

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos

Elaine Carvalho Minighin

**PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS (PANC) COMO
ALTERNATIVA DIETÉTICA PARA FENILCETONÚRICOS**

Belo Horizonte - MG

2023

Elaine Carvalho Minighin

**PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS (PANC) COMO
ALTERNATIVA DIETÉTICA PARA FENILCETONÚRICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Dra. Raquel Linhares Bello de Araújo

Coorientadora: Dra. Renata Adriana Labanca

Belo Horizonte - MG

2023

M665p Minighin, Elaine Carvalho.
Plantas alimentícias não convencionais (PANC) como alternativa dietética para fenilcetonúricos [recurso eletrônico] / Elaine Carvalho Minighin. – 2023.
1 recurso eletrônico (206 f. il.); pdf.

Orientadora: Raquel Linhares Bello de Araújo. Coorientadora: Renata Adriana Labanca.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Fenilalanina – Teses. 2. Proteína – Teses. 3. Compostos fenólicos – Teses. 4. Validação de método – Teses. 5. Vegetais – Teses. I. Araújo, Raquel Linhares Bello de. II. Labanca, Renata Adriana. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:664.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

FOLHA DE APROVAÇÃO

PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS (PANC) COMO ALTERNATIVA DIETÉTICA PARA FENILCETONÚRICOS

ELAINE CARVALHO MINIGHIN

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em 30 de agosto de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Dra. Raquel Linhares Bello de Araújo (Orientadora e Presidente da Comissão) - UFMG
Profa. Dra. Renata Adriana Labanca (Coorientadora) - UFMG
Prof. Dr. Christian Fernandes - UFMG
Prof. Dr. Renan Campos Chisté - UFPA
Dra. Juliana Maria de Oliveira - EPAMIG
Dra. Rosângelis Del Lama Soares - Hospital das Clínicas/UFMG

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Christian Fernandes, Professor do Magistério Superior**, em 30/08/2023, às 14:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renan Campos Chisté, Usuário Externo**, em 30/08/2023, às 14:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rosângelis Del Lama Soares, Usuária Externa**, em 30/08/2023, às 17:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Maria de Oliveira, Usuária Externa**, em 30/08/2023, às 17:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Linhares Bello de Araujo, Professora do Magistério Superior**, em 04/09/2023, às 10:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Adriana Labanca, Professora do Magistério Superior**, em 15/09/2023, às 16:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de](#)

[2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2584683** eo código CRC **50B1205B**.

Dedico este trabalho a todos fenilcetonúricos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela a vida, pela força e pela graça de viver este momento único.

Aos meus pais Domingos Minighin e Elza Carvalho, que sempre me apoiaram e nunca duvidaram da minha capacidade, estando sempre ao meu lado, a minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos Duarte Minighin e Eliene Minighin, por estarem sempre ao meu lado me apoiando nos momentos difíceis, pelo companheirismo, amor e amizade.

Ao meu noivo Igor Piazzzi, pelo suporte emocional, pelo amor, carinho, amizade, companheirismo, compreensão e paciência nesta jornada.

A todos meus familiares, que sempre me incentivaram e torceram pelo meu sucesso, em especial, meus avós maternos Maria da Conceição Assis, João Augusto de Carvalho já na presença de Deus e meus avós paternos Alcides Minighin e Iltes Carvalho que se enchem de orgulho em dizer que terão uma neta Doutora.

Agradeço de coração meus amigos, Ana Luiza Coeli, Adriana Moura, Ana Paula Costa, Josenilder Carlos, Leidiane Oliveira, Maria José Costa (Maju), Pâmella Fronza, Roberto Sousa, Uyson Câmara, Vinicius Correia e Viviane Dias por todo apoio, carinho, amizade e por tornarem minha caminhada mais leve e divertida, sem vocês com certeza seria mais difícil.

À minha orientadora, Prof^ª. Dra. Raquel Linhares agradeço por todos os ensinamentos, suporte, dedicação, confiança, paciência e respeito a mim oferecido. Você com toda sua delicadeza, dedicação, dinamismo e alegria nos estimula a sermos profissionais melhores.

À minha coorientadora, Prof^ª. Dra. Renata Adriana Labanca, por nunca ter me abandonado, por sempre ter acreditado no meu potencial, por todo conhecimento e experiências compartilhadas, os meus sinceros agradecimentos e gratidão. Com você aprendi que devemos sempre correr atrás dos nossos sonhos, pois o não já temos.

À Prof^ª. Dra. Lucilene Rezende e a todos os membros e ex membros do grupo PeCAN – Pesquisa em Ciência de Alimentos e Nutrição e da RotuLab UFMG – Consultoria em Rotulagem de Alimentos, por sempre me receberem tão bem, por todas experiências e ensinamentos compartilhados. Prof^ª. Dra. Lucilene Rezende você com certeza é fonte de inspiração e estímulo para todos que estão a sua volta.

À Fundação Ezequiel Dias, em especial ao Laboratório de Contaminantes Metálicos, na pessoa de Nilton Silva, obrigada por todos os ensinamentos e disponibilidade. E ao Laboratório de Microcomponente, nas pessoas de Maria de Fátima Gomides, Mariem

Rodrigues, Shirley Chaves, Lorena Dias, Karen Costa e Cláudia Lima, a vocês não tenho palavras para que sejam suficientes. Obrigada por todo acolhimento, ensinamentos, dedicação e envolvimento com meu projeto, sei como se esforçaram comigo para que o trabalho fosse concluído, sem vocês tenho certeza que a caminhada seria mais árdua. Obrigada por tornarem meus últimos meses de pesquisa no doutorado mais leves e alegres.

À minha aluna de iniciação científica Isabela Iunes, por aceitar realizar experimentos em meio ao caos da pandemia da Covid-19, por toda ajuda e momentos compartilhados.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), em especial a pesquisadora Dra. Marinalva Pedrosa, por todo apoio e suporte no desenvolvimento do trabalho.

Aos Prof. Dr. Júlio Onésio e Prof. Dr. Rodinei Augusti por disponibilizar o Laboratório de Espectrometria de Massas do Departamento de Química da UFMG.

Aos professores e técnicos e demais servidores do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG, por todos os ensinamentos compartilhados e suporte.

Aos colegas do Laboratório de Química de Alimentos, o meu muito obrigado.

Aos membros da banca examinadora Dr. Christian Fernandes, Dra. Juliana Maria de Oliveira, Dr. Renan Campos Chisté, Dra. Rosângelis Del Lama Soares e Dra. Camila Argenta Fante, pelas contribuições, de forma a enriquecer este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado.

A todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho.

Nós somos aprendizes em lento aprendizado.

(Autor desconhecido)

RESUMO

A fenilcetonúria é um erro inato autossômico recessivo do metabolismo do aminoácido fenilalanina (Phe), causado por variantes no gene que codifica a fenilalanina hidroxilase. A principal forma de tratamento é a restrição dietética da Phe, associado ao uso de substitutos proteicos e alimentos com baixo teor de proteína como frutas e vegetais, tornando a dieta monótona. Considerando a grande biodiversidade do Brasil, estudos que explorem esse potencial, com a indicação de novas opções de alimentos vegetais, como as Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC), que possam contribuir na diversificação e na suplementação da dieta destes pacientes tornam-se interessante. Neste contexto, objetivou-se selecionar e caracterizar PANC com baixo teor de proteína (< 5%), quantificando o teor de Phe. Foram selecionadas 15 amostras de PANC, distribuídas em nove famílias botânicas e 12 espécies. Sendo elas 11 folhosas (almeirão-de-árvore, azedinha, bertalha, capiçoba, capuchinha, jambu, ora-pro-nóbis com e sem espinho, peixinho, taioba, vinagreira-roxa), um fruto (chuchu-de-vento), uma flor (capuchinha), uma sépala (vinagreira) e um talo (taioba). Em um primeiro momento, essas amostras foram caracterizadas quanto à composição centesimal e minerais. Sendo observados teores representativos dos minerais potássio, cálcio, magnésio e ferro, como também, conteúdo de fibras solúveis. O teor de compostos fenólicos totais, a capacidade antioxidante, e o perfil químico antes e após o processo de digestão gastrointestinal *in vitro* das amostras também foram avaliados. Os resultados mostraram níveis relevantes de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante em comparação com algumas hortaliças convencionais. Com relação ao perfil químico, foi possível identificar compostos de diferentes classes químicas, com destaque a classe dos flavonóides com maior número de compostos identificados. Além disso, verificou-se que houve diferença na constituição desses compostos antes e após o processo de digestão. Para determinar o teor de Phe das amostras de PANC, foi validado, em duas matrizes, um método cromatográfico empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE/UV). Os parâmetros de desempenho (linearidade, seletividade, efeito matriz, limite de detecção e quantificação, recuperação, repetibilidade e precisão intermediária) estudados na validação, indicaram a adequação do método para quantificação de Phe em matriz vegetal. Com relação ao teor de Phe das amostras foi observado que as amostras folhosas apresentaram maior teor de Phe, quanto às amostras de fruto, flor, sépala e talo. Os dados apresentados no estudo indicam que as amostras de PANC são adequadas para uso na dieta de pacientes com fenilcetonúria, desta forma a inclusão desses vegetais ao tratamento poderá auxiliar na diversidade alimentar e na ingestão de nutrientes, deixando-o menos monótona e mais palatável.

Palavras-chave: fenilalanina; proteína; minerais; compostos fenólicos; validação de métodos; alimentos vegetais.

ABSTRACT

Phenylketonuria is an autosomal recessive inborn error in the amino acid phenylalanine (Phe) metabolism caused by gene variants encoding phenylalanine hydroxylase. The main form of treatment is dietary Phe restriction, associated with using protein substitutes and low-protein foods such as fruits and vegetables, making the diet monotonous. Considering the incredible biodiversity of Brazil, studies that explore this potential, with the indication of new plant food options, such as Unconventional Food Plants (UFP), which may contribute to the diversification and supplementation of these patients' diets, become attractive. In this context, the objective was to select and characterize UFP with low protein content (< 5%), quantifying the Phe content. Fifteen UFP samples were selected, distributed in nine botanical families and 12 species. Of which 11 are leafy (almeirão-de-árvore, azedinha, bertalha, capiçoba, capuchinha, jambu, ora-pro-nóbis com e sem espinho, peixinho, taioba, vinagreira-roxa), one fruit (chuchu-de-vento), one flower (capuchinha), one sepal (vinagreira) and one stalk (taioba). At first, these samples were characterized by chemical composition and minerals. It was observed representative contents of the minerals potassium, calcium, magnesium, and iron, as well as contents of soluble fibers. The content of total phenolic compounds, the antioxidant capacity, and the chemical profile before and after the samples' in vitro gastrointestinal digestion process were also evaluated. The results showed relevant levels of total phenolic compounds and antioxidant capacity compared to some conventional vegetables. Regarding the chemical profile, it was possible to identify compounds from different chemical classes, emphasizing the class of flavonoids with the highest number of identified compounds. Furthermore, it was found that there was a difference in the constitution of these compounds before and after the digestion process. A chromatographic method using high-performance liquid chromatography with an ultraviolet detector (HPLC/UV) was validated in two matrices to determine the Phe content of the UFP samples. The performance parameters (linearity, selectivity, matrix effect, limit of detection and quantification, recovery, repeatability, and intermediate precision) studied in the validation indicated the method's suitability for quantification of Phe in plant matrix. Regarding the Phe content of the samples, it was observed that the leafy samples had a higher Phe content in the fruit, flower, sepal, and stem samples. The data presented in the study indicate that the UFP samples are suitable for use in the diet of patients with phenylketonuria. Thus, including these vegetables in the treatment can help with dietary diversity and nutrient intake, making them less monotonous and more palatable.

Keywords: phenylalanine; protein; minerals; phenolic compounds; method validation; vegetable food.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Almeirão-de-árvore (<i>Lactuca canadensis</i> L.) | 13 |
| Figura 2 - Azedinha (<i>Rumex acetosa</i> L.) | 14 |
| Figura 3 - Bertalha (<i>Basella alba</i> L.) | 15 |
| Figura 4 – Capiçoba (<i>Erechtites valerianifolius</i> (Link ex Spreng.) DC) | 17 |
| Figura 5 - Capuchinha (<i>Tropaeolum majus</i> L.) | 18 |
| Figura 6 - Chuchu-de-vento (<i>Cyclanthera pedata</i> (L.) Schrad.) | 19 |
| Figura 7 - Jambu (<i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. Jansen) | 21 |
| Figura 8 - Ora-pro-nóbis (<i>Pereskia aculeata</i> Mill.) | 22 |
| Figura 9 - Peixinho (<i>Stachys byzantina</i> K. Koch) | 23 |
| Figura 10 - Taioba (<i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott) | 25 |
| Figura 11 - Vinagreira (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) | 26 |
| Figura 12 - Vinagreira-roxa (<i>Hibiscus acetosella</i> Welw.ex Hiem) | 27 |
| Figura 13 – Biossíntese dos polifenóis, via do ácido chiquímico | 30 |
| Figura 14 – Esquema de ionização por <i>paper spray</i> | 35 |
| Figura 15 – Instrumentação do ICP-OES | 38 |
| Figura 16 – Estrutura geral de α -aminoácidos com grupo R representando a cadeia lateral variável | 41 |
| Figura 17 – Reagente de derivatização comuns para aminoácidos | 49 |
| Figura 18 – Triângulo da AOAC baseado no teor de proteína, gordura e carboidrato | 52 |
| Figura 19 - Exemplo típico de uma curva analítica com a identificação dos parâmetros de desempenho “faixa de trabalho”, “faixa linear de trabalho”, “sensibilidade”, “limite de detecção (LD)” e “limite de quantificação (LQ)” | 55 |

CAPÍTULO I

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Fluxograma de inclusão e exclusão de estudos por etapa de seleção | 82 |
|--|----|

CAPÍTULO II

| | |
|--|-----|
| Figura 1 - Teor de potássio (K) em amostras de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) | 104 |
| Figura 2 - Teor de cálcio (Ca) em amostras de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) | 105 |

| | |
|---|-----|
| Figura 3 - Teor de Magnésio (Mg) em amostras de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) | 105 |
| Figura 4 – Proporção (%) de microminerais presente em Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) | 106 |
| Figura 5 - Teor de Ferro (Fe) em amostras de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) | 107 |
| Figura 6 - Teor de Zinco (Zn) em amostras de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) | 108 |

CAPÍTULO III

| | |
|--|-----|
| Figura 1 – Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) | 117 |
|--|-----|

CAPÍTULO IV

| | |
|--|-----|
| Figura 1 – Esquema de hidrólise e derivatização das amostras | 171 |
| Figura 2 – Cromatogramas de separação de aminoácidos usando CLAE/UV | 177 |
| Figura 3 - Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva de calibração de fenilalanina na faixa de 1 a 10 nmol/mL | 178 |
| Figura 4 - Gráfico de probabilidade normal da curva de calibração de fenilalanina na faixa de 1 a 10 nmol/mL | 179 |
| Figura 5 - Gráfico de Durbin-Watson da curva de calibração de fenilalanina na faixa de 1 a 10 nmol/mL | 179 |
| Figura 6 – Representação da homoscedasticidade das variâncias da curva de calibração de fenilalanina na faixa de 1 a 10 nmol/mL | 180 |
| Figura 7- Gráfico da curva de calibração de fenilalanina na faixa de 1 a 10 nmol/mL | 180 |
| Figura 8 – Gráfico da curva de calibração de fenilalanina em matriz (almeirão-de-árvore) na faixa de 1 a 10 nmol/mL | 182 |
| Figura 9 - Gráfico da curva de calibração de fenilalanina em matriz (folha da capuchinha) na faixa de 1 a 10 nmol/mL | 182 |
| Figura 10 – Gráfico de comparação entre as inclinações da curva em solvente e em matriz (almeirão-de-árvore) para fenilalanina na faixa de 1 a 10 nmol/mL | 183 |
| Figura 11 – Gráfico de comparação entre as inclinações da curva em solvente e em matriz (folha da capuchinha) para fenilalanina na faixa de 1 a 10 nmol/mL | 184 |

