 0,02 ^b

Em cada coluna letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,005$).

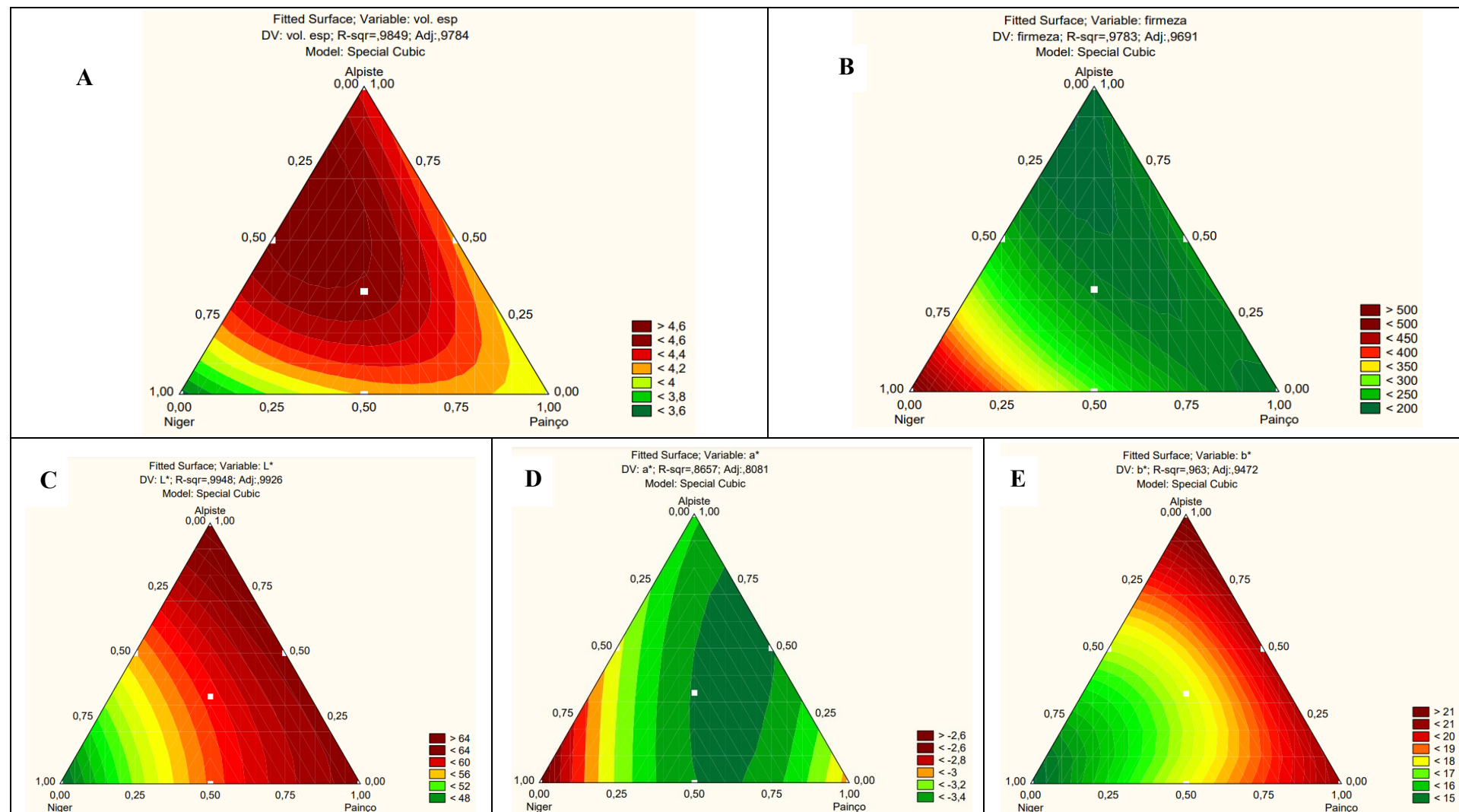


Figura 12. Superfície ajustada de volume específico do pão (A), firmeza (B) e parâmetros de cor para L^* (C), a^* (D) e b^* (E) do miolo de pães com diferentes proporções de farinhas de sementes de níger, painço e alpiste. Área experimental definida por pontos e expressa em componentes.

CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS



6. Conclusões e perspectivas futuras

As sementes das plantas alimentares não convencionais estudadas no presente trabalho podem ser consideradas como tendo um alto valor nutricional, mas também como fontes promissoras de compostos de alto valor adicionado para serem incorporados em produtos alimentares.

Com o estudo da caracterização nutricional, que incluiu a determinação da percentagem de humidade, conteúdo protéico e lipídico, teor de cinzas, hidratos de carbono e valor energético, pode-se observar que os macronutrientes mais abundantes foram os hidratos de carbono e proteínas nas sementes de painço e alpiste, e para a semente de níger foi o teor de gordura total, seguido de hidratos de carbono, evidenciando um baixo teor de cinzas nas três amostras.