LISTA DE TABELA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Métodos para avaliação da capacidade antioxidante | 33 |
| Tabela 2 - Métodos para hidrólise de proteínas em aminoácidos individuais | 44 |
| Tabela 3 - Prós e contras dos procedimentos de derivatização de aminoácidos | 49 |
| Tabela 4 – Critérios de aceitação para recuperação | 57 |
| Tabela 5 - Critérios de aceitação para repetibilidade | 58 |

CAPÍTULO I

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Número de trabalhos selecionados por base de dados antes e após remoção das duplicatas | 82 |
| Tabela 2 – Síntese dos principais dados presentes nos artigos selecionados para o estudo | 84 |

CAPÍTULO II

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 - Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) selecionadas | 97 |
| Tabela 2 – Composição centesimal das Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) | 100 |
| Tabela 3 - Teor de minerais das Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) | 103 |

CAPÍTULO III

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 - Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) e partes estudadas | 116 |
| Tabela 2 – Compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) | 121 |
| Tabela 3 – Perfil químico de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) por <i>Paper Spray Mass Spectrometry</i> (PS/MS) no modo positivo | 124 |
| Tabela 4 – Perfil químico de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) por <i>Paper Spray Mass Spectrometry</i> (PS/MS) no modo negativo | 133 |

CAPÍTULO IV

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 - Agrupamento das amostras de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC), de acordo com o Triângulo de Composição de Alimentos da AOAC | 165 |
| Tabela 2 - Diluição para solução derivatizante com derivatizante fenilisotiocianato (PITC) | 166 |
| Tabela 3 – Peso das amostras para hidrólise | 169 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 4 – Avaliação da linearidade das curvas em matriz na faixa de 1 a 10 nmol/mL | 181 |
| Tabela 5 - Comparação entre as inclinações da curva em solvente e em matriz para fenilalanina na faixa de 1 a 10 nmol/mL | 183 |
| Tabela 6 – Valore de G_1 , G_2 e G_3 para os níveis de 3, 6 e 9 nmol/mL de fenilalanina, estudados na recuperação e precisão | 185 |
| Tabela 7 – Percentual de recuperação obtidas pelo analista 1 e 2 para os níveis de 3, 6 e 9 nmol/mL de fenilalanina, estudados | 185 |
| Tabela 8 – Verificação das premissas de normalidade e homoscedasticidade dos resíduos para análise de variância | 186 |
| Tabela 9- Teor de fenilalanina em Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) | 188 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 8 |
| 2 OBJETIVO..... | 10 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 10 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 10 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 11 |
| 3.1 Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC)..... | 11 |
| 3.1.1 Almeirão-de-árvore (<i>Lactuca canadensis</i> L.)..... | 12 |
| 3.1.2 Azedinha (<i>Rumex acetosa</i> L.)..... | 14 |
| 3.1.3 Bertalha (<i>Basella alba</i> L.)..... | 15 |
| 3.1.4 Capiçoba (<i>Erechtites valerianifolius</i> (Link ex Spreng.) DC)..... | 16 |
| 3.1.5 Capuchinha (<i>Tropaeolum majus</i> L.)..... | 17 |
| 3.1.6 Chuchu-de-vento (<i>Cyclanthera pedata</i> (L.) Schrad.)..... | 19 |
| 3.1.7 Jambu (<i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. Jansen)..... | 20 |
| 3.1.8 Ora-pro-nóbis (<i>Pereskia aculeata</i> Mill.)..... | 21 |
| 3.1.9 Peixinho (<i>Stachys byzantina</i> K. Koch)..... | 23 |
| 3.1.10 Taioba (<i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott)..... | 24 |
| 3.1.11 Vinagreira (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)..... | 25 |
| 3.1.12 Vinagreira-roxa (<i>Hibiscus acetosella</i> Welw.ex Hiem)..... | 26 |
| 3.2 Digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> | 28 |
| 3.3 Compostos fenólicos..... | 29 |
| 3.3.1 Digestão gastrointestinal de compostos fenólicos,..... | 29 |
| 3.3.2 Estresse oxidativo e atividade antioxidante..... | 31 |
| 3.3.3 Espectrometria de massas com ionização por <i>paper spray</i> (PS-MS)..... | 35 |
| 3.4 Minerais..... | 36 |
| 3.4.1 Quantificação de minerais..... | 37 |
| 3.5. Proteína..... | 38 |
| 3.5.1 Método Kjeldahl..... | 39 |
| 3.6 Aminoácidos..... | 40 |
| 3.6.1 Quantificação de aminoácidos..... | 43 |
| 3.6.1.1 Hidrólise..... | 43 |
| 3.6.1.2 Método analítico para análise de aminoácidos..... | 47 |
| 3.6.1.3 Derivatização..... | 48 |

| | |
|---|-----------|
| 3.7 Triângulo de composição de alimentos da Association of Official Analytical Chemists (AOAC)..... | 51 |
| 3.8 Validação de métodos analíticos..... | 52 |
| 3.8.1 Seletividade..... | 53 |
| 3.8.2 Linearidade / Faixa de trabalho / Faixa linear de trabalho / Sensibilidade..... | 54 |
| 3.8.3 Limite de Detecção (LD)..... | 55 |
| 3.8.4 Limite de Quantificação (LQ)..... | 56 |
| 3.8.5 Tendência/ Recuperação..... | 56 |
| 3.8.6 Precisão..... | 57 |
| 3.8.7 Repetibilidade..... | 57 |
| 3.8.8 Precisão intermediária..... | 58 |
| 3.9 Referência bibliográfica..... | 58 |
| 4 APRESENTAÇÃO..... | 76 |

CAPÍTULO I - Avaliação do consumo de vegetais e frutas por fenilcetonúricos no controle metabólico de fenilalanina: uma revisão integrativa.....77

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 78 |
| 2 MÉTODOS..... | 81 |
| 3 RESULTADO..... | 82 |
| 4 DISCUSSÃO..... | 87 |
| 5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA..... | 89 |

CAPÍTULO II - Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC): composição centesimal e perfil de minerais.....93

| | |
|---|------------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 95 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 96 |
| 2.1 Coleta, preparo e seleção das amostras..... | 96 |
| 2.2 Composição centesimal..... | 98 |
| 2.3 Quantificação de minerais..... | 98 |
| 2.4 Análise estatística..... | 99 |
| 3 RESULTADO E DISCUSSÃO..... | 99 |
| 3.1 Composição centesimal..... | 99 |
| 3.2 Minerais..... | 102 |
| 4. CONCLUSÃO..... | 109 |

| | |
|--|------------|
| 5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA..... | 109 |
|--|------------|

CAPÍTULO III - Perfil químico de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) do Brasil antes e após processo de digestão gastrointestinal in vitro e capacidade antioxidante.....112

| | |
|---|------------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 114 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 115 |
| 2.1 Amostras..... | 115 |
| 2.2 Compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante..... | 118 |
| 2.3 Digestão gastrointestinal in vitro..... | 119 |
| 2.4 Avaliação do perfil químico..... | 120 |
| 2.5 Análise estatística..... | 120 |
| 3 RESULTADO E DISCUSSÃO..... | 121 |
| 3.1 Compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante..... | 121 |
| 3.2 Perfil químico..... | 122 |
| 4 CONCLUSÃO..... | 149 |
| 5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA..... | 150 |

CAPÍTULO IV - Validação de método para análise de fenilalanina em Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC).....160

| | |
|---|------------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 162 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 163 |
| 2.1 Produtos químicos e reagentes..... | 163 |
| 2.2 Obtenção e preparo das amostras..... | 163 |
| 2.3 Classificação das amostras..... | 163 |
| 2.4 Soluções de trabalho e padrões para validação..... | 165 |
| 2.4.1 Solução de ácido clorídrico 6M com fenol..... | 165 |
| 2.4.2 Solução de acetato de sódio trihidratado 0,20 M..... | 165 |
| 2.4.3 Solução ressecante..... | 166 |
| 2.4.4 Solução derivatizante sem fenilisotiocianato (PITC)..... | 166 |
| 2.4.5 Solução derivatizante com fenilisotiocianato (PITC)..... | 166 |
| 2.4.6 Solução de ácido fosfórico a 10% (v/v)..... | 167 |
| 2.4.7 Solução diluente..... | 167 |
| 2.4.8 Solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)..... | 167 |

| | |
|---|------------|
| 2.4.9 Solução de ácido acético 1 M..... | 167 |
| 2.4.10 Solução de hidróxido de sódio 0,5 M..... | 167 |
| 2.4.11 Solução tampão de acetato de sódio trihidratado (Fase A)..... | 168 |
| 2.4.12 Solução de ácido clorídrico 0,1 M..... | 168 |
| 2.4.13 Solução estoque de aminoácidos individuais 2,5 µmol/mL..... | 168 |
| 2.4.14 Solução intermediária do padrão aminoácidos (Amino Acid Standard H) 250 nmol/mL..... | 168 |
| 2.5 Hidrólise das amostras..... | 169 |
| 2.6 Protocolo de derivatização para soluções de aminoácidos e amostras..... | 170 |
| 2.7 Condições cromatográficas (CLAE/UV)..... | 171 |
| 2.8 Parâmetros de validação..... | 172 |
| 2.8.1 Seletividade..... | 173 |
| 2.8.2 Linearidade..... | 173 |
| 2.8.3 Efeito matriz..... | 173 |
| 2.8.4 Recuperação, repetibilidade e precisão intermediária..... | 174 |
| 2.8.5 Limite de detecção e quantificação..... | 175 |
| 2.9 Quantificação de fenilalanina nas amostras..... | 175 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 176 |
| 3.1 Validação de métodos..... | 176 |
| 3.1.1 Seletividade..... | 178 |
| 3.1.2 Linearidade..... | 178 |
| 3.1.3 Efeito matriz..... | 181 |
| 3.1.4 Recuperação, repetibilidade e precisão intermediária..... | 184 |
| 3.1.5 Limite de detecção e quantificação..... | 186 |
| 3.2 Teor de fenilalanina nas amostras..... | 187 |
| 4 CONCLUSÃO..... | 190 |
| 5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA..... | 190 |
| | |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 194 |
| APÊNDICE A..... | 195 |

1. INTRODUÇÃO

Identificada pela primeira vez em 1934, por Folling (VAN WEGBERG *et al.*, 2017) a fenilcetonúria é considerada uma doença rara, com incidência de 1:10.000 nascidos vivos na Europa, 1:15.000 nos Estados Unidos (YILDIZ; SIVRI, 2019) e de 1:30.402 no Brasil (BRASIL, 2020). Tal doença é provocada por um erro inato autossômico recessivo do metabolismo do aminoácido essencial fenilalanina (Phe), causado por variantes no gene que codifica a fenilalanina hidroxilase (BLAU; SPRONSEN; LEVY, 2010; YILDIZ; SIVRI, 2019).

No Brasil, a fenilcetonúria é diagnosticada por meio do “teste do pezinho”. Este é oferecido gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e deve ser obrigatoriamente realizado em todo o território nacional (ANVISA, 2012). O diagnóstico da fenilcetonúria é feito quando os níveis séricos de Phe encontram-se persistentemente elevados e os níveis de tirosina estão normais ou diminuídos, tendo sido excluídas a hiperfenilalaninemia transitória que ocorre devido à imaturidade hepática ou enzimática nos primeiros meses de vida; a deficiências de tetrahydrobiopterina (BH4), que é um co-fator necessário para a ativação da fenilalanina hidroxilase e a hiperfenilalaninemia causadas por mutações no gene *DNAJC12* (MATTOS *et al.*, 2013; GALLEGO *et al.*, 2020).

Sendo assim, de acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Fenilcetonúria, publicado pelo Ministério da Saúde em 2020, a fenilcetonúria pode ser classificada em clássica, na qual as concentrações séricas de Phe em um recém nascido, recém diagnosticado e não tratado excedem 20mg/dL; leve quando o paciente não tratado apresenta níveis séricos de Phe entre 8 a 20 mg/dL e hiperfenilalaninemia não-fenilcetonúrica que ocorre quando o paciente sem tratamento apresenta níveis plasmáticos de Phe entre 2 e 8 mg/dL no diagnóstico (BRASIL, 2020).

O tratamento é basicamente dietético e consiste na restrição de alimentos com alto teor proteico e de alimentos e/ou bebidas contendo aspartame, associado a fórmulas alimentares, livre de Phe, o que gera uma dieta monótona e pouco palatável (VAN WEGBERG *et al.*, 2017; BASSANINI *et al.*, 2019).

Com a intenção de ampliar a oferta de produtos alimentícios *in natura* e de industrializados com baixo teor de proteína passíveis de serem consumidos pelos indivíduos com fenilcetonúria e para servir como guia de referência para profissionais da saúde, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) desenvolveu um painel *online* com teores de Phe. Para o desenvolvimento da do painel de alimentos *in natura*, foi utilizado o

método de estimativa, que considera que 4 % do teor de proteína total presente no alimento corresponde a Phe. Além disso, foram selecionados para elaboração deste painel apenas frutas e vegetais que apresentassem teor de proteína entre 0,10 a 5,00 %, totalizando 74 vegetais (ANVISA, 2023). Número pequeno considerando a grande diversidade de espécies vegetais encontradas no Brasil.

Nesse contexto, considerando que o Brasil é megabiodiverso, ressalta-se a importância de estudos que explorem esse potencial, com a indicação de novas opções de alimentos vegetais, como as Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC), que possam ser introduzidos regularmente na dieta de pacientes com fenilcetonúria.

Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) são plantas que não estão disponíveis no circuito global de comercialização e possuem uma ou mais partes comestíveis (KINUPP; LORENZI, 2014), podendo ser nativas, exóticas, cultivadas ou espontâneas (LEAL; ALVES; HANAZAKI, 2018), além de partes não convencionais de vegetais convencionais (MOURA *et al.*, 2021).

Normalmente as PANC apresentam distribuição restrita, regionalizada ou indicação de uso negligenciada. Neste sentido, estudos que explorem o potencial alimentício de espécies nativas e/ou naturalizadas, tornam-se relevantes, uma vez que a falta de informações sobre a disponibilidade desses recursos alimentícios, sobre a utilização, a forma de consumo, bem como de seu potencial nutricional dificultam o uso dessas espécies. Geralmente, a maioria dos estudos que envolvem PANC relaciona-se apenas aos aspectos etnobotânicos, isto é, a relação existente entre o homem e as plantas e o modo como essas plantas são usadas como recursos (CRUZ; PERONI; ALBUQUERQUE, 2013; CECCANTI *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2018).

Além disso, quando há pesquisas que envolvem características nutricionais dessas espécies, as mudanças físico-químicas que ocorrem durante o processo digestivo no organismo não são avaliadas. Assim sendo, salienta-se a necessidade de estudos que estimem os efeitos do processo gastrointestinal sobre a bioacessibilidade dos compostos nutricionais desses vegetais, já que, durante a digestão, muitos desses compostos, como os fenólicos, podem ficar totalmente ou parcialmente indisponíveis para absorção (CELEP *et al.*, 2017).