Relativamente ao estudo de compostos de valor adicionado como os açúcares livres, ácidos orgânicos, tocoferóis e ácidos gordos, verificou-se que a sacarose foi o único açúcar livre identificado nas três amostras, estando de acordo com o previamente descrito por outros autores. Foram ainda identificados quatro ácidos orgânicos na amostra de níger, tendo sido o ácido chiquímico o maioritário, enquanto que para as sementes de painço e alpiste foram somente identificados dois ácidos orgânicos com predominância do ácido quínico. Quanto ao perfil em ácidos gordos, a semente de níger apresentou uma predominância de ácidos gordos polinsaturados, em particular o ácido linoleico (C18:2n6), enquanto que as sementes de painço e alpiste apresentaram maiores percentagens de ácidos gordos saturados e monoinsaturados, com maior predominância para o ácido oleico (C18:1n9). Tendo em conta a avaliação do perfil em tocoferóis, todas as isoformas (α , β , γ e δ -tocoferol) foram detetadas nas sementes, com destaque para o conteúdo elevado de α -tocoferol na amostra de níger. Relativamente à composição fenólica das amostras, a amostra de painço não revelou qualquer tipo de composto, enquanto que para as amostras de níger e alpiste foram tentativamente identificados, com maior destaque, derivados de ácido caféico e derivados C-glicosilados de apigenina, respetivamente. Em suma, no que concerne ao perfil nutricional e químico das farinhas das sementes em estudo, a amostra de níger foi a que mais se destacou, apresentando um maior conteúdo em gordura total, depois verificado por uma alta percentagem de PUFA, muito benéficos para a saúde do consumidor. A farinha desta semente apresentou também

teores mais elevados de açúcares e de tocoferóis (como foi dito anteriormente, devido sobretudo à altíssima concentração em α -tocoferol).

No que diz respeito aos ensaios de bioatividade conduzidos no presente estudo, as três amostras apresentaram atividade antioxidante no método de avaliação da capacidade de inibição da peroxidação lipídica (TBARS) e para a capacidade anti-hemolítica (OxHLIA) a amostra de painço não revelou qualquer atividade. Este resultado pode ser devido ao facto de não terem sido detetados quaisquer compostos fenólicos na sua composição, mas estudos de correlação seriam necessários para confirmar esta teoria.

De modo geral, todos os extratos hidroetanólicos mostraram-se eficientes contra todas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas, mas também contra as estirpes fúngicas, apresentando também bactericida e fungicida contra os mesmos. De ressaltar que os resultados obtidos para a atividade antifúngica nos extratos hidroetanólicos de níger e painço foram menores quando comparados com os controlos positivos utilizados (E211 e E224). Estes resultados promissores podem ser devidos à composição em moléculas de elevado potencial bioativo, mas não é possível estabelecer uma relação sem um estudo aprofundado de correlação entre compostos-bioatividade. Para a atividade hepatotóxica, três amostras não apresentaram atividade à máxima concentração testada, significando isto que as farinhas destas sementes são seguras para consumo e aferem a sua potencialidade de serem introduzidas em novas matrizes alimentares ou para melhoria de já existentes.

Com estes resultados, pode-se desenvolver novos produtos de panificação elaborados com farinha de PANC's, as quais, depois de testados os parâmetros de cor, textura e volume específico dos pães elaborados, indicaram que estas farinhas possuem uma boa capacidade de serem aplicadas na indústria de panificação sem alterações drásticas no comportamento físico dos produtos elaborados.

De uma forma global, este estudo permitiu apresentar resultados inovadores em relação à caracterização nutricional, química e às propriedades bioativas de sementes poucos estudadas e consumidas, mas com grande potencial para serem aplicadas na indústria alimentar. Considerando a sua composição em compostos bioativos, o uso destas sementes é de todo aconselhável no âmbito de uma dieta fortificada, sendo fontes de compostos de alto valor nutricional e com efeitos benéficos para a saúde do consumidor.

COMO PERSPETIVAS FUTURAS DESTE TRABALHO SERIA IMPORTANTE O ESTUDO DA(S):

- Propriedades nutricionais e teores em compostos de alto valor acrescentado dos produtos de panificação obtidos;
- Aceitação populacional através de uma análise sensorial dos produtos elaborados;
- Condições de armazenamento e durabilidade das características físicas e microbiológicas dos pães;
- Utilização de emulsificantes para a estabilização da interface entre os gases e a massa;
- Otimização das misturas;
- Propriedades tecnológicas do amido das farinhas e das fibras, bem como a sua aplicação em outros produtos à base de farinha, como alternativa de substituição da farinha de trigo;
- Caracterização de outras plantas alimentares não convencionais.