Nesse contexto, ressalta-se a necessidade da identificação de espécies vegetais com potencial funcional, baixo teor proteico, com o objetivo de reduzir as deficiências nutricionais e introduzir novos alimentos à dieta de indivíduos com fenilcetonúria. No entanto, ressalta-se que é essencial que estejam disponíveis informações confiáveis sobre o teor de Phe desses vegetais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Selecionar e caracterizar Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) hipoproteicas, quantificando o teor de fenilalanina presente nas mesmas.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) hipoproteicas presentes no Campo Experimental Santa Rita da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG).
- Determinar a composição centesimal (umidade, cinzas, proteína, lipídios, carboidratos, fibra total, fibras solúveis e insolúveis) das amostras.
- Quantificar o teor de minerais, presente nas PANC.
- Determinar a capacidade antioxidante das amostras.
- Determinar o perfil químico das amostras por espectrometria de massa com ionização por *paper spray* (PS/MS).
- Avaliar os efeitos da digestão gastrointestinal *in vitro* sobre o perfil químico das amostras de PANC.
- Validar método cromatográfico empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE/UV) para quantificação do aminoácido fenilalanina em amostras de vegetais.
- Quantificar o teor de fenilalanina nas amostras de PANC.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC)

O uso de plantas como fonte alimentícia é relatado desde o período Paleolítico, pois a coleta de frutos, ramos, folhas e raízes da natureza já era uma prática rotineira entre a população daquela época (DO NASCIMENTO *et al.*, 2013; BARREIRA *et al.*, 2015; MOURA *et al.*, 2021). No entanto, no mundo moderno, com a agricultura globalizada, homogênea (monocultura) e de fácil acesso, essas práticas ficaram em desuso, assim como ficaram reduzidos o conhecimento e o consumo de muitas espécies de plantas, as quais antes eram amplamente cultivadas ou coletadas da natureza (PEISINO *et al.*, 2020; MOURA *et al.*, 2021).

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, com aproximadamente 33.161 espécies vegetais, o que corresponde a mais de 20% do total de espécies conhecidas (ULLOA ULLOA *et al.*, 2017; MÜGGE *et al.*, 2021). Apesar disso, é provável que exista um grande número de espécies com distribuições restritas, regionalizadas ou cuja indicação de uso tenha sido negligenciada. Esses grupos de plantas têm recebido grande atenção nos últimos anos, e os termos mais conhecidos para designá-las são: inço, daninhas, ruderais, plantas silvestres comestíveis, vegetais tradicionais, alimento da fome, plantas alimentícias alternativas, vegetais não convencionais, e até mesmo de novos alimentos funcionais (CECCANTI *et al.*, 2018; LEAL; ALVES; HANAZAKI, 2018; ARAÚJO *et al.*, 2021; FERREIRA JÚNIOR; CAMPOS; DE MEDEIROS, 2021).

Apesar de toda essa diversificação de nomes, Kinupp e Lorenzi (2014) propuseram que essas plantas passassem a serem denominadas Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC), uma vez que esses termos mencionados acima podem restringir algumas plantas ou partes potencialmente comestíveis dos vegetais. Sendo assim, o termo PANC vem sendo relacionado às plantas que não estão disponíveis no circuito global de comercialização e possuem uma ou mais partes comestíveis, tais como raízes tuberosas, tubérculos, bulbos, rizomas, cormos, talos, folhas, brotos, flores, frutos e sementes, ou ainda látex, resina ou goma ou, indiretamente, quando são usadas para obtenção de óleo e gorduras alimentícias (KINUPP; DE BARROS, 2007; KINUPP; LORENZI, 2014). A partir dessa ampla definição, conseguimos incluir entre as PANC as plantas nativas, exóticas, cultivadas e espontâneas (LEAL; ALVES; HANAZAKI, 2018), além de partes não convencionais de vegetais convencionais (MOURA *et al.*, 2021). De acordo, com Mügge *et al.* (2021), a

maioria das PANC utilizadas atualmente, no Brasil, corresponde a plantas exóticas, introduzidas principalmente por portugueses e africanos, durante a colonização.

O consumo das PANC contribui significativamente para a nutrição humana, pois podem servir como fonte suplementar de macro e micronutrientes, além de compostos bioativos (SERRA MOURA *et al.*, 2021), despertando um interesse crescente e recente da população, principalmente da comunidade científica (MILIÃO *et al.*, 2022). Alguns estudos têm relatado que a composição nutricional dessas plantas pode ser semelhante, ou até mesmo superior, a algumas plantas convencionais, amplamente consumidas (KINUPP; LORENZI, 2014; SILVA *et al.*, 2018; DA CUNHA *et al.*, 2020). Kinupp e Barros (2008), ao avaliarem o teor de proteína em 69 espécies nativas consideradas PANC na região metropolitana de Porto Alegre no Rio Grande do Sul, verificaram que muitas espécies mostraram-se promissoras quanto à inserção na alimentação humana, com teor proteico superior ao das espécies convencionais de usos similares. Dentre essas espécies, destacaram-se a erva-moura (*Solanum americanum*), mestruz (*Coronopus didymus*) e urtiga (*Urtica circularis*). Os pesquisadores supracitados também identificaram frutos com baixos teores proteicos, como o Tarumã (*Vitex megapotamica*), que, em base seca, apresenta 2,07% de proteína e de ananá (*Ananas bracteatus*) com 2,93%. A identificação de PANC hipoproteicas torna-se pertinente, uma vez que essas espécies, frente a algumas convencionais, podem servir como alternativa alimentar para grupos específicos da população, que apresentam dieta restritiva, como os fenilcetonúricos.

No entanto, ainda há uma lacuna na literatura sobre as PANC e, por isso, estudos que explorem o potencial alimentício e bioativo dessas espécies tornam-se relevantes, uma vez que a falta de informações sobre utilização, forma de consumo, bem como seu potencial nutricional, dificultam o emprego destas espécies. Além disso, estudos que explorem esses fatores podem promover benefícios diversos à população, por meio, do fortalecimento e do resgate da cultura popular (JACOB *et al.*, 2020).

Nas seções seguintes, estão apresentados alguns aspectos botânicos sobre as PANC estudadas no presente trabalho.

3.1.1 Almeirão-de-árvore (*Lactuca canadensis* L.)

Conhecida popularmente como almeirão-de-árvore, almeirão-roxo, radite-cote, orelha-de-coelho (KINUPP; LORENZI, 2014) e/ou almeirão-serralha, a espécie *Lactuca*

canadensis L. pertence à divisão Tracheophyta; classe Magnoliopsida; ordem Asterales; família Asteraceae; tribo Cichorieae; gênero *Lactuca* (SIBBR, 2022a).

A família Asteraceae engloba mais de 24.000 espécies, que correspondem a aproximadamente 1.600 gêneros (FUNK *et al.*, 2009). O gênero *Lactuca* é o que apresenta maior distribuição na tribo Cichorieae, e ocorrendo principalmente na Ásia, Europa, África e América do Norte (LEBEDA; DOLEŽALOVÁ; NOVOTNÁ, 2012).

A espécie *Lactuca canadensis* L. é nativa do Canadá, Estados Unidos, México, Haiti e República Dominicana (GBIF, 2022a). No Brasil, o primeiro registro da espécie ocorreu em 1999. Atualmente, ela pode ser encontrada de forma subespontânea nas regiões Sul e Sudeste do país, principalmente nos estados: Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Paraná (KINUPP; LORENZI, 2014; BARREIRA *et al.*, 2015; MONGE *et al.*, 2016).

Caracterizada como herbácea anual, com caule ereto (altura de 0,5-2 metros), não ramificado, glabro, estriado, esverdeado com manchas arroxeadas, com folhas inicialmente rosuladas basais, na forma de lança, lobadas ou repicadas, na cor verde, com nervuras roxas e com inflorescências em capítulos (Figura 1). Com lígulas amarelas a *Lactuca canadensis* L. apresenta sabor amargo e pode ser consumida crua, em saladas, ou refogada (MICHALSKA; SZNELER; KISIEL, 2013; KINUPP; LORENZI, 2014; MONGE *et al.*, 2016; LIBERAL *et al.*, 2021).

Figura 1 – Almeirão-de-árvore (*Lactuca canadensis* L.)



Fonte: Dra. Marinalva Pedrosa (2022)

3.1.2 Azedinha (*Rumex acetosa* L.)

A *Rumex acetosa* L. é uma herbácea perene com caule fistuloso, ereto, estriado, frequentemente de coloração avermelhada, com 20-60 cm de altura, ela forma touceiras com dezenas de propágulos (Figura 2). Suas folhas crescem a partir de uma roseta central, são grandes, carnudas, verdes e longas com um cone franjado, na base lisas, de contorno ovalado. A inflorescência ocorre em panículas terminais longas, de cor marrom-avermelhada, com flores pequenas e discretas (SILVA *et al.*, 2013; KINUPP; LORENZI, 2014; BELLO *et al.*, 2019; KORPELAINEN; PIETILÄINEN, 2020).

Figura 2 - Azedinha (*Rumex acetosa* L.)



Fonte: Dra. Marinalva Pedrosa (2022)

Globalmente distribuída na Europa, América do Norte, África e Ásia (QAMAR *et al.*, 2018; BELLO *et al.*, 2019), a *Rumex acetosa* L. também pode ser encontrada no Brasil, onde naturalizou-se principalmente nos estados de Minas Gerais, em São Paulo e no Rio Grande do Sul (LIMA *et al.*, 2021).

Pertencente à divisão Tracheophyta; classe Magnoliopsida; ordem Caryophyllales; família Polygonaceae; gênero *Rumex* (SIBBR, 2022b), a *Rumex acetosa* L. é popularmente conhecida como azedinha, azedeira, doca-azedo, acetosa, oseille, azedinha-da-horta, azeda-brava (KINUPP; LORENZI, 2014), por apresentar folhas de sabor levemente azedo, que lembra o kiwi e o morango, devido ao elevado teor de ácido oxálico (BELLO *et al.*, 2019; KORPELAINEN; PIETILÄINEN, 2020). Normalmente, as folhas são consumidas

trituras em sopas, molhos, sucos e purês; refogada e/ou cruas, na forma de saladas (BRASIL, 2010a; SARTORI *et al.*, 2020).

3.1.3 Bertalha (*Basella alba* L.)

Basella alba L., frequentemente conhecida como bertalha, espinafre-de-malabar, espinafre-do-ceilão, couve-de-cerca, espinafre indiano, espinafre de videira, folha de tartaruga (BRASIL, 2010a; KINUPP; LORENZI, 2014; KUMORKIEWICZ; WYBRANIEC, 2017) é uma herbácea perene, ramificada, com hastes escandentes, um tanto carnosa, glabra, ramificada, de cor amarelo-esverdeado ou rosa avermelhado (a depender da variedade), com variação de 40 a 110 cm de comprimento (Figura 3). Com folhas pecioladas, simples, alternadas, inteiras, de lâmina brilhante, membranácea, ovadas e acuminadas, com base foliar cordada (KINUPP; LORENZI, 2014; DESHMUKH; GAIKWAD, 2020), apresenta sabor suave e textura mucilaginosa (SUSHILA *et al.*, 2010). A inflorescência ocorre em racemos espiciforme axilares, com flores pequenas, de cor branca (KINUPP; LORENZI, 2014). Já os frutos apresentam coloração roxa, com perianto carnoso e pericarpo fino, com cinco a seis mm de diâmetro (KUMORKIEWICZ; WYBRANIEC, 2017; DESHMUKH; GAIKWAD, 2020).

Figura 3 - Bertalha (*Basella alba* L.)



Fonte: Dra. Marinalva Pedrosa (2022)

Nativa da Ásia Tropical, provavelmente originária da Índia ou Indonésia (BAMIDELE *et al.*, 2010; SHEKHAWAT; MANOKARI, 2016), a *Basella alba* L. faz parte da divisão Tracheophyta; classe Magnoliopsida; ordem Caryophyllales; família Basellaceae; gênero *Basella* (SIBBR, 2022c).

No Brasil, a bertalha pode ser encontrada de norte a sul do país, principalmente nos seguintes estados: Pará, Bahia, Sergipe, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul (BRASIL, 2015; SIBBR, 2022c). Nesses estados as folhas da bertalhas são consumidas cruas em saladas, quando colhidas novas e tenras, ou refogadas, ou cozidas em sopas juntas com os talos e flores (KINUPP; LORENZI, 2014; BRASIL, 2015). Os frutos dessa espécie também são comestíveis, ricos em betacianinas e podem ser utilizados como corante natural (SAGAR *et al.*, 2022).

3.1.4 Capiçoba (*Erechtites valerianifolius* (Link ex Spreng.) DC)

Nativa do Brasil e também de outros países da América, como Argentina, Bolívia, Colômbia, Costa Rica, República Dominicana, Equador, México, entre outros (ROYAL BOTANIC GARDENS, 2022), a *Erechtites valerianifolius* (Link ex Spreng.) DC é vinculada a classe das Equisetopsida C. Agardh; subclasse Magnoliidae Novák ex Takht; ordem Asterales; família Asteraceae; gênero *Erechtites* (TROPICOS, 2022a).

Com ocorrência confirmada em praticamente todos os estados brasileiros, com exceção do Pará e Amapá (REFLORA, 2022a), a *Erechtites valerianifolius* (Link ex Spreng.) DC é vulgarmente conhecida como capiçoba, capiçova, capiçoba vermelha, erva-gorda, maria-gomes, caperiçoba-vermelha, caruru-amargoso, voadeira-preta ou erva gomes (ZAYAT; RANAL, 1997; KINUPP; LORENZI, 2014). Ela é consumida nessas regiões na forma de hortaliça, através do uso das folhas – que apresentam um sabor levemente amargo, mas que podem ser cozidas, com carne e molhos, refogadas, ou cruas, em saladas – e das flores jovens, que podem ser refogadas ou empanadas (KINUPP; LORENZI, 2014; BRASIL, 2015).

A capiçoba é uma herbácea anual, ereta, ramificada, com caules glabros a glabrescentes, grossos e semissuculentos, que podem atingir de 40 a 100 cm de altura. Possui folhas membranáceas, superfície abaxial glabra ao longo das nervuras; as flores de capítulos brancacentos são hermafroditas, pistiladas marginais unisseriadas ou sub-bisseriadas (Figura 4) (BRASIL, 2010a; FUNEZ *et al.*, 2021).

Figura 4 – Capiçoba (*Erechtites valerianifolius* (Link ex Spreng.) DC)



Fonte: Dra. Marinalva Pedrosa (2022)

3.1.5 Capuchinha (*Tropaeolum majus* L.)

Tropaeolum majus L., originária dos Andes, Bolívia, Peru, Colômbia e México (MELO *et al.*, 2018; JURCA *et al.*, 2020), é da divisão Tracheophyta; classe Magnoliopsida; ordem Brassicales; família Tropaeolaceae; gênero *Tropaeolum* (SIBBR, 2022d). No Brasil, a espécie foi naturalizada e está presente no Nordeste, principalmente na Bahia, e em todos os estados do Sudeste e do Sul (REFLORA, 2022b).

De sabor picante, devido à presença dos compostos bioativos glicosinolatos, especialmente isotiocianatos (DAL'RIO; MATEUS; SELDIN, 2022), a *Tropaeolum majus* L. é popularmente conhecida como capuchinha, capuchinha de jardim, agrião indiano, agrião monge chaguinha, capuchinha-grande, mastruço-do-peru, nastúrcio, chagas, papagaios ou flor-de-sangue (KINUPP; LORENZI, 2014; JAKUBCZYK *et al.*, 2018; SOUZA; LIBERATO; TEIXEIRA, 2021). Suas folhas e flores podem ser usadas no preparo de saladas, quando frescas, cozidas ou refogadas (KINUPP; LORENZI, 2014; SOUZA; LIBERATO; TEIXEIRA, 2021; XU *et al.*, 2021); seus frutos, quando imaturos, também são comestíveis e podem ser consumidos na forma de conservas, como de pickles e alcaparras (KINUPP; LORENZI, 2014).

A capuchinha é uma planta de pequeno porte, herbácea, formada por ramos rasteiros e retorcidos, que podem ser mantidos de forma rasteira ou trepadeira (Figura 5) (SOUZA; LIBERATO; TEIXEIRA, 2021). O caule é arredondado, de cor verde clara e pode atingir 1 cm de diâmetro e 5 metros de comprimento (ZANETTI; MANFRON; HOELZEL, 2004). Suas folhas são redondas, com bordas suaves, nervuras amarelo-esverdeadas e pecíolos longos, em média atingem 5-9 cm de diâmetros (KINUPP; LORENZI, 2014; JAKUBCZYK *et al.*, 2018). As flores são axilares, em forma de campânula, zigomorfa, com cinco pétalas, cíclica, hermafroditas; crescem fora dos ângulos das folhas em longos pedicelos, de coloração variada entre amarelo, laranja e vermelho; pode apresentar de 4 a 5 cm de largura (RIBEIRO *et al.*, 2011; JAKUBCZYK *et al.*, 2018). Os frutos são verdes claros, esquizocarpo, que se divide em três mericarpos sulcados (KINUPP; LORENZI, 2014; JAKUBCZYK *et al.*, 2018).

Figura 5 - Capuchinha (*Tropaeolum majus* L.)



Fonte: Dra. Marinalva Pedrosa (2022)

3.1.6 Chuchu-de-vento (*Cyclanthera pedata* (L.) Schrad.)

Chuchu-de-vento (*Cyclanthera pedata* (L.) Schrad.), também conhecido por bogaboga, cayo, taiuá-de-comer, chuchu-paulista, chuchu-do-reino, pepino-de-comer, pepino-dor, maxixe-do-reino, maxixe-peruano e caiguá (FERNANDES *et al.*, 2005; KINUPP; LORENZI, 2014), caracteriza-se como uma planta monoica, com caule cilíndrico e herbáceo, escandente, podendo atingir de 3 a 5 m de comprimento. Suas folhas membranáceas apresentam base cuneada e margem dentada e irregular, podendo atingir de 8 a 12 cm de comprimento; as flores são amarelo-claro, sendo as masculinas racemosas, campanuladas, formadas por 5 pétalas, que medem cerca de 5 mm comprimento e largura e possuem pedicelos de 1,5 cm de comprimento. Já as flores femininas são solitárias, curtamente pedunculadas de 1 mm de comprimento e largura. Os frutos são verdes, do tipo baga, estreitamente oblongo a elíptico, atingindo de 10 a 20 cm de comprimento e 3,5 a 10 cm de largura, apresenta uma polpa esponjosa, com sementes pequenas e escuras (Figura 6) (KLEIN; BRANDÃO; LACA-BUENDIA, 1989; SINGH *et al.*, 2015).

Figura 6 - Chuchu-de-vento (*Cyclanthera pedata* (L.) Schrad.)



Fonte: Dra. Marinalva Pedrosa (2022)

A *Cyclanthera pedata* (L.) Schrad faz parte da divisão Tracheophyta; classe Magnoliopsida; ordem Cucurbitales; família Cucurbitaceae; gênero *Cyclabthera* (SIBBR, 2022e) e tem origem na América do Sul, mais especificamente na região Andina (RIVAS *et al.*, 2013), composta pelos países Bolívia, Peru, Equador, Colômbia, Chile e Venezuela. No entanto, pode ser encontrada, cultivada ou em condições subespontânea em outros países, como Brasil, Argentina (FERNANDES *et al.*, 2005), sul do México, na área do Caribe

(MACCHIA *et al.*, 2009) e, até mesmo, no norte da Índia, onde foi introduzida (SINGH *et al.*, 2015).

No Brasil, habitualmente, são consumidos os frutos, as folhas e os brotos jovens do chuchu-de-vento (KINUPP; LORENZI, 2014). Os frutos jovens podem ser consumidos frescos, em saladas cruas ou em conservas, podendo também ser refogados. Já os frutos maduros, normalmente, são consumidos cozidos, recheados com carne e queijo, por exemplo, no entanto, também podem ser fritos, empanados e assados (ORSINI *et al.*, 2019). De acordo com Fernandes *et al.* (2005), o sabor desse fruto se assemelha ao do aspargo. Para o consumo das folhas e dos brotos jovens, é recomendado que faça primeiramente um branqueamento, pois elas apresentam textura firme e um leve amargo (KINUPP; LORENZI, 2014).

3.1.7 Jambu (*Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen)

Nativa da América do Sul, a *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen ocorre em todo o mundo, como na Ásia (China, Índia e Taiwan), América Central (México) e regiões da África (DA ROCHA *et al.*, 2018; SPINOZZI *et al.*, 2021). Naturalizada no Brasil, a *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen está presente em quase todos os estados brasileiros (REFLORA, 2022c), no entanto seu consumo prevalece na região amazônica, por ser comumente utilizada no preparo de pratos típicos, como o tacacá e o pato no tucupi (NEVES *et al.*, 2019).

De sabor pungente e com efeitos sensoriais únicos, devido ao espilantol que promove salivação e uma leve dormência na língua e nos lábios, a *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen também pode ser utilizada crua, em saladas e sucos, refogada, ou como tempero, funcionando como realçador de sabor (KINUPP; LORENZI, 2014; UTHPALA; NAVARATNE, 2021).

A *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen pertence à divisão Tracheophyta; classe Magnoliopsida; ordem Asterales; família Asteraceae; tribo Heliantheae; gênero *Acmella* (SIBBR, 2022f). Popularmente, é conhecida como jambu, embora outros nomes de caráter regional sejam utilizados, como agrião-do-pará, agrião-bravo, botão-de-ouro, jambuaçu, abecedária, agrião-do-Brasil, mastruço, agrião-do-norte, jaguaçú, erva-maluca e jagurama (FAVORETO; GILBERT, 2010; DE SOUZA *et al.*, 2019).

O jambu é uma planta herbácea, perene, aromática; com caules cilíndricos, carnosos e de ramos arroxeados decumbentes, de 20 a 60 cm de altura. As folhas são simples, opostas, membranáceas e pecioladas. As flores são dispostas em capítulo solitário de 1 cm,

são discoides, pequenas e amarelas (Figura 7) (FAVORETO; GILBERT, 2010; BATISTA *et al.*, 2021; SPINOZZI *et al.*, 2021).

Figura 7 - Jambu (*Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen)



Fonte: Dra. Marinalva Pedrosa (2022)

3.1.8 *Ora-pro-nóbis* (*Pereskia aculeata* Mill.)

A espécie *Pereskia aculeata* Mill. faz parte divisão Tracheophyta; classe Magnoliopsida; ordem Caryophyllales; família Cactaceae; gênero *Pereskia* (SIBBR, 2022g). É uma planta perene, semiereta, com característica de trepadeira, com ramos longos, escandentes, ramificados, com acúleos (falsos espinhos), que em ramos mais velhos crescem aglomerados (Figura 8) (BRASIL, 2010a; KINUPP; LORENZI, 2014). As folhas simples são tenras, moderadamente carnosas, com aproximadamente 7 cm de comprimento e 3 cm de largura, simétricas, elípticas, curto-pecioladas, agrupam-se nos ramos de duas a seis folhas (DUARTE; HAYASHI, 2005; SOUZA *et al.*, 2020). A inflorescência apresenta-se em racemos curtos e axilares, sendo as flores brancas e cerosas. Os frutos são do tipo baga, amarelos, globoso e com sementes pretas (BRASIL, 2010a; KINUPP; LORENZI, 2014).

Originária do Brasil, a *Pereskia aculeata* Mill também ocorre naturalmente no continente Americano, Sul e Sudeste da África, Nordeste e Sudeste da Austrália (EGEA; PIERCE, 2021; REFLORA, 2022d). No Brasil, é possível encontrar a espécie nas regiões

Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Sergipe); Centro-oeste (Goiás); Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) (REFLORA, 2022d).

Figura 8- Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.)



Fonte: Dra. Marinalva Pedrosa (2022)

É popularmente conhecida como ora-pro-nóbis, lobrobô, lobrobó, carne-de-pobre, mata-velha, guaiapá, mori, groselheira-das-antilhas, groselheira-da-américa e groselheira-de-barbados (KINUPP; LORENZI, 2014; BRASIL, 2015). A parte comestível mais comum são as folhas, que apresentam características mucilaginosas (EGEA; PIERCE, 2021). Elas, normalmente, são consumidas como salada fresca, em sopas, refogadas ou usadas como farinha (FREITAS *et al.*, 2022). No entanto, a combinação mais conhecida é com aves, como o tradicional prato “frango com ora-pro-nóbis” de Minas Gerais (BRASIL, 2010b). Apesar de as folhas serem as mais consumidas, as flores jovens também podem ser consumidas em saladas, assim como os frutos podem ser utilizados no preparo de sucos, geleias e licores (KINUPP; LORENZI, 2014).

3.1.9 Peixinho (*Stachys byzantina* K. Koch)

Consumida como hortaliça, as folhas da *Stachys byzantina* K. Koch podem ser utilizadas no preparo de sucos, refogados, sopa, omeletes e recheios diversos. Quando empanadas e fritas, apresentam sabor semelhante ao de peixe frito (BRASIL, 2010b) e devido a essa característica, popularmente, a espécie é conhecida como peixinho, peixinho-da-horta, lambari, orelha-de-lebre, orelha-de-cordeiro, falsa-pulmonária e pulmonária (KINUPP; LORENZI, 2014; SARTORI *et al.*, 2020).

Da classe das Equisetopsida, subclasse Magnollidae, subordem Asteranae, ordem Lamiales, família Lamiaceae, gênero *Stachys* (TROPICOS, 2022b), a espécie *Stachys byzantina* K. Koch tem origem na Turquia, na Armênia e no Irã (SARTORI *et al.*, 2020). No Brasil, a espécie é cultivada em locais de clima ameno das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (BRASIL, 2010a).

O peixinho é uma planta herbácea perene, apresenta de 20 a 40 cm de altura, densamente agrupada; é inteiramente revestida por denso indumento lanoso branco, suas folhas são simples, dispostas em forma de roseta basal, curto-pecioladas, de lâminas elipsoide ou espatulada, espessas, de 5 a 14 cm de comprimento e 2 a 3,5cm de largura a inflorescência é em formato de espigas densas, com flores róseas ou violetas (ROSSATO *et al.*, 2012; KINUPP; LORENZI, 2014) (Figura 9). Porém, dificilmente a *Stachys byzantina* K. Koch florescerá no Brasil, devido às condições climáticas do país (BRASIL, 2010a).

Figura 9- Peixinho (*Stachys byzantina* K. Koch)



Fonte: Dra. Marinalva Pedrosa (2022)

3.1.10 Taioba (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott)

De ocorrência natural no Brasil, a *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott é comumente conhecida como: taioba, taioba-verde, taioba-Brava, taioba-Mirim, taiá, taiobuçu, tannia, adão, cocó-bravo, costela-de-adão, mangarás, mangareto, mangarito, mirim, macabo e inhame-de-folha (KINUPP; LORENZI, 2014; LIM, 2015).

Essa espécie está entre as seis mais importantes culturas de raízes e tubérculos do mundo (BOAKYE *et al* 2018) e pertence à divisão Tracheophyta; classe Liliopsida; ordem Alismatales; família Araceae; gênero *Xanthosoma* (SIBBR, 2022h). Acredita-se que a *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott seja proveniente do norte da América do Sul e que tenha se espalhado para o Caribe e para a Mesoamérica, sendo posteriormente introduzida e cultivada na África, na Ásia e no Pacífico (LIM, 2015; WADA *et al.*, 2017; CALLE *et al.*, 2019).

Morfologicamente, a *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott se caracteriza como uma planta herbácea perene, desarmada, lactífera, com 1,5 a 2 m de altura, e com um rebento/caule subterrâneo principal em forma de rizoma. Esse rizoma é curto, grosso, globoso ou cilíndrico; externamente é marrom pálido, com a parte interna branca, amarelo pálido ou rosa; esse rizoma dá origem a ramificações laterais, conhecidas como cornis (LIM, 2015). Esses cornis, geralmente utilizados na alimentação humana, são consumidos cozidos, fritos ou triturados após a fervura (OWUSU-DARKO; PATERSON; OMENYO, 2014; CALLE *et al.*, 2019).

As folhas podem ser consumidas refogadas e se caracterizam por serem grandes, grossas, de coloração verde escura. Apresentam aproximadamente 90 cm de comprimento e 60 cm de largura; brotam do caule principal, são sagitadas, eretas, com ápices agudos e lobos basais largos, com nervos marginais proeminentes (Figura 10) (DE CHAVEZ *et al.*, 2014; LIM, 2015). A taioba, apesar de raramente florescer, apresenta flores unissexuais, que nascem em um espádice composto com flores femininas na base e as flores masculinas na parte superior (WADA *et al.*, 2021).

Geralmente, todas as partes da taioba (cornis, pecíolos, folhas e inflorescências) são comestíveis (BOAKYE *et al.*, 2018), no entanto só podem ser consumidas após o cozimento (WADA *et al.*, 2017). Por apresentar elevada acidez, ao ser ingerida crua, ráfides em forma de cristais de oxalato de cálcio causam inchaço dos lábios, da boca e da garganta, bem como amargor, sabor adstringente e coceira na boca e na garganta (OWUSU-DARKO; PATERSON; OMENYO, 2014; BOAKYE *et al.*, 2018).

Figura 10- Taioba (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott)



Fonte: Dra. Marinalva Pedrosa (2022)

3.1.11 Vinagreira (*Hibiscus sabdariffa* L.)

De origem ainda indefinida entre África Ocidental e Índia (ISLAM, 2019), a espécie *Hibiscus sabdariffa* L. pertence à classe da Equisetopsida; sub-classe Magnoliidae; ordem Malvales; família Malvaceae; gênero *Hibiscus* (TROPICOS, 2022c). A família das Malvaceae é composta por aproximadamente de 300 gêneros, sendo o gênero *Hibiscus* o maior, constituído por cerca de 250 a 300 espécies de arbustos, árvores e ervas distribuídas entre as regiões tropicais e subtropicais (WARNER; ERWIN, 2001; FAGUNDES; MASSUNAGA, 2016).

No Brasil, a espécie é cultivada de norte a sul (BRASIL, 2010a), sendo popularmente conhecida como vinagreira, rosela, azedinha, quiabo-azedo, quiabo-de-angola, hibisco, groselha, groselheira, caruru-azedo (BRASIL, 2010a; KINUPP; LORENZI, 2014).

É um subarbustode base lenhosa, ereto, anual, espesso e herbáceo, com poucas ramificações, de caule arroxeadado ou avermelhado e pode atingir de 2 a 2,5 m de altura (Figura 11). As folhas são simples, dispostas alternadamente, pecioladas, de lâmina inteira, glabrescentes, textura cartácea, verdes, com veias avermelhadas emargens dentadas, com 8 a 15 cm de comprimento. As flores são brancas a amarelo pálido, com uma mancha vermelha escura na base de cada pétala, são solitárias, axilares, curto-pendunculadas, com 8 a 10 cm de largura, de cálice carnosos, angulados, roxo/vermelho, com cinco grandes sépalas, com um colar (epicalyx) de 8 a 12 brácteas finas e pontiagudas, corola amarela, com o centro roxo. Os

frutos do tipo cápsula deiscentes ficam marrom e se abrem quando maduro e seco (DA-COSTA-ROCHA *et al.*, 2014; KINUPP; LORENZI, 2014; ISLAM, 2019).

Com sabor ácido, que mais lembra cranberry (*Vaccinium* spp.) (DA-COSTA-ROCHA *et al.*, 2014), a vinagreira apresenta praticamente todas suas partes comestíveis, no entanto, os cálices são os mais utilizados (SALAMI; AFOLAYAN, 2020). Os cálices frescos ou secos são utilizados no preparo de bebidas à base de plantas, bebidas quentes e frias, bebidas fermentadas, vinho, compotas, confeitos gelatinosos, sorvetes, chocolates, aromatizantes, pudins, bolos (IZQUIERDO-VEGA *et al.*, 2020) e até mesmo refrigerantes (SALAMI; AFOLAYAN, 2020). As folhas jovens e os caules tenros podem ser ingeridos crus, em uma salada, ou cozidos sozinhos ou com carne/peixe (RIAZ; CHOPRA, 2018). As sementes podem ser torradas, moídas e usadas para preparar óleos ou como substituto do café (DA-COSTA-ROCHA *et al.*, 2014; IZQUIERDO-VEGA *et al.*, 2020).