7. Referências

- AACC. (2001). *American Association of Cereal Chemists*. Approved methods: 10-05; 74-09. Saint Paul, 1983-2001.
- Aal, E. S. M. A., Hernandez, M., Rabalski, I., & Hucl, P. (2020). Composition of hairless canary seed oil and starch-associated lipids and the relationship between starch pasting and thermal properties and its lipids. *LWT*, *125*, 109257. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109257>
- Aal, E. S. M. A., Hucl, P. J., & Sosulski, F. W. (1997). Structural and Compositional Characteristics of Canaryseed (*Phalaris canariensis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(8), 3049–3055. <https://doi.org/10.1021/jf970100x>
- Aal, E. S. M. A., Hucl, P., Shea Miller, S., Patterson, C. A., & Gray, D. (2011). Microstructure and nutrient composition of hairless canary seed and its potential as a blending flour for food use. *Food Chemistry*, *125*(2), 410–416. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.021>
- Abreu, R. M. V., Ferreira, I. C. F. R., Calhella, R. C., Lima, R. T., Vasconcelos, M. H., Adegá, F., Chaves, R., & Queiroz, M.-J. R. P. (2011). Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-b]pyridine-2-carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *46*(12), 5800–5806. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.09.029>
- Ahn, E.-Y., Jin, H., & Park, Y. (2019). Assessing the antioxidant, cytotoxic, apoptotic and wound healing properties of silver nanoparticles green-synthesized by plant extracts. *Materials Science and Engineering: C*, *101*, 204–216. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.095>

- Amadou, I., Gounga, M. E., & Le, G.-W. (2013). Millets: Nutritional composition, some health benefits and processing - A review. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 501–508. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v25i7.12045>
- AOAC. (2016). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (20th ed). W. George.
- Ayadi, M. A., Abdelmaksoud, W., Ennouri, M., & Attia, H. (2009). Cladodes from *Opuntia ficus indica* as a source of dietary fiber: Effect on dough characteristics and cake making. *Industrial Crops and Products*, 30(1), 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.01.003>
- Azevedo, H. I. V. (2014). *Composição química da folha e do caule de Calamintha baetica. Efeito do solvente na extração de compostos antioxidantes*. <https://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/11582>
- Azzi, A. (2018). Many tocopherols, one vitamin E. *Molecular Aspects of Medicine*, 61, 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.06.004>
- Barreira, T. F., Paula Filho, G. X., Rodrigues, V. C. C., Andrade, F. M. C., Santos, R. H. S., Priore, S. E., Pinheiro-Sant’ana, H. M., Barreira, T. F., Paula Filho, G. X., Rodrigues, V. C. C., Andrade, F. M. C., Santos, R. H. S., Priore, S. E., & Pinheiro-Sant’ana, H. M. (2015). Diversidade e equitabilidade de Plantas Alimentícias Não Convencionais na zona rural de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 17(4), 964–974. https://doi.org/10.1590/1983-084X/14_100
- Barros, L., Pereira, E., Calhelha, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1732–1740. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.07.019>

- Batista, R. D., de Cássia Sousa Mendes, D., Morais, C. C., Thomaz, D. V., Ramirez Ascheri, D. P., Damiani, C., & Asquieri, E. R. (2020). Physicochemical, functional and rheological properties of fermented and non-fermented starch from canary seed (*Phalaris canariensis*). *Food Hydrocolloids*, 99, 105346. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105346>
- Benítez, V., Esteban, R. M., Moniz, E., Casado, N., Aguilera, Y., & Mollá, E. (2018). Breads fortified with wholegrain cereals and seeds as source of antioxidant dietary fibre and other bioactive compounds. *Journal of Cereal Science*, 82, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.06.001>
- Beretta, M. E., Fernandes, A. C., & Schneider, A. A. (2008). *A família Asteraceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil*. 6(3), 29.
- Bhagya, S., & Sastry, C. M. S. (2003). Chemical, functional and nutritional properties of wet dehulled niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) seed flour. *LWT - Food Science and Technology*, 36(7), 703–708. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00091-4](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00091-4)
- Bhavsar, G., Syed, H., & Andhale, R. (2017). *Characterization and quality assessment of mechanically and solvent extracted Niger (Guizotia abyssinica) Seed oil*. 6(2), 17–21.
- Bilello, G. I., Bodega, J. L., Cogliatti, M., D'Alfonso, C. O., Dios, M. A. de, Menici, D., Iraola, M. M. P., Rogers, W. J., & Scaramuzzino, R. L. (2014). *El cultivo de alpiste (Phalaris canariensis L.)*.
- Biswas, K. R., & Rahmatullah, M. (2011). *A Survey of Non-conventional Plants Consumed During Times of Food Scarcity in Three Adjoining Villages of Narail and Jessore Districts, Bangladesh*. 5.