Figura 11- Vinagreira (*Hibiscus sabdariffa* L.)



Fonte: Dra. Marinalva Pedrosa (2022)

3.1.12 Vinagreira-roxa (*Hibiscus acetosella* Welw. ex Hiem)

Vinagreira-roxa, vinagreira, groselheira, quiabo-roxo e quiabo-azedo são nomes populares da espécie *Hibiscus acetosella* Welw. ex Hiem (KINUPP; LORENZI, 2014; CARDOSO *et al.*, 2018). Essa espécie faz parte da classe Equisetopsida; sub-classe Magnoliidae; ordem Malvales; família Malvaceae; gênero *Hibiscus* (TROPICOS, 2022d).

A *Hibiscus acetosella* Welw. ex Hiem tem origem no continente Africano, sendo possivelmente da Angola (KRAPOVICKAS; FRYXELL, 2004), mas é cultivada em todo o mundo, com registros em diversos países, como Brasil, Paraguai, Estados Unidos, Costa Rica, Quênia, entre outros (GBIF, 2022b).

Botanicamente, a espécie é classificada como planta arbustiva, de caule semi-lenhoso, avermelhado, glabro, ramos escandentes quando sombreado, podendo atingir 1,5 a 3 m de altura. As folhas são simples, de cor verde ou completamente roxas, com nervuras palmadas, lâmina cartácea, margem crenada a ondulada, ambos os lados glabros, 5-palmatilobada. As flores solitárias, axilares, curto-pendunculadas, pétalas roxo-avermelhadas, com cálice carnosos roxo. Fruto ovoide, do tipo cápsula angulada, com pelos glandulares, quase puntiformes (Figura 12) (KRAPOVICKAS; FRYXELL, 2004; CARDOSO *et al.*, 2018; DE CASTRO; DEVIDE, 2019; MANDAJI; PENA; CHISTÉ, 2022).

Figura 12- Vinagreira-roxa (*Hibiscus acetosella* Welw.ex Hiem)



Fonte: Dra. Marinalva Pedrosa (2022)

Apesar de ser amplamente cultivada no Brasil para fins ornamentais, a vinagreira-roxa é popularmente utilizada como verdura (MANDAJI; PENA; CHISTÉ, 2022). De sabor ácido, tenra e succulenta, as folhas são utilizadas para preparar alguns alimentos típicos, chás, bebidas frias, suplementos alimentares, sucos, saladas e geleias. As flores também podem ser consumidas na forma de saladas, diferentemente dos cálices, que não são tão succulentos e são, normalmente, utilizados após fervura ou cozimento (KINUPP; LORENZI, 2014; JEFFERY; RICHARDSON, 2021).

3.2 Digestão gastrointestinal *in vitro*

Os métodos de digestão *in vitro* são utilizados para avaliar as alterações estruturais, a digestibilidade, a biodisponibilidade e a bioacessibilidade dos nutrientes alimentares, bem como a liberação desses componentes ao longo da digestão. A biodisponibilidade está relacionada à fração do nutriente/biocomponente ingerido que chega à circulação sistêmica para ser distribuído aos órgãos e tecidos e manifestar sua bioatividade, que é a capacidade de um composto exibir um efeito biológico. Já a bioacessibilidade é definida como a fração de um nutriente/biocomponente disponível para absorção, através da camada epitelial do trato gastrointestinal. Essa definição inclui a liberação de compostos de matrizes alimentares e a estabilidade dos respectivos compostos sob o ambiente gastrointestinal (SANTOS *et al.*, 2019; DIMA *et al.*, 2020).

Compreender o destino dos alimentos durante a digestão no trato gastrointestinal tem despertado interesse crescente da comunidade científica, a fim de entender melhor os possíveis efeitos dos alimentos na saúde humana (BOHN *et al.*, 2018; DUPONT *et al.*, 2019; DUPONT; FERRANTI; MACKIE, 2019). A digestão nada mais é que um processo que desdobra os alimentos em nutrientes. Com o objetivo de entender esses processos, nas últimas décadas, vêm sendo desenvolvidas várias metodologias de digestão *in vitro*, sendo elas estáticas (MINEKUS *et al.*, 2014; BRODKORB *et al.*, 2019) semidinâmicas (MULET-CABERO *et al.*, 2020) e dinâmicas (MINEKUS *et al.*, 1995; DUPONT *et al.*, 2019). Essas metodologias *in vitro* são interessantes e antecedem estudos *in vivo*, já que estudos com humanos e animais são muito caros, trabalhosos, apresentam restrições éticas, nem sempre têm viabilidade técnica e são associados à baixa repetibilidade, devido a variações individuais (LI *et al.*, 2020; TAN; ZHOU; MCCLEMENTS, 2022).

Esses modelos têm como objetivo simular as condições fisiológicas do trato gastrointestinal, sendo divididos em fases oral, gástrica e intestinal, e cada um apresenta vantagens e desvantagens particulares. Diferem, principalmente, na incorporação de vários estágios de digestão, pH, tempos de digestão, natureza das enzimas digestivas e concentrações de eletrólitos e ácidos biliares, o que dificulta a comparação de resultados entre métodos (WOJTUNIK-KULESZA *et al.*, 2020). Dentro dos métodos estáticos, que são aqueles que trabalham com proporções constantes de amostras, eletrólitos, pH, enzimas, temperatura e agitação, destaca-se o método harmonizado e padronizado INFOGEST (MINEKUS *et al.*, 2014; BRODKORB *et al.*, 2019). Esse método é relativamente simples de ser executado e apresenta boa reprodutibilidade intra e interlaboratorial, robustez, baixo custo quando

comparado com modelos dinâmicos e boa correlação com métodos *in vivo*. No entanto, apresenta algumas limitações, como: não conseguir simular a dinâmica complexa da digestão ou as interações fisiológicas, além de serem inadequados para análise de cinética detalhada das diferentes fases da digestão (BRODKORB *et al.*, 2019).

Quanto aos métodos semidinâmicos, Mulet-Cabero *et al.* (2020) desenvolveram e padronizaram uma metodologia, incluindo alguns aspectos dinâmicos, baseada no modelo INFOGEST. Este modelo incluiu acidificação gradual, secreção de fluidos, secreção de enzimas e esvaziamento do estômago, o que fornece uma representação mais realista do comportamento dos alimentos no estômago humano do que o modelo estático, podendo ser considerado um modelo intermediário, quando comparado aos modelos dinâmicos. No entanto, alguns parâmetros, como quantidade de alimento, número de alíquotas de esvaziamento gástrico, velocidade de mistura, devem ser fixados para cada ensaio de digestão, o que pode trazer variabilidade entre diferentes laboratórios (MULET-CABERO *et al.*, 2020).

Os métodos de digestão dinâmica foram desenvolvidos para atender à necessidade de um modelo que pudesse simular os processos bioquímicos e mecânicos que ocorrem durante a digestão gástrica humana de maneira fisiologicamente relevante (DUPONT *et al.*, 2019). De forma geral esses modelos são projetados para controlar as composições de fluidos, atividades enzimáticas, níveis de pH e forças mecânicas nas diferentes regiões do trato gastrointestinal de forma contínua (TAN; ZHOU; MCCLEMENTS, 2022). No entanto esses métodos são mais complexos, demorados, podem utilizar grandes quantidades de enzimas sendo, portanto menos acessíveis do que os modelos estáticos (MULET-CABERO *et al.*, 2020).

Diante do exposto, ressalta-se a importância de pesquisas que abordem esses parâmetros, uma vez que, a maior parte dos estudos negligencia os efeitos da digestão gastrointestinal sobre a composição dos alimentos.

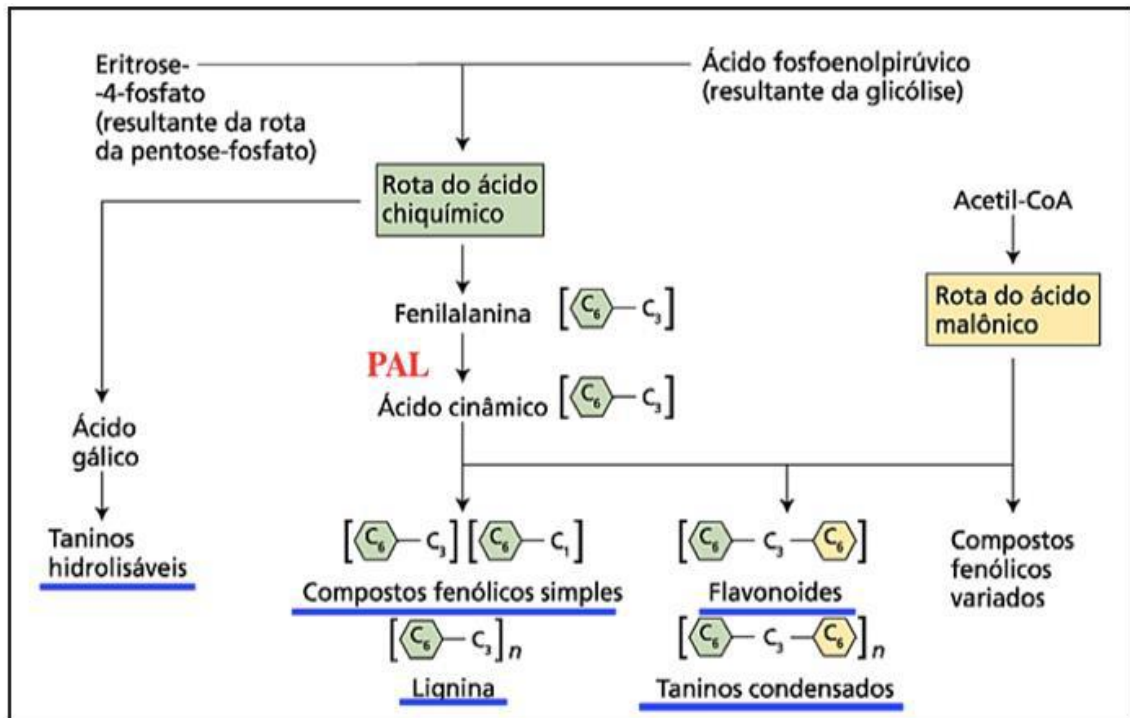
3.3 Compostos fenólicos

3.3.1 Digestão gastrointestinal de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são um grupo de moléculas amplamente distribuídas em todo o reino vegetal. Conhecidos como metabólitos secundários das plantas, são sintetizados durante o desenvolvimento normal da planta, em resposta a situações de estresse (LERI *et al.*, 2020). A biossíntese desses compostos pode ocorrer, por meio de diferentes vias, sendo as

principais a via de síntese do chiquimato e do metabolismo dos fenilpropanóides (Figura 13) (WOJTUNIK-KULESZA *et al.*, 2020).

Figura 13 – Biossíntese dos polifenóis, via do ácido chiquímico



Fonte: Barreto; Gaspi; Oliveira (2020)

Os polifenóis são moléculas que apresentam um ou mais anéis aromáticos, com pelo menos um grupo hidroxila, sendo que essas estruturas podem variar de moléculas simples a complexas. E, apesar da falta de consenso na literatura, podem ser classificadas em flavonóides e não flavonóides (DURAZZO *et al.*, 2019; LERI *et al.*, 2020) ou em flavonóides, ácidos fenólicos, estilbenos, taninos e lignanas. Dentro do grupo dos flavonóides, estão integrados os subgrupos flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavanonas e antocianidinas (KIM; KEOGH; CLIFTON, 2016; WOJTUNIK-KULESZA *et al.*, 2020).

Esses compostos estão presentes nos vegetais, principalmente como ésteres, glicosídeos e polímeros que, geralmente, são ligados à fração de carboidratos e não podem ser absorvidos nas formas nativas (TARKO; DUDA-CHODAK; ZAJAC, 2013; THAKUR *et al.*, 2020). Estimativas demonstram que, de todos os polifenóis ingeridos durante a alimentação, 48% são digeridos no intestino delgado e 42% no intestino grosso, sendo que até 10% podem permanecer intactos dentro da matriz alimentar (TARKO; DUDA-CHODAK; ZAJAC, 2013; WOJTUNIK-KULESZA *et al.*, 2020).

Para que os polifenóis sejam absorvidos durante a digestão gastrointestinal, eles requerem hidrólise, que pode ocorrer por consequência do ambiente ácido do estômago, ambiente do intestino, pela ação das enzimas do sistema digestivo ou pela microbiota intestinal (KONG; SINGH, 2010; THAKUR *et al.*, 2020). Essas condições são capazes de promover diversas alterações na estrutura dessas moléculas, como metilação, dimerização, hidroxilação e glicosilação, bem como formação de derivados fenólicos pela degradação parcial da estrutura molecular (WOJTUNIK-KULESZA *et al.*, 2020).

Diante do exposto, entender o processo de digestão de polifenóis é complexo, uma vez que diversos fatores exercem influência sobre a digestibilidade desse fitoquímico. Dentre esses fatores, podemos citar: características da matriz alimentar (TARKO; DUDA-CHODAK, 2020), a interação dos polifenóis com outros componentes do alimento, como, por exemplo, as fibras alimentares (PALAFOX-CARLOS; AYALA-ZAVALA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2011; JAKOBEK; MATIĆ, 2019), o tamanho da partícula, o equilíbrio hidrofílico/lipofílico relacionado à glicosilação (WOJTUNIK-KULESZA *et al.*, 2020), as interações relacionadas ao processamento e ao pH (NAGAR *et al.*, 2021) e também as propriedades físico-químicas individuais dos polifenóis (ALMINGER *et al.*, 2014).

Devido às suas propriedades antioxidantes, o consumo de polifenóis vem sendo associado a diversos efeitos benéficos à saúde, como a prevenção de doenças cardiovasculares, câncer, doenças inflamatórias, doenças neurodegenerativas e distúrbios gastrointestinais (THAKUR *et al.*, 2020). Dessa forma, estudos que buscam entender e compreender melhor os efeitos da digestão gastrointestinal *in vitro* sobre os polifenóis presentes nos vegetais tornam-se cada vez mais relevantes.

3.3.2 Estresse oxidativo e atividade antioxidante

O estresse oxidativo pode ser definido como o excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em relação à defesa antioxidante (SHANKAR; MEHENDALE, 2014). Dessa forma, o estresse oxidativo refere-se ao desequilíbrio entre a cascata antioxidante celular e os processos que geram espécies reativas de oxigênio (EROs), como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion hidroxila (OH^-) (EL-FAWAL, 2011).

A saturação ou o comprometimento desses processos antioxidantes resulta no acúmulo de EROs, o que promove danos oxidativos, que afetam várias moléculas intracelulares ou extracelulares, tais como ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos ou

lipídios, ou mesmo outras moléculas fisiologicamente importantes (MINE; ROY, 2011). Para neutralizar os efeitos nocivos, os organismos usam mecanismos de proteção, reparo e de defesa antioxidante (RAHAL *et al.*, 2014). Esses mecanismos antioxidantes podem ser endógenos, com moléculas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. O grupo enzimático inclui superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, já o grupo não enzimático envolve glutathione, tioredoxina, vitaminas A, E e C e selênio (CENINI; LLORET; CASCELLA, 2019). No entanto, moléculas antioxidantes exógenas, como ácido ascórbico, α -tocoferol, flavonóides e carotenoides também podem atuar no mecanismo de defesa antioxidante (BERNAUD; FUNCHAL, 2011).

De modo conceitual, os antioxidantes podem ser definidos como qualquer composto que, quando presente no alimento ou no corpo humano em concentrações baixas, quando comparadas ao substrato oxidativo, seja capaz de bloquear, retardar, controlar ou prevenir os processos de oxidação (BEDLOVIČOVÁ *et al.*, 2020). Os compostos antioxidantes inibem a reação oxidativa, atuando como doadores de hidrogênio ou receptores de radicais livres, gerando elementos mais estáveis (MUNTEANU; APETREI, 2021).

Para determinar a capacidade antioxidante de compostos presentes em alimentos, existe uma ampla gama de métodos que quantificam a capacidade antioxidante por diferentes mecanismos. Alguns métodos, por exemplo, são baseados na reação de transferências de elétrons ou de hidrogênio; outros são projetados para avaliar a capacidade de inibir a formação de EROs ou a quelatação de íons metálicos (MARTINELLO; MUTINELLI, 2021). Esses métodos podem ser divididos em dois grandes grupos: transferência de elétrons de átomos de hidrogênio (HAT) e transferência de um único elétron (SET) (CHAVES; SANTIAGO; ALÍAS, 2020).

No mecanismo HAT, o radical livre remove um átomo de hidrogênio do antioxidante, convertendo o radical livre em um produto mais estável. No mecanismo SET, o antioxidante doa um elétron para o radical livre, reduzindo os intermediários oxidados para a forma estável (TENA; MARTÍN; ASUERO, 2020). A tabela 1 apresenta as diferentes técnicas utilizadas para medir a capacidade antioxidante em amostras de alimentos.

Tabela 1 – Métodos para avaliação da capacidade antioxidante

| Mecanismo | Método | Princípio do Método | Determinação do Produto Final |
|---|--|---|--|
| Transferência de elétrons de átomos de hidrogênio (HAT) | BCB (Branqueamento com ácido β -caroteno-linoleico) | O ácido linoleico é oxidado por radicais livres, produzidos pela água oxigenada. Os produtos iniciarão a oxidação do β -caroteno e, à medida que a molécula perde suas ligações duplas, o composto perde sua cor laranja característica | Espectrofotometria na região do visível |
| | TRAP (Parâmetro antioxidante total de captura de radicais) | Mede a capacidade de inibição dos antioxidantes na proteção do branqueamento da crocina, pelo gerador de radicais livres AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano) dicloridrato) | Espectrofotometria na região do visível |
| | TOSC (Ensaio de capacidade de eliminação de radicais oxirradicais) | Inibição da formação de etileno na presença de compostos antioxidantes que competem com o ácido α -ceto- γ -betiolbutírico por espécies reativas de oxigênio | Capacidade do antioxidante de inibir a formação de etileno em relação a uma reação de controle |
| | ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio) | Reação antioxidante com radicais peroxil, induzida por 2,2'-azobis-2-amidino-propano | Perda de fluorescência de fluoresceína |
| | HORAC (Capacidade Antioxidante Radical Hidroxila) | Capacidade antioxidante para extinguir os radicais OH gerados por um sistema tipo Fenton baseado em Co(II) | Perda de fluorescência de fluoresceína |
| Transferência de um único elétron (SET) | DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil) | Reação antioxidante com um radical orgânico. Decaimento da absorbância na presença de antioxidante | Espectrofotometria na região do visível |
| | FRAP (Poder Antioxidante Redutor Férrico) | Reação antioxidante com um complexo de Fe (III) | Espectrofotometria na região do visível |
| | ABTS (2,2 AZINO-BIS (3- | Reação antioxidante com | Espectrofotometria na região do visível |

| Mecanismo | Método | Princípio do Método | Determinação do Produto Final |
|-----------|--|-------------------------------|--|
| | ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) | um radical de cátion orgânico | |
| | CRUPRAC Antioxidante Cúprica) | (Potência Redutora | Redução de Cu (II) a Cu (I) por antioxidantes |
| | RP (Método de redução de energia) | | Espectrofotometria na região do visível |
| | Compostos fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) | | Reação de transferência de elétrons/ transferência de átomos de hidrogênio |
| | | | Espectrofotometria na região do visível |
| | | | Redução do reagente Folin-Ciocalteu (complexo dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico) com compostos fenólicos em estado alcalino |
| | | | Espectrofotometria na região do visível |

Fonte: Adaptado Chaves *et al.* (2020); Martinello *et al.* (2021); Munteanu; Apetrei (2021)

Deve-se enfatizar que a capacidade antioxidante não deve ser testada com base em um único método. Vários procedimentos antioxidantes devem ser realizados *in vitro* para determinar as capacidades antioxidantes da amostra de interesse (MUNTEANU; APETREI, 2021). Considerando essa recomendação, neste estudo, foram utilizados três métodos, o método FRAP; ABTS e o DPPH, que, de acordo com Rufino *et al.* (2010), são as técnicas mais amplamente utilizadas.

Para uma caracterização mais detalhada dos compostos antioxidantes presentes em espécies vegetais, técnicas analíticas instrumentais podem ser utilizadas, como a cromatografia gasosa, cromatografia líquida e eletroforese capilar, combinadas ou não com espectrometria de massas (MS) (GE; LI; LISAK, 2020). Em geral, essas técnicas são sensíveis, seletivas e fornecem dados qualitativos e quantitativos precisos, apesar de apresentarem alto custo analítico e exigirem trabalhoso preparo de amostra (SILVA *et al.*, 2019). Nesse sentido, técnicas de espectrometria de massa com fonte de ionização ambiente como ionização por *eletrospray* (ESI) (PARANAVITANA *et al.*, 2021), dessorção e ionização por *eletrospray* (DESI) (PEREZ; CONCEIÇÃO; IFA, 2021) e a ionização por *paper spray* (PS) (SILVA *et al.*, 2020a) vêm sendo utilizadas, por se mostrarem eficientes na superação dessas limitações, pois fornecem análises ultrarrápidas de matrizes complexas, com baixo custo e preparo mínimo das amostras (SILVA *et al.*, 2020c).

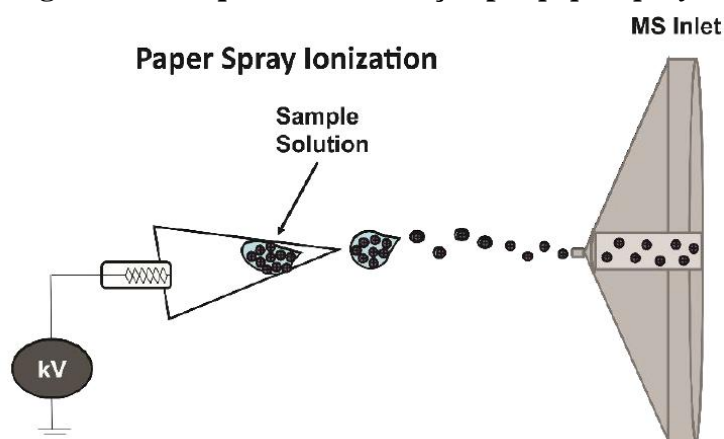
A seguir, é apresentada uma breve introdução à espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS), que foi a técnica selecionada para a identificação dos compostos fenólicos neste estudo.

3.3.3 Espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS)

A espectrometria de massa (MS) é uma das técnicas analíticas mais sensíveis com aplicabilidade na identificação e quantificação de uma grande variedade de compostos. Resumidamente, a análise MS consiste na geração de íons na fonte de ionização e na separação de íons com base em sua relação massa/carga (m/z), em um analisador de m/z via efeito de campo elétrico ou magnético, seguida da detecção de íons (DA SILVA *et al.*, 2019). Nesse sentido, a fonte de ionização desempenha um papel importante na MS e, dentre tantas técnicas de ionização, destaca-se a técnica de ionização ambiente *paper spray* (PS).

Essa técnica, descrita pela primeira vez em 2010 (LIU *et al.*, 2010), baseia-se na aplicação de uma voltagem a um pedaço de papel triangular, pré-carregado com uma amostra e um solvente de extração (COSTA *et al.*, 2021). A alta voltagem empregada no papel resulta em um evento de ionização do tipo eletrospray (MCBRIDE *et al.*, 2019). Ou seja, campo elétrico induz a formação de um *spray* na forma de um cone de Taylor (COSTA *et al.*, 2021), onde os íons são formados em solução e o forte campo elétrico na ponta do papel resulta na formação de uma pluma de gotículas carregadas, que são desolvatadas e direcionadas ao espectrômetro de massa (Figura 14) (DA SILVA *et al.*, 2019). McBride *et al.* (2019) destacam que a alta tensão aplicada geralmente varia de 2 a 5,5 kV, e pode ser positiva ou negativa.

Figura 14 – Esquema de ionização por *paper spray*



Fonte: Adaptado Da Silva et al. (2019)

Considerada uma ferramenta poderosa para a ciência e para a tecnologia de alimentos a PS-MS, permite análises quantitativas rápidas e altamente precisas (SHEN *et al.*, 2013), além de análises qualitativas, por meio, da avaliação dos espectros obtidos em uma grande faixas de massa (SILVA *et al.*, 2021). A identificação de compostos bioativos no PS-MS, normalmente é realizada após intensa busca manual de espectros de MS para pesquisar os íons precursores, para posteriormente combinar os padrões de fragmentação com os relatados na literatura, uma vez que os bancos de dados atualmente disponíveis são muitas vezes incompletos (CERRATO *et al.*, 2020). Desta forma, as identificações de polifenóis em matrizes vegetais geralmente é limitada a compostos que já foram relatados na literatura.

Apesar disso, a técnica PS-MS vem sendo amplamente explorada em análises qualitativas de matrizes alimentícias como, os frutos cagaitas (SILVA *et al.*, 2019), grumixama (RAMOS *et al.*, 2020), cambuí (GARCÍA *et al.*, 2021) e pequi (SANTOS *et al.*, 2022), bebidas industrializadas (SILVA *et al.*, 2020a), sorgo (CAMPELO *et al.*, 2020), araticum (RAMOS *et al.*, 2023), entre outras.

3.4 Minerais

Classificados como nutrientes essenciais, os minerais são subdivididos em macrominerais e microminerais. Na classe dos microminerais temos o ferro (Fe), selênio (Se), cobre (Cu) e zinco (Zn), manganês (Mn), cobalto (Co), molibdênio (Mo), flúor (F), cromo (Cr) e boro (B). Já na classe dos macrominerais enquadram-se o cálcio (Ca), fósforo (P), sódio (Na), potássio (K), magnésio (Mg) e o enxofre (S) (GHARIBZAHEDI; JAFARI, 2017).

Os minerais desempenham papéis fundamentais na manutenção das funções metabólicas do corpo humano, e devem ser ingeridos em quantidades suficientes através da dieta (DRAGO, 2022). No entanto, a quantidade fornecida pela dieta pode não ser o suficiente para atender as necessidades nutricionais, se a biodisponibilidade dos minerais for baixa (SILVA *et al.*, 2020b).

Considerando uma dieta rica em vegetais, os fatores que afetam negativamente a bioacessibilidade dos minerais incluem a forma química do nutriente nos alimentos e/ou natureza da matriz alimentar; interações entre nutrientes e outros antinutrientes, como ácido fítico, fibra alimentar e polifenóis (ROUSSEAU *et al.*, 2020; AFFONFERE *et al.*, 2021). A parede celular dos vegetais também pode atuar como uma barreira física que reduz a digestibilidade da matriz alimentar, e por consequência também reduzir a bioacessibilidade de minerais (ROUSSEAU *et al.*, 2020; SULAIMAN; GIVENS; ANITHA, 2021).

Thakur *et al.* (2020) ao realizarem trabalho de revisão, mostraram que há indícios na literatura que indicam que o aumento da bioacessibilidade de minerais pode ser alcançado por tratamento térmico, devido ao amolecimento, liberação de minerais ligados a proteínas da matriz alimentar, e pelo fato de que o próprio processo de tratamento térmico reduz os teores de inibidores de solubilidade, como oxalatos, fitatos, taninos e compostos fenólicos.

3.4.1 *Quantificação de minerais*

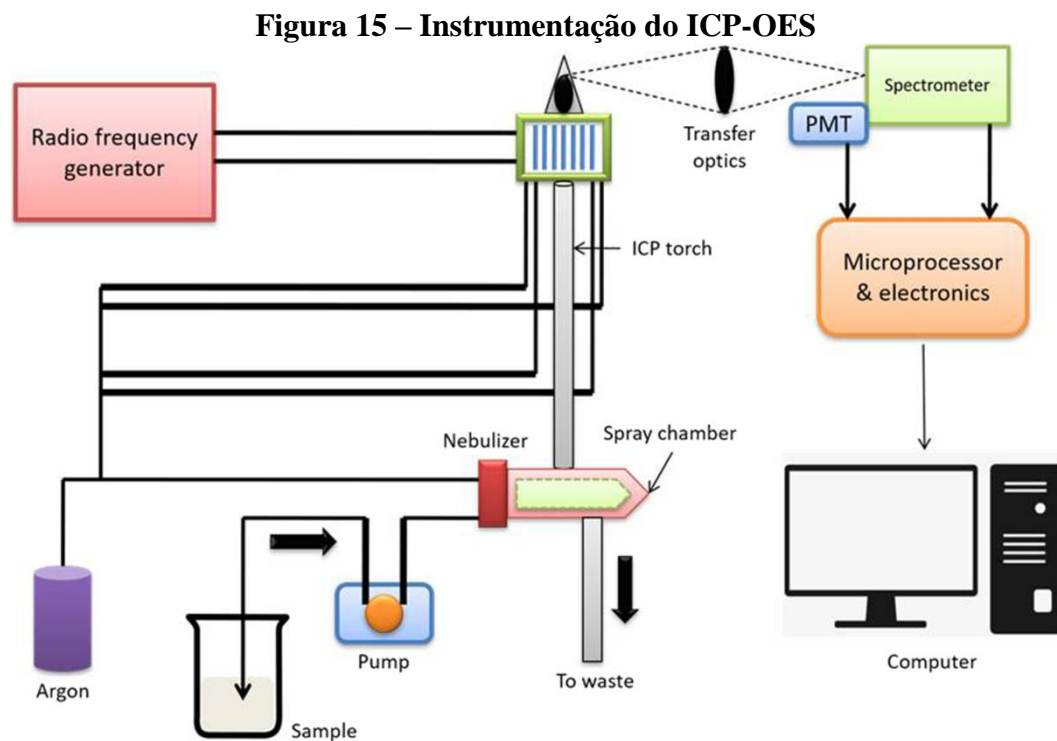
Espectroscopia atômica, nuclear e de massas como a Espectroscopia de Absorção Atômica (AAS), Espectrometria de Fluorescência de Raios-X (XRF), Análise Instrumental de Ativação de Nêutrons (INAA), Espectrometria de Emissão Óptica de Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) e Espectrometria de Massa de Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS), são técnicas comumente utilizadas para investigar a composição mineral em amostra de alimentos (MARKIEWICZ-KESZYCKA *et al.*, 2017).

Dentre tantos métodos analíticos para quantificação de minerais, destaca-se a Espectrometria de Emissão Óptica de Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES), que é uma técnica multielementar, rápida e precisa que combina qualidades como limite de detecção relativamente baixos, alta capacidade para determinações simultâneas e precisas em tempos curtos em amplas faixas de concentração (LARREA-MARÍN *et al.*, 2010; SELMI *et al.*, 2021). Embora apresente essas vantagens a técnica ICP-OES requer um preparo laborioso de amostras sólidas. Esse preparo consiste no processo de digestão ácida, onde a amostra é mineralizada em forno mufla, com auxílio ácido nítrico para posterior dissolução em ácido clorídrico (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). No entanto, técnicas de digestão ácida assistida por micro-ondas também são utilizadas, com o intuito de otimizar o processo de mineralização das amostras (DA SILVA *et al.*, 2020; GARITTA *et al.*, 2021).

Resumidamente, no ICP-OES, a amostra é transportada para o instrumento como um fluxo de amostra líquida, é injetada em direção ao canal central de plasma de argônio induzido por radiofrequência. Dentro de instrumento, o líquido é convertido em aerossol através de um processo conhecido como nebulização, o aerossol da amostra é então transportado para o plasma onde é dessolvatado, vaporizado, atomizado e excitado e/ou ionizado pelo plasma (KHAN *et al.*, 2022). Quando os átomos excitados retornam à posição de baixa energia, os raios de emissão (raios do espectro) são liberados e aqueles que correspondem ao comprimento de onda do fóton são medidos. O tipo de elemento é

determinado com base na posição dos raios de fótons, e o conteúdo de cada elemento é determinado com base na intensidade dos raios (GHOSH *et al.*, 2013; SELMI *et al.*, 2021).