- Borges, J. T. S., Paula, C. D., Piroz, M. R., & Oliveira, K. (2012). *Qualidade nutricional de pão de forma enriquecido com farinha de quinoa. 21.*
- Bressan, R. A., Reddy, M. P., Chung, S. H., Yun, D. J., Hardin, L. S., & Bohnert, H. J. (2011). Stress-adapted extremophiles provide energy without interference with food production. *Food Security*, 3(1), 93–105. <https://doi.org/10.1007/s12571-011-0112-9>
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (2015). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. John Wiley & Sons.
- Calado, V., & Montgomery, D. (2003). *Planejamento de Experimentos usando o Statistica*. Editora E-papers.
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 377–399. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12065>
- Carocho, M., Barros, L., C. Calhella, R., Ćirić, A., Soković, M., Santos-Buelga, C., Morales, P., & R. Ferreira, I. C. F. (2015). Melissa officinalis L. decoctions as functional beverages: A bioactive approach and chemical characterization. *Food & Function*, 6(7), 2240–2248. <https://doi.org/10.1039/C5FO00309A>
- CDCS—Canaryseed Development Commission of Saskatchewan: Canaryseed Nutritional Factsheets. (2018). <https://www.canaryseed.ca/nutritional-factsheets.html>
- Ceccaroni, D., Alfeo, V., Bravi, E., Sileoni, V., Perretti, G., & Marconi, O. (2020). Effect of the time and temperature of germination on the phenolic compounds of Triticum aestivum, L. and Panicum miliaceum, L. *LWT*, 127, 109396. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109396>

- Chahardoli, A., Jalilian, F., Memariani, Z., Farzaei, M. H., & Shokoohinia, Y. (2020). Chapter 26—Analysis of organic acids. In A. Sanches Silva, S. F. Nabavi, M. Saeedi, & S. M. Nabavi (Orgs.), *Recent Advances in Natural Products Analysis* (p. 767–823). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816455-6.00026-3>
- Chen, Y., Zhao, L., He, T., Ou, Z., Hu, Z., & Wang, K. (2019). Effects of mango peel powder on starch digestion and quality characteristics of bread. *International Journal of Biological Macromolecules*, *140*, 647–652. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.188>
- Chen, Z., Yu, L., Wang, X., Gu, Z., & Beta, T. (2016). Changes of phenolic profiles and antioxidant activity in canaryseed (*Phalaris canariensis* L.) during germination. *Food Chemistry*, *194*, 608–618. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.060>
- Chorilli, M., Leonardi, G. R., & Salgado, H. R. N. (2007). *Radicais livres e Cosmetologia •aRenvistãooxidantes: Conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas*. 6.
- Chow, C. K. (2007). *Fatty Acids in Foods and their Health Implications, Third Edition*. <https://b-ok.cc/book/732317/b096d5>
- Clerici, M. T. P. S., & El-Dash, A. A. (2008). Características tecnológicas de farinhas de arroz pré-gelatinizadas obtidas por extrusão termoplástica. *Ciência e Agrotecnologia*, *32*(5), 1543–1550. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542008000500028>
- Clifford, M. N., Johnston, K. L., Knight, S., & Kuhnert, N. (2003). Hierarchical Scheme for LC-MSn Identification of Chlorogenic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(10), 2900–2911. <https://doi.org/10.1021/jf026187q>

- Clifford, M. N., Knight, S., & Kuhnert, N. (2005). Discriminating between the Six Isomers of Dicafeoylquinic Acid by LC-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 3821–3832. <https://doi.org/10.1021/jf050046h>
- Cornell, J. A. (2011). *Experiments with Mixtures: Designs, Models, and the Analysis of Mixture Data*. John Wiley & Sons.
- Costa, M., Souza, E. L. de, Stamford, T. L. M., & Andrade, S. A. C. (2008). Technological quality of national and imported wheat grain and wheat flours. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(1), 220–225. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000100031>
- Cui, L., & Decker, E. A. (2016). Phospholipids in foods: Prooxidants or antioxidants? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(1), 18–31. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7320>
- Czaja-Bulsa, G. (2015). Non coeliac gluten sensitivity – A new disease with gluten intolerance. *Clinical Nutrition*, 34(2), 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2014.08.012>
- DRE. (2003). *Portaria n 254 de 19 de março 2003*. Diário da República Eletrónico. <https://dre.pt/pesquisa/-/search/215483/details/maximized>
- Ejike, C. E. C. C., Gong, M., & Udenigwe, C. C. (2013). Phytoalexins from the Poaceae: Biosynthesis, function and prospects in food preservation. *Food Research International*, 52(1), 167–177. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.012>
- Estrada-Salas, P. A., Montero-Morán, G. M., Martínez-Cuevas, P. P., González, C., & Barba de la Rosa, A. P. (2014). Characterization of Antidiabetic and Antihypertensive Properties of Canary Seed (*Phalaris canariensis* L.) Peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(2), 427–433. <https://doi.org/10.1021/jf404539y>

- Fatima, A., Villani, T. S., Komar, S., Simon, J. E., & Juliani, H. R. (2015). Quality and chemistry of niger seeds (*Guizotia abyssinica*) grown in the United States. *Industrial Crops and Products*, 75, 40–42. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.031>
- Fawzy Ramadan, M., & Mörsel, J.-T. (2003). Phospholipid composition of niger (*Guizotia abyssinica* cass.) seed oil. *LWT - Food Science and Technology*, 36(2), 273–276. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(02\)00220-7](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(02)00220-7)
- Ferreres, F., Gomes, N. G. M., Valentão, P., Pereira, D. M., Gil-Izquierdo, A., Araújo, L., Silva, T. C., & Andrade, P. B. (2018). Leaves and stem bark from *Allophylus africanus* P. Beauv.: An approach to anti-inflammatory properties and characterization of their flavonoid profile. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 430–438. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.045>
- Gan, R.-Y., Lui, W.-Y., Wu, K., Chan, C.-L., Dai, S.-H., Sui, Z.-Q., & Corke, H. (2017). Bioactive compounds and bioactivities of germinated edible seeds and sprouts: An updated review. *Trends in Food Science & Technology*, 59, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.010>
- Gao, Y., Janes, M. E., Chaiya, B., Brennan, M. A., Brennan, C. S., & Prinyawiwatkul, W. (2018). Gluten-free bakery and pasta products: Prevalence and quality improvement. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(1), 19–32. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13505>
- Gateva, S., Jovtchev, G., Stankov, A., Georgieva, A., Dobрева, A., & Mileva, M. (2019). The potential of geraniol to reduce cytotoxic and genotoxic effects of MNNG in plant and human lymphocyte test-systems. *South African Journal of Botany*, 123, 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.03.005>

- Germani, R., Benassi, V., & Carvalho, J. (1997). *Métodos de avaliação de grão e farinha de trigo*. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1997. 84 p. (EMBRAPA-CTAA, Documentos, n. 28).
- Getinet, A., & Sharma, S. M. (1996). *Niger: Guizotia abyssinica (L. f.) Cass.* IPGRI.
- Gill, S., Vasanthan, T., Ooraikul, B., & Rossnagel, B. (2002). Wheat Bread Quality as Influenced by the Substitution of Waxy and Regular Barley Flours in Their Native and Extruded Forms. *Journal of Cereal Science*, 36(2), 219–237. <https://doi.org/10.1006/jcrs.2001.0458>
- Greffeuille, V., Abecassis, J., Barouh, N., Villeneuve, P., Mabilie, F., Bar L'Helgouac'h, C., & Lullien-Pellerin, V. (2007). Analysis of the milling reduction of bread wheat farina: Physical and biochemical characterisation. *Journal of Cereal Science*, 45(1), 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.07.003>
- Hrušková, M., Švec, I., & Jirsa, O. (2006). Correlation between milling and baking parameters of wheat varieties. *Journal of Food Engineering*, 77(3), 439–444. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.07.011>
- Ide, T., Tsutsui, H., Hayashidani, S., Kang, D., Suematsu, N., Nakamura, K., Utsumi, H., Hamasaki, N., & Takeshita, A. (2001). Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circulation research*, 88(5), 529–535.
- Islam, A. F. M. T., Chowdhury, M. G. F., Islam, M. N., & Islam, M. S. (2007). Standardization of bread preparation from soy flour. *International Journal of Sustainable Crop Production*, 2(6), 15–20.
- Jang, S.-A., Park, D. W., Kwon, J. E., Song, H. S., Park, B., Jeon, H., Sohn, E.-H., Koo, H. J., & Kang, S. C. (2017). Quinic acid inhibits vascular inflammation in TNF-

- α -stimulated vascular smooth muscle cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, 563–571. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.021>
- Kalaisekar, A., Padmaja, P. G., Bhagwat, V. R., & Patil, J. V. (2016). *Insect Pests of Millets: Systematics, Bionomics, and Management*. Academic Press.
- Kalinová, J. (2007). *Nutritionally important components of proso millet (Panicum miliaceum L.)*. 91–100.
- Kalinova, J., & Moudry, J. (2006). Content and Quality of Protein in Proso Millet (*Panicum miliaceum L.*) Varieties. *Plant Foods for Human Nutrition*, 61(1), 43. <https://doi.org/10.1007/s11130-006-0013-9>
- Khan, M. Z., & He, L. (2017). The role of polyunsaturated fatty acids and GPR40 receptor in brain. *Neuropharmacology*, 113, 639–651. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.05.013>
- Kinupp, V. F. (2007). *Plantas alimentícias não-convencionais da região metropolitana de Porto Alegre, RS*. <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/12870>
- Kinupp, V. F., & Barros, I. B. I. (2004). *Levantamento de dados e divulgação do potencial das plantas alimentícias alternativas no Brasil*. *Horticultura brasileira v. 22(2)*, 17–25.
- Kraic, J., Mihálik, D., Klčová, L., Gubišová, M., Klemková, T., Hudcovicová, M., Ondreičková, K., Mrkvová, M., Havrlentová, M., Gubiš, J., & Čertík, M. (2018). Progress in the genetic engineering of cereals to produce essential polyunsaturated fatty acids. *Journal of Biotechnology*, 284, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.08.009>
- Kunkel, G. (1984). *Plants for human consumption: An annotated checklist of the edible phanerogams and ferns*. Koenigstein: Koeltz Scientific Books.