O plasma é criado em um dispositivo especial chamado “tocha”. Uma bobina de cobre envolve a parte superior da tocha e é conectada a um gerador de radiofrequência. A oscilação de radiofrequência da corrente na bobina produz um intenso campo eletromagnético no topo da tocha. À medida que o fluxo de gás de plasma é introduzido na tocha, uma faísca de alta tensão é aplicada a esse gás, gerando a ionização colisional do gás de argônio e, conseqüentemente, o plasma (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, 2018). A Figura 15 apresenta o layout de equipamento de ICP-OES.



Fonte: Khan *et al.* (2021)

3.5 Proteína

As proteínas são polímeros constituídos basicamente de aminoácidos, apresentam-se sob inúmeras formas e tamanhos, podem ser classificadas por sua composição, estrutura, função biológica ou propriedades de solubilidade (CHANG; ZHANG, 2017; FERNANDES; OLIVEIRA, 2021). Consideradas um macronutriente essencial, desempenham papel vital no crescimento e manutenção do corpo humano, que juntamente com os carboidratos e lipídios fornece energia na dieta (MÆHRE *et al.*, 2018; SARKAR *et al.*, 2020).

As proteínas são um componente abundante em todas as células e, quase todas, exceto as proteínas de armazenamento, são importantes para as atividades enzimáticas, funções biológicas e estrutura celular (CHANG; ZHANG, 2017). As proteínas na forma de anticorpos são cruciais para a defesa imunológica, enquanto as proteínas estruturais ajudam a definir a compartimentação e a organização celular e subcelular. Essas proteínas fornecem suporte físico ou funcionam como transportadores de membrana que permitem a passagem de metabólitos e de sais (KAMBHAMPATI *et al.*, 2019).

Dessa forma, para manter todas essas funções, é importante fornecer ao organismo uma quantidade suficiente de proteínas através da dieta, por meio da ingestão de proteína animal e vegetal (SARKAR *et al.*, 2020). No entanto, em alguns casos específicos, como os dos pacientes fenilcetonúricos, o consumo de proteína é restrito (BASSANINI *et al.*, 2019).

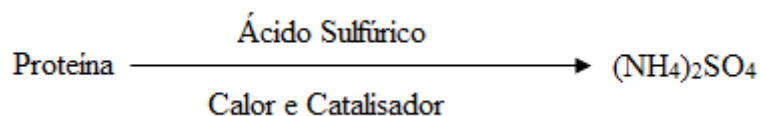
Dada a importância das proteínas, diversas metodologias de quantificação de proteína em alimentos vêm sendo difundidas. Entre elas, destacam-se: métodos baseados em nitrogênio, como o método Kjeldahl e o método Dumas; métodos colorimétricos, como o método de ligação de corantes, ligação de corantes Bradford, métodos baseados em íons de cobre, método do Biureto, método Lowry, método do ácido Bicinconínico; método de absorção ultravioleta; métodos de espectroscopia de infravermelho (CHANG; ZHANG, 2017); métodos cromatográficos de quantificação de aminoácidos e espectrometria de massa de razão isotópica (KAMBHAMPATI *et al.*, 2019).

No entanto, apesar das muitas metodologias propostas, o método de Kjeldahl é o mais utilizado, sendo considerado o método de referência “padrão ouro” na quantificação do teor de proteína em amostras de alimentos (SÁEZ-PLAZA *et al.*, 2013; MARTÍN; SARRIA; ASUERO, 2017).

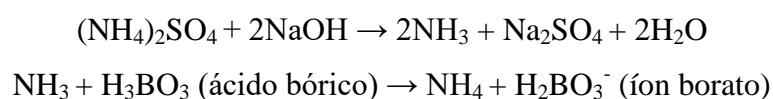
3.5.1 Método Kjeldahl

O método Kjeldahl envolve a digestão de alimentos com um ácido forte para que o nitrogênio seja liberado e, então, quantificado, usando uma técnica de titulação (HAYES, 2020). Esse método consiste nas três etapas descritas a seguir (CHANG; ZHANG, 2017; MARTÍN; SARRIA; ASUERO, 2017; SÁEZ-PLAZA; GARCÍA ASUERO; MARTÍN, 2019).

- **Digestão ácida:** Nesta etapa, a amostra é colocada em contato com ácido sulfúrico, com catalisadores e na presença de calor. Assim, o nitrogênio orgânico total é convertido em amônio (Equação 1).



- Neutralização e Destilação: A digestão é diluída com água e neutralizada com álcali, e a amônia formada é destilada em uma solução de ácido bórico, contendo os indicadores verde de bromocresol e vermelho de metila (Equação 2).



- Titulação: O ânion borato, formado na destilação, é titulado com ácido padronizado (HCl), que é convertido em nitrogênio na amostra (Equação 3).



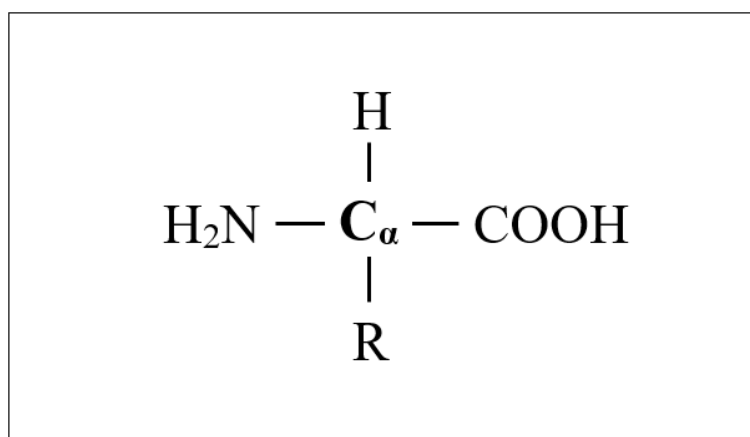
O resultado da análise representa o teor de proteína bruta do alimento, uma vez que o nitrogênio também vem de componentes não proteicos (CHANG; ZHANG, 2017). Assim, o teor de proteína é estimado, multiplicando o teor de nitrogênio por um fator de conversão de nitrogênio em proteína, geralmente definido como 6,25, que é o equivalente a 0,16g de nitrogênio por grama de proteína (SÁEZ-PLAZA; GARCÍA ASUERO; MARTÍN, 2019). Este fator de conversão geral é usado para a maioria dos alimentos, porque seu conteúdo não proteico é insignificante, no entanto, outros fatores de conversão podem ser utilizados de acordo com a matriz alimentícia, como 5,60 para peixes; 5,40 para cereais; 4,70 para farinhas (HAYES, 2020). No Brasil, a Instrução Normativa N° 75 de 8 de outubro de 2020, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, recomenda a utilização de três fatores de conversão, sendo de 5,75 para proteína de origem vegetal; 6,38 para proteínas lácteas; 6,25 para proteínas da carne, misturas de proteínas, proteína de soja e de milho (BRASIL, 2020).

3.6 Aminoácidos

Como mencionado no tópico anterior os aminoácidos são os blocos básicos de construção das proteínas teciduais, no entanto, também são precursores de muitas substâncias de baixo peso molecular como poliaminas, glutatona, creatina, carnitina, carnosina, hormônios tireoidianos, serotonina, melanina, melatonina entre outros (WU, 2013; ZHANG *et al.*, 2022).

Quimicamente os aminoácidos pertencem à classe dos compostos orgânicos contendo carbono α conectado a quatro grupos funcionais: uma amina primária ($-\text{NH}_2$) ou amina secundária ($-\text{NH}$), um grupo carboxila ($-\text{COOH}$), e um grupo hidrogênio (H), juntamente com uma cadeia lateral variável (R) (Figura 16) (MARCONE *et al.*, 2020; VIOLI *et al.*, 2020). Como os quatro grupos ligados ao carbono α são diferentes, o carbono α torna-se um centro assimétrico ou centro quiral (BHAGAVAN; HA, 2015) e com base na quiralidade, os aminoácidos podem ser divididos em enantiômeros dextrógiros (D) ou levógiros (L) (MARCONE *et al.*, 2020).

Figura 16 - Estrutura geral de α -aminoácidos com o grupo R representando a cadeia lateral variável



Fonte: Adaptado Violi *et al.* (2020)

Além da classificação pela quiralidade, os aminoácidos também podem ser categorizados em grupos de acordo com a polaridade e pH, em aminoácidos ácidos e básicos, apolares (hidrofóbicos) e polares (hidrofílicos) devido às variações nos grupos de cadeia lateral (BHAGAVAN; HA, 2015; LESTARI *et al.*, 2022). Outro esquema de categorização é baseado na posição amina da cadeia lateral, a variação na cadeia lateral separa os aminoácidos em aromáticos, que são aqueles que possuem um anel aromático na cadeia lateral; aminoácidos alifáticos, que apresentam uma cadeia lateral linear composta por carbonos; e

aminoácidos de cadeia ramificada, que são os que possuem uma cadeia lateral linear alifática com um carbono ramificado (VIOLI *et al.*, 2020).

A função biológica e as necessidades dietéticas também são usadas para classificar os aminoácidos. Desta forma, os aminoácidos podem ser classificados em essenciais e não essenciais. Os aminoácidos essenciais são os aminoácidos que humanos e outros vertebrados não conseguem sintetizar a partir de intermediários metabólicos, desta forma, devem ser fornecidos por uma dieta exógena, já os aminoácidos não essenciais o corpo humano pode sintetizar usando apenas os aminoácidos essenciais (LOPEZ; MOHIUDDIN, 2022).

Embora existam centenas de aminoácidos encontrados na natureza, apenas cerca de 20 aminoácidos são necessários para produzir todas as proteínas encontradas no corpo humano (LOPEZ; MOHIUDDIN, 2022; ZHANG *et al.*, 2022). Esses 20 aminoácidos são todos L-enantiômeros e com exceção da glicina, todos esses aminoácidos possuem um carbono α -quiral (VIOLI *et al.* 2020). Os 20 aminoácidos são: alanina (Ala), arginina (Arg), asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp), cisteína (Cys), ácido glutâmico (Glu), glutamina (Gln), glicina (Gly), histitina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr), triptofano (Trp) e valina (Val) (BHAGAVAN; HA, 2015; LOPEZ; MOHIUDDIN, 2022).

Desses 20 aminoácidos, nove são considerados essenciais, sendo eles a fenilalanina, valina, triptofano, treonina, isoleucina, metionina, histidina, leucina e lisina (BHAGAVAN; HA, 2015; VIOLI *et al.*, 2020; XIAO; GUO, 2022). Desses nove aminoácidos essenciais, quatro (histidina, leucina, metionina, triptofano), também são considerados “aminoácidos funcionais”, juntamente com os aminoácidos não essenciais arginina, cisteína e tirosina. “Aminoácidos funcionais” são aqueles indicados como os aminoácidos que mais contribuem para regular as principais vias metabólicas responsáveis pela melhoria do estado de saúde como um todo (VARFAJ *et al.*, 2022).

Devido às diversas funções relacionadas ao metabolismo humano, os níveis de aminoácidos em amostras clínicas têm sido utilizados para dar indicações sobre o estado de saúde dos indivíduos, podendo serem usados para a identificação de diversas doenças como a fenilcetonúria. A fenilcetonúria é caracterizada pelo acúmulo de fenilalanina no sangue e por consequência seu tratamento baseia-se principalmente na restrição dietética do referido aminoácido (MINIGHIN *et al.*, 2022).

Desta forma, a identificação e a análise quantitativa dos aminoácidos em amostras clínicas e também nos alimentos são de grande importância para o diagnóstico precoce e

acompanhamento de diversas doenças. Várias abordagens analíticas têm sido usadas para detectar aminoácidos incluindo cromatografia gasosa (GC), eletroforese capilar (CE), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massa/HPLC (HPLC/MS) (ZHANG *et al.*, 2022).

3.6.1 Quantificação de aminoácidos

Os primeiros métodos de quantificação de aminoácidos de proteínas puras foram publicados pela primeira vez em 1948 e 1951 por Stanford Moore e William Stein (MOORE; STEIN, 1951, 1948). O método baseia-se na hidrólise ácida da proteína em ambiente livre de oxigênio a uma temperatura de 110°C por 22 horas, para posterior separação dos aminoácidos livres por cromatografia de troca iônica (MOORE; STEIN, 1951, 1948). De modo geral, a análise precisa de aminoácidos é difícil e trabalhosa, e apesar do progresso considerável da ciência nas últimas décadas em relação à cromatografia e etapa de hidrólise permanece praticamente inalterada (RUTHERFURD; GILANI, 2009).

3.6.1.1 Hidrólise

O objetivo da hidrólise é quebrar as ligações peptídicas que mantêm os aminoácidos ligados às proteínas (RUTHERFURD; GILANI, 2009). Essa liberação pode ocorrer via digestão enzimática ou hidrólise química, no entanto, a digestão enzimática raramente é usada, pois é um procedimento mais caro e complicado, com evidências sugerindo que a contaminação por aminoácidos das enzimas é possível devido à autodigestão (VIOLI *et al.*, 2020). Apesar disso, a seleção cuidadosa de proteases mistas com especificidade de alto e amplo espectro para clivagens de ligações peptídicas pode promover melhores resultados para os aminoácidos ácido glutâmico, glutamina, ácido aspártico e asparagina das proteínas (DAI *et al.*, 2014).

A hidrólise química pode ser dividida em ácida e alcalina (VIOLI *et al.*, 2020). A hidrólise alcalina normalmente ocorre com o uso de soluções alcalinas, que podem ser de: hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de lítio (LiOH), hidróxido de bário (Ba(OH)₂) a uma temperatura de 105 a 110 °C por 20 a 24 horas (DAI *et al.*, 2014). Destaca-se que durante a hidrólise alcalina os aminoácidos arginina, asparagina,

cisteína, cistina, glutamina, metionina, serina e treonina são substancialmente decompostos enquanto o triptofano é preservado (DAVIDSON, 2003; DAI *et al.*, 2014).

O método padrão de hidrólise ácida consiste na incubação da amostra em um ambiente sem oxigênio com ácido clorídrico (HCl) concentrado 6 M, em ebulição constante a 110°C por 18 a 24 horas (RUTHERFURD; GILANI, 2009). O ambiente com baixo teor de oxigênio é importante para evitar a oxidação, desta forma, muitas vezes a hidrólise é realizada sob vácuo ou na presença de um gás inerte, como nitrogênio ou argônio (VIOLI *et al.*, 2020).

Apesar de a hidrólise ácida ser o método de hidrólise mais comumente usado, não existe um método único que clive totalmente todas as ligações peptídicas em uma amostra em aminoácidos únicos completamente e quantitativamente (DAVIDSON, 2003; VIOLI *et al.*, 2020). Durante a hidrólise ácida, a glutamina, a asparagina e a cisteína são convertidas em ácido glutâmico, ácido aspártico e cistina respectivamente, enquanto o triptofano é degradado (JAUDZEMS; FUERER, 2022).

Desta forma, certos aminoácidos requerem condições modificadas para evitar perdas durante o processo de hidrólise, por exemplo, o fenol pode ser adicionado para prevenir a halogenação da tirosina durante a hidrólise ácida (JAUDZEMS; FUERER, 2022), assim como a redução no tempo de hidrólise pode preservar os aminoácidos fosforilados (VIOLI *et al.*, 2020).

A integridade da hidrólise de proteínas é afetada por muitos fatores, incluindo matriz de amostra, bem como temperatura, tempo, reagentes e aditivos de hidrólise, assim a escolha dos métodos para hidrólise de proteínas depende do tipo de amostra, objetivos do estudo, instalação e disponibilidade de reagentes (DAI *et al.*, 2014).