- Leal, M. L. (2015). *Conhecimento e uso de plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Ribeirão da Ilha–Florianópolis/SC*. Repositório Institucional UFSC. <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/174789>
- Leiner, G. (2014). *Nutrição e Suplementação: Antioxidantes e radicais livres*. Recuperado de *Nutrição e Suplementação web site*: <http://suplementacaonutricao.blogspot.com/2014/05/antioxidantes-e-radicaais-livres.html>
- Liang, S., Yang, G., & Ma, Y. (2010). Chemical Characteristics and Fatty Acid Profile of Foxtail Millet Bran Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(1), 63–67. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1475-3>
- Lockowandt, L., Pinela, J., Roriz, C. L., Pereira, C., Abreu, R. M. V., Calhella, R. C., Alves, M. J., Barros, L., Bredol, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Chemical features and bioactivities of cornflower (*Centaurea cyanus* L.) capitula: The blue flowers and the unexplored non-edible part. *Industrial Crops and Products*, 128, 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.059>
- Magnuson, B. A., Patterson, C. A., Hucl, P., Newkirk, R. W., Ram, J. I., & Classen, H. L. (2014). Safety assessment of consumption of glabrous canary seed (*Phalaris canariensis* L.) in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 63, 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.041>
- Manupriya, B. R., Lathika, Somashekarappa, H. M., Patil, S. L., & Shenoy, K. B. (2020). Study of gamma irradiation effects on the physico-chemical properties of wheat flour (*Triticum aestivum*, L.). *Radiation Physics and Chemistry*, 172, 108693. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2020.108693>

- Marangoni, A. L. (2007). *Potencialidade de aplicação de farinha de yacon (Polymnia sonchifolia) em produtos a base de cereais*.
<http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/256347>
- Marini, F., Magri, A. L., Marini, D., & Balestrieri, F. (2003). Characterization of the lipid fraction of Niger seeds (*Guizotia abyssinica* cass.) from different regions of Ethiopia and India and chemometric authentication of their geographical origin. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(11), 697–704.
<https://doi.org/10.1002/ejlt.200300797>
- Mariod, A. A., Saeed Mirghani, M. E., & Hussein, I. (2017). Chapter 23—*Guizotia abyssinica* (L.f.) Cass. Niger. In A. A. Mariod, M. E. Saeed Mirghani, & I. Hussein (Orgs.), *Unconventional Oilseeds and Oil Sources* (p. 131–136). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809435-8.00023-8>
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Antioxidant potential of two Apiaceae plant extracts: A comparative study focused on the phenolic composition. *Industrial Crops and Products*, 79, 188–194.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.018>
- Multhoff, G., Molls, M., & Radons, J. (2012). Chronic inflammation in cancer development. *Frontiers in immunology*, 2, 98.
- Musa, K. H., Abdullah, A., & Al-Haiqi, A. (2016). Determination of DPPH free radical scavenging activity: Application of artificial neural networks. *Food Chemistry*, 194, 705–711. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.038>
- Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A., & Yar, M. S. (2019). *Medicinal prospects of antioxidants: A review*. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010>
- Nionelli, L., Wang, Y., Pontonio, E., Immonen, M., Rizzello, C. G., Maina, H. N., Katina, K., & Coda, R. (2020). Antifungal effect of bioprocessed surplus bread as

- ingredient for bread-making: Identification of active compounds and impact on shelf-life. *Food Control*, *118*, 107437. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107437>
- Okezie, B. O., & Bello, A. B. (1988). Physicochemical and Functional Properties of Winged Bean Flour and Isolate Compared with Soy Isolate. *Journal of Food Science*, *53*(2), 450–454. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb07728.x>
- Oliveira, T. M., Pirozi, M. R., & Borges, J. T. S. (2008). *Elaboração de pão de sal utilizando farinha mista de trigo e linhaça*. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, *18*(2), 141–150.
- Park, J. S., Lee, J. S., & Lee, J. H. (2020). Antioxidative and antimutagenic effects of *Panicum miliaceum* L. *Korean Journal of Food Preservation*, *27*(2), 261–269. Scopus. <https://doi.org/10.11002/KJFP.2020.27.2.261>
- Patil, J. V. (2017). *Millet and Sorghum: Biology and Genetic Improvement*. John Wiley & Sons.
- Pimentel, L., Gomes, A., Pintado, M., & Rodríguez-Alcalá, L. M. (2016). *Isolation and Analysis of Phospholipids in Dairy Foods* [Research article]. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. <https://doi.org/10.1155/2016/9827369>
- Protonotariou, S., Mandala, I., & Rosell, C. M. (2015). Jet Milling Effect on Functionality, Quality and In Vitro Digestibility of Whole Wheat Flour and Bread. *Food and Bioprocess Technology*, *8*(6), 1319–1329. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1494-z>
- Quinn, J., & Myers, R. L. (2002). *Nigerseed: Specialty Grain Opportunity for Midwestern US*. 9.

- Ramadan, M. F., Asker, M. M. S., & Tadros, M. (2013). Lipid profile, antiradical power and antimicrobial properties of *Syzygium aromaticum* oil. *Grasas y Aceites*, 64(5), 509–520. <https://doi.org/10.3989/gya.011713>
- Ramadan, M., & Mörsel, J.-T. (2003). Phospholipid composition of niger (*Guizotia abyssinica* cass.) seed oil. *LWT - Food Science and Technology*, 36(2), 273–276. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(02\)00220-7](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(02)00220-7)
- Ramadan, Mohamed Fawzy, & Mörsel, J.-T. (2004). Oxidative stability of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) crude seed oils upon stripping. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106(1), 35–43. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200300895>
- Rathjen, T., & Steinhart, H. (1997). *Natural antioxidants in lipids*. New techniques, applications in lipid analysis.
- Regulamento (UE) n 1169. (2011). *Regulamento (UE) n. O 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de Outubro de 2011 , relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) n. O 1924/2006 e (CE) n. O 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho e revoga as Directivas 87/250/CEE da Comissão, 90/496/CEE do Conselho, 1999/10/CE da Comissão, 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, 2002/67/CE e 2008/5/CE da Comissão e o Regulamento (CE) n. O 608/2004 da Comissão*. <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj/por>
- Saarela, J. M., Burke, S. V., Wysocki, W. P., Barrett, M. D., Clark, L. G., Craine, J. M., Peterson, P. M., Soreng, R. J., Vorontsova, M. S., & Duvall, M. R. (2018). *A 250 plastome phylogeny of the grass family (Poaceae): Topological support under different data partitions [PeerJ]*. <https://peerj.com/articles/4299/>

- Salah, H. B., Kchaou, M., Ben Abdallah Kolsi, R., Abdennabi, R., Ayedi, M., Gharsallah, N., & Allouche, N. (2018). Chemical Composition, Characteristics Profiles and Bioactivities of Tunisian *Phalaris canariensis* Seeds: A Potential Source of omega-6 and omega-9 Fatty Acids. *Journal of Oleo Science*, 67(7), 801–812. <https://doi.org/10.5650/jos.ess17278>
- Saleh, A. S. M., Zhang, Q., Chen, J., & Shen, Q. (2013). Millet Grains: Nutritional Quality, Processing, and Potential Health Benefits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(3), 281–295. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12012>
- Sánchez, E., García, S., & Heredia, N. (2010). Extracts of Edible and Medicinal Plants Damage Membranes of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(20), 6888–6894. <https://doi.org/10.1128/AEM.03052-09>
- Sarin, R., Sharma, M., & Khan, A. A. (2009). Studies on *Guizotia abyssinica* L. oil: Biodiesel synthesis and process optimization. *Bioresource Technology*, 100(18), 4187–4192. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.072>
- Sarmento, A., Barros, L., Fernandes, Â., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. (2015). Valorization of traditional foods: Nutritional and bioactive properties of *Cicer arietinum* L. and *Lathyrus sativus* L. pulses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 179–185. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6702>
- Sarwar, M. H., Qadri, N. A., & Moghal, S. (2013). *The importance of cereals (Poaceae: Gramineae) nutrition in human health: A review*. <https://doi.org/10.5897/JCO12.023>
- Scheffé, H. (1963). The Simplex-Centroid Design for Experiments with Mixtures. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 25(2), 235–251. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1963.tb00506.x>

- Sciarini, L. S., Ribotta, P. D., León, A. E., & Pérez, G. T. (2010). Influence of Gluten-free Flours and their mixtures on batter properties and bread quality. *Food and Bioprocess Technology*, 3(4), 577–585. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0098-2>
- Sell, P., & Murrell, G. (2006). *Flora da Grã-Bretanha e Irlanda, Campanulaceae—Asteraceae* | Peter Sell, Gina Murrell, SM Walters | baixar. <https://book.cc/book/671476/f8fe7a>
- Shah, D., Sajjad, N., Ali, R., Nazir, N., Hassan, S., & Shah, S. (2019). Chapter 16—Sugar Regulates Plant Growth and Development Under In Vitro Conditions. In M. I. R. Khan, P. S. Reddy, A. Ferrante, & N. A. Khan (Orgs.), *Plant Signaling Molecules* (p. 257–268). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00015-0>
- Shen, Y., Chen, G., & Li, Y. (2018). Bread characteristics and antioxidant activities of Maillard reaction products of white pan bread containing various sugars. *LWT*, 95, 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.008>
- Shimamura, T., Zhao, W., & Hu, Z.-Q. (2007). Mechanism of Action and Potential for Use of Tea Catechin as an Antiinfective Agent. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry - Anti-Infective Agents)*, 6, 57–62. <https://doi.org/10.2174/187152107779314124>
- Silva, R. F. da, Ascheri, J. L. R., Pereira, R. G. F. A., & Modesta, R. C. D. (2009). Aceitabilidade de biscoitos e bolos à base de arroz com café extrusados. *Food Science and Technology*, 29(4), 815–819. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612009000400018>