A tabela 2 apresenta de forma resumida as variações dos métodos de hidrólise de proteína aqui apresentados.

Tabela 2 - Métodos para hidrólise de proteínas em aminoácidos individuais

| Reagente de hidrólise | Condições de hidrólise | Aditivo químico | Aminoácidos a determinar |
|------------------------|-------------------------------|--|---|
| Hidrólise ácida | | | |
| HCl 6 M | 110°C, 24 h sob nitrogênio | Nenhum | Todos os aminoácidos exceto asparagina, glutamina e triptofano |
| HCl 6 M | 110°C, 24h | 0,02% de Fenol | Todos os aminoácidos exceto asparagina, glutamina e triptofano e cisteína |
| HCl 6 M | 110°C, 24 h, fase gasosa | 0,02% de Fenol e 4,8% de β -mercaptoetanol | Todos os aminoácidos exceto asparagina, glutamina e |

| Reagente de hidrólise | Condições de hidrólise | Aditivo químico | Aminoácidos a determinar |
|-----------------------|---|--|--|
| | | | triptofano e cisteína |
| HCl 6 M | 110°C, 24h | 0,2% de NaN ₃ e 0,02% de fenol | Todos os aminoácidos exceto asparagina, glutamina e triptofano |
| HCl 6 M | 110°C, 18h ou 24h | 0,05% Fenol + 5% de ácido tioglicólico e 0,05% de ácido 3,3'-ditiodipropiônico | Todos os aminoácidos exceto asparagina, glutamina e triptofano |
| HCl 6 M | 110°C, 24h | 0,4% β-mercaptoetanol | Todos os aminoácidos exceto asparagina e glutamina |
| HCl 6 M | 166°C, 25 min ou 145°C, 4 h | 3% Fenol | Todos os aminoácidos exceto asparagina e glutamina |
| HCl 6 M | 145°C, 4 h | 0,2% 3-(2-aminoetil)indol | Todos os aminoácidos exceto asparagina e glutamina |
| HCl 6 M | 145°C, 4 h, fase gasosa | 1 mg de 3-(2-aminoetil)indol /mg de proteína | Todos os aminoácidos exceto asparagina e glutamina |
| HCl 6 M | 145°C, 4 h | Amostras protegidas por ácido perfórmico | Cisteína, lisina e metionina |
| HCl 6 M | 110°C, 24h | Proteína pré-tratada com bis(1,1-trifluoroacetoxi)iodobenzeno | Asparagina e glutamina |
| HCl 6 M | Reator especialmente projetado | 3-Bromopropilamina 16 mM | Cisteína |
| HCl 5,7 M | 150°C, 90 min | Ácido perfórmico a 50°C, 10 min | Todos os aminoácidos exceto asparagina, glutamina e triptofano |
| HCl-AP (1:1) 12 M | 150°C, 90 min | Nenhum | Todos os aminoácidos exceto asparagina, glutamina e triptofano e cisteína |
| HCl-AP (1:1) 12 M | Micro-ondas, 800 W, 6–8 min | Nenhum | Todos os aminoácidos exceto asparagina, glutamina e triptofano e cisteína |
| HCl-ATF (2:1) 6 M | 120°C, 16h | Isopropanol 3,4% e ácido ditiodiglicólico 0,17% | Todos os aminoácidos exceto asparagina, glutamina e triptofano |
| HCl-ATF (2:1) 6 M | 166°C, 25 ou 50 min | 5% de ácido tioglicólico | Todos os aminoácidos exceto asparagina e glutamina |
| HCl, 10% ATF 7 M | 166°C, 15 min | Ácido tioglicólico a 20% e 3-(2-aminoetil) indole a 0,5% | Todos os aminoácidos exceto asparagina e glutamina |
| HCl 6 M | Micro-ondas, 900 W, 155°C, 4 min fase líquida | 0,02% de fenol e 0,2% de 3-(2-aminoetil)indol | Todos aminoácidos exceto asparagina, glutamina e triptofano, cisteína, serina e treonina |

| Reagente de hidrólise | Condições de hidrólise | Aditivo químico | Aminoácidos a determinar |
|---------------------------|---|---|--|
| HCl 6 M | Micro-ondas 1000 W, 5 min e 500 W 15 min, 155 °C, fase gasosa | 0,02% de Fenol | Todos aminoácidos exceto asparagina, glutamina e triptofano, cisteína, serina e treonina |
| HCl 6 M | Micro-ondas, 250–800 W, 5–8 min | Proteína pré-tratada com bis(1,1-trifluoroacetoxi)iodobenzeno | Glutamina |
| AMS 4M | 110°C, 24 h, fase líquida | 0,2% 3-(2-aminoetil)indol | Todos os aminoácidos exceto asparagina, glutamina e triptofano e cisteína |
| AMS4M | 110°C, 24h | 0,2% NaN ₃ | Todos os aminoácidos exceto asparagina, glutamina e triptofano |
| AMS 4M | 115°C, 22h | Amostras protegidas por alquilação e 0,2% de triptamina | Todos os aminoácidos exceto asparagina e glutamina |
| AMS 4M | 160°C, 45 min | 0,2% 3-(2-aminoetil)indol e ácido mercaptoetanossulfônico 3 M | Todos os aminoácidos exceto asparagina e glutamina |
| AMS4M | 150°C, 90 min | Ácido per fórmico a 50°C, 10 min | Todos os aminoácidos exceto asparagina e glutamina |
| ATS3M | 110°C, 22h | Nenhum | Metionina sulfóxido |
| AMS3M | 176°C, 25 min, fase gasosa | Nenhum | Todos os aminoácidos exceto asparagina, glutamina e cisteína |
| AMES2,5 M | 176°C, 12,5 min | Amostras <i>S-piridiletiladas</i> | Todos os aminoácidos exceto asparagina e glutamina |
| ATS3M | Micro-ondas, 2450 MHz, 15 min | Nenhum | Todos os aminoácidos exceto asparagina, glutamina e cisteína |
| D ₂ O | Micro-ondas, potência média, 30 min | Nenhum | Cisteína e triptofano |
| Hidrólise alcalina | | | |
| NaOH 4,2 M | 105°C, 20h | 1% tioglicol | Triptofano |
| NaOH 4,2 M | 110°C ou 135 °C, 24 h | 4,2% de amido ou 4% de tioglicol | Triptofano |
| Ba(OH) ₂ 4 M | 110°C, 70h | Nenhum | Triptofano |
| LiOH4 M | 110–120°C, 22–26 h | Nenhum | Triptofano |
| KOH5 M | 155°C, 30–60 min ou 110°C, 18 h | Nenhum | Triptofano |
| KOH5 M | 155°C, 35 min | Nenhum | Fosfotirosina |
| KOH3 M | 105°C, 4h | Nenhum | Fosfohistidina |
| KOH1 M | 55°C, 2h | Nenhum | Fosfoaminoácidos |

| Reagente de hidrólise | Condições de hidrólise | Aditivo químico | Aminoácidos a determinar |
|---|--------------------------|--|--|
| Hidrólise enzimática | | | |
| Proteases no trato gastrointestinal | 37°C, 2 e 4 h por etapas | Fluido luminal trato gastrointestinal de suínos jovens | Glutamina, ácido glutâmico, ácido aspártico e asparagina |
| Proteases imobilizadas | 37°C, 18–24 h | Na-fosfato 50 mM, pH 7,5 | Hidrólise quase completa |
| Pronase | 55°C, 12–16 h | Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 | D-aminoácidos |
| <i>Drosophila</i> (Enzima conversora de angiotensina I) | 37°C, 15–30 min | Tampão MES 0,1 M, pH 6,4 | Argenina |
| Proteases mistas | 37°C, 24h | Tampão HEPES 0,1 M, pH 7,5 | Glutamina, ácido glutâmico, ácido aspártico e asparagina |
| Termolisina | 55°C, 3h | NaOH diluído (pH 8,0) | Hidrólise parcial |
| Tripsina e subtilisina | 30°C, 24h | Tampão NH ₃ HCO ₃ , pH 9 | Hidrólise parcial |

HCl - Ácido clorídrico; NaN₃ - Azodeto de sódio; AP - Ácido propiônico; ATF - Ácido trifluoroacético; AMS - Ácido metanossulfônico; ATS - Ácido p-toluenossulfônico; AMES - Ácido mercaptoetanossulfônico; D₂O - Cloreto de deutério; NaOH - Hidróxido de sódio; Ba(OH)₂ - Hidróxido de bário; LiOH - Hidróxido de lítio; KOH - Hidróxido de potássio; NH₃HCO₃ - Bicarbonato de amônio.

Fonte: Adaptado Dai *et al.* (2014)

3.6.1.2 Métodos analíticos para análise de aminoácidos

Vários métodos analíticos foram desenvolvidos para a determinação de aminoácidos em alimentos nas últimas décadas, no entanto, de acordo com Bui *et al.* (2023) existem três conjuntos de métodos bem documentados para análise de aminoácidos. A primeira técnica consiste em usar a cromatografia líquida de interação hidrofílica e troca iônica para determinação de aminoácidos não derivatizados. A segunda técnica implica em utilizar reagente de derivatização específico para melhorar a volatilidade e estabilidade térmica do aminoácido para aplicação da cromatografia gasosa. E a terceira baseia-se na aplicação de um reagente cromóforo ou fluoróforo para aumentar as hidrofobicidades do aminoácido para cromatografia líquida de fase reversa usando detectores de ultravioleta ou de fluorescência (BUI *et al.*, 2023). Apesar dos métodos cromatográficos se destacarem, técnicas de separação não cromatográfica também têm sido usadas, mas com menos frequência, sendo a mais proeminente a eletroforese capilar (JASTRZEBSKA *et al.*, 2022).

Apesar das diversas metodologias, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é de longe a técnica mais implementada, pois pode ser usada para a análise

qualitativa e quantitativa de aminoácidos (DAI *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2020). Porém Qiu *et al.* (2020), destacam que a detecção, separação e quantificação precisa de aminoácidos utilizando métodos convencionais de CLAE/UV de fase reversa são difíceis devido à fraca retenção, má separação e limites de detecção limitados, pois os aminoácidos apresentam alta polaridade e baixa absorção ultravioleta (UV), com exceção dos aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina) (FERRÉ; GONZÁLEZ-RUIZ; GUILLARME, 2019). Para superar esses desafios, os métodos requerem a etapa de derivatização dos aminoácidos, que pode ocorrer pré ou pós-coluna a fim de aumentar a sensibilidade de detecção fotométrica e separação cromatográfica (DAI *et al.*, 2014; JASTRZEBSKA *et al.*, 2022).

A adição de grandes grupos funcionais baseados em carbono altera a polaridade dos aminoácidos e permite que eles interajam com as fases estacionárias da cromatografia líquida de fase reversa. A fase reversa utiliza fases estacionárias não polares e fases móveis polares para reter e separar analitos com base em suas propriedades físicas e químicas. As colunas C18 são a escolha mais comum de fase estacionária, com a fase móvel contendo combinações de água e metanol ou acetonitrila (VIOLI *et al.*, 2020).

3.6.1.3 Derivatização

Dado que a maioria dos aminoácidos não possui grupos funcionais naturais de absorção de UV ou fluorescência, a derivatização química tornou-se uma maneira eficaz de aumentar a sensibilidade da detecção de aminoácidos (XU *et al.*, 2020; GOTTI *et al.*, 2022). Desta forma, a derivatização química pode melhorar a retenção de aminoácidos, modificando os grupos funcionais nos analitos com reagentes de derivatização química (QU *et al.*, 2022).

Durante a derivatização, o agente de derivatizante desejado reage com a amina ou o grupo carboxila dos aminoácidos ou, em alguns casos, ambos (VIOLI *et al.*, 2020). Embora a maioria dos aminoácidos tenha apenas um grupo funcional adicional após a derivatização, alguns aminoácidos possuem aminas adicionais ou grupos carboxila em sua cadeia lateral, que podem estar relacionados a múltiplos derivados (JASTRZEBSKA *et al.*, 2022).

Alguns dos reagentes de derivatização mais comuns são: *O*-ftaldialdeído (OPA); fenilisotiocianato (PICT); 1-cloreto de dimetilaminonaftaleno-5-sulfonil (Dansyl-Cl); cloroformato de 9-fluorenilmetilo (FMOC); *N,N*-dietil-2,4-dinitro-5-fluoroanilina (FDNDEA); 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (FDNB); 1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-1-alanina amida (FDNPAA); 6-aminoquinolil-*N*-hidroxissuccinimidil carbamato (AQC); etoxi metileno malonato de dietila (DEEMM) (FERRÉ; GONZÁLEZ-RUIZ; GUILLARME, 2019; XU *et*

| Parâmetro | OPA | PITC | Dansyl | FMOC | FDNEA | FDNB | FDNPAA |
|--|-----------|--------|--------|------|--------|--------|--------|
| Derivada estável | Não | Sim | Sim | Sim | Sim | Sim | Sim |
| Produtos secundários interferentes | Não | Não | Sim | Não | Sim | Sim | Sim |
| Interferência por contaminantes no eluente | Não | Sim | Sim | Não | Não | Não | Não |
| Aminoácidos secundários detectados | Não | Sim | Sim | Sim | Sim | Sim | Sim |
| Detecção | FL | 254 mn | FL | FL | 360 mn | 365 mn | 340 mn |
| Sensibilidade | pmol | pmol | pmol | fmol | pmol | pmol | pmol |
| Reprodutibilidade | Muito bom | Bom | Bom | Bom | Bom | Bom | Bom |

Abreviaturas- OPA: *O*-ftaldialdeído; PITC: Fenilisotiocianato; Dansyl: Cloreto de 5-dimetilamino-1-naftalenosulfonilo; FMOC: Cloroformato de 9-fluorenilmetilo; FDNEA: *N,N*-dietil-2,4-dinitro-5-fluoroanilina; FDNB: 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno; FDNPAA: 1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-1-alanina amida; FL = Fluorescência; mn= Minhas náuticas

Fonte: Adaptado Ferré *et al.* (2019)

O procedimento de derivatização pode ser realizado usando três abordagens principais: o modo de derivatização pós-separação, comumente usado em cromatografia líquida; o modo de pré-separação usado em cromatografia líquida, cromatografia gasosa e eletroforese capilar; e em modo capilar, restrito a eletroforese capilar (FERRÉ; GONZÁLEZ-RUIZ; GUILLARME, 2019). No presente estudo, foi utilizada a derivatização pré-separação, esse tipo de derivatização pode contribuir para a redução da polaridade dos aminoácidos, melhorando assim a separação (GOTTI *et al.*, 2022). Neste caso, devem ser utilizados reagentes derivatizantes que apresentem porções hidrofóbicas com grupos funcionais úteis como cadeias fenil, ésteres ou alquil (FERRÉ; GONZÁLEZ-RUIZ; GUILLARME, 2019). Já, a derivatização pós-separação aumentar a detectabilidade do aminoácido para absorção ou detecção por espectroscopia de fluorescência, sem influência no mecanismo de separação anterior sendo a maior vantagem a redução do tempo de preparação da amostra, sem alterar a eficiência cromatográfica (FERRÉ; GONZÁLEZ-RUIZ; GUILLARME, 2019). Porém, normalmente esse procedimento requer instrumentação mais complexa, apresenta alta sensibilidade à luz e mudanças de pH e temperatura (DAI *et al.*, 2014).

Devido à complexidade da análise de aminoácidos em seu estado nativo, a derivatização permite uma redução no tempo gasto no desenvolvimento do método e na análise da amostra, porém nenhum método é perfeito para análise de todos os aminoácidos, e a seleção de uma técnica analítica depende do tipo de amostra, objetivos do estudo, instalação e disponibilidade do reagente (DAI *et al.*, 2014; VIOLI *et al.*, 2020).

3.7 Triângulo de composição de alimentos da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC)