- Silva, S. D. S. (2014). *Teor de biocompostos em germinados de linhaça (Linum usitatissimum L.) e painço (Panicum miliaceum L.)*. <http://repositorio.ufpel.edu.br:8080/handle/ri/2717>
- Soethe, C., Steffens, C. A., Amarante, C. V. T. do, Martin, M. S. D., & Bortolini, A. J. (2016). Qualidade, compostos fenólicos e atividade antioxidante de amoras-pretas “Tupy” e “Guarani” armazenadas a diferentes temperaturas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(8), 950–957.
- Soreng, R. J., Peterson, P. M., Romaschenko, K., Davidse, G., Teisher, J. K., Clark, L. G., Barberá, P., Gillespie, L. J., & Zuloaga, F. O. (2017). A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae) II: An update and a comparison of two 2015 classifications. *Journal of Systematics and Evolution*, 55(4), 259–290. <https://doi.org/10.1111/jse.12262>
- Soutinho, S. M. A. (2012). *Avaliação dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante de frutos vermelhos produzidos em modo biológico*. 95.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199–1218. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>
- Takebayashi, J., Iwahashi, N., Ishimi, Y., & Tai, A. (2012). Development of a simple 96-well plate method for evaluation of antioxidant activity based on the oxidative haemolysis inhibition assay (OxHLIA). *Food Chemistry*, 134(1), 606–610. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.086>
- Tebben, L., Shen, Y., & Li, Y. (2018). Improvers and functional ingredients in whole wheat bread: A review of their effects on dough properties and bread quality. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.015>

- Thacker, P. A. (2003). Performance and carcass characteristics of growing-finishing pigs fed diets containing graded levels of canaryseed. *Canadian Journal of Animal Science*, 83(1), 89–93. <https://doi.org/10.4141/A02-054>
- Tinoco, S. M. B., Sichieri, R., Moura, A. S., Santos, F. da S., & Carmo, M. das G. T. do. (2007). The importance of essential fatty acids and the effect of trans fatty acids in human milk on fetal and neonatal development. *Cadernos de Saúde Pública*, 23(3), 525–534. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2007000300011>
- Ube, N., Harada, D., Katsuyama, Y., Osaki-Oka, K., Tonooka, T., Ueno, K., Taketa, S., & Ishihara, A. (2019). Identification of phenylamide phytoalexins and characterization of inducible phenylamide metabolism in wheat. *Phytochemistry*, 167, 112098. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112098>
- Vallarino, J. G., & Osorio, S. (2019). Chapter 10—Organic Acids. In E. M. Yahia (Org.), *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* (p. 207–224). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00010-5>
- Valverde, M., Orona-Tamayo, D., Nieto-Rendán, B., & Paredes-López, O. (2017). Antioxidant and Antihypertensive Potential of Protein Fractions from Flour and Milk Substitutes from Canary Seeds (*Phalaris canariensis* L.). *Plant Foods for Human Nutrition*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201800039767>
- Vilhalva, D. A. A., Júnior, M. S. S., Melo, C., de MOURA, A., Caliar, M., & Souza, T. A. C. (2011). Utilization of cassava peel flour for preparing loaf bread. *Rev Instituto Adolfo Lutz. São Paulo*, 70(4), 514–521.
- Wijnhoud, J. D. (2007). *Nutrient budgets, soil fertility management and livelihood analysis in Northeast Thailand: A basis for integrated rural development strategies in developing countries*. s.n.].

- Zhang, D., Panhwar, R. B., Liu, J., Gong, X., Liang, J., Liu, M., Lu, P., Gao, X., & Feng, B. (2019). Morphological diversity and correlation analysis of phenotypes and quality traits of proso millet (*Panicum miliaceum* L.) core collections. *Journal of Integrative Agriculture*, *18*(5), 958–969. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)61997-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)61997-5)
- Zhang, H., Wang, H., Cao, X., & Wang, J. (2018). Preparation and modification of high dietary fiber flour: A review. *Food Research International*, *113*, 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.068>
- Zhang, Y., Shi, P., Qu, H., & Cheng, Y. (2007). Characterization of phenolic compounds in *Erigeron breviscapus* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *21*(18), 2971–2984. <https://doi.org/10.1002/rcm.3166>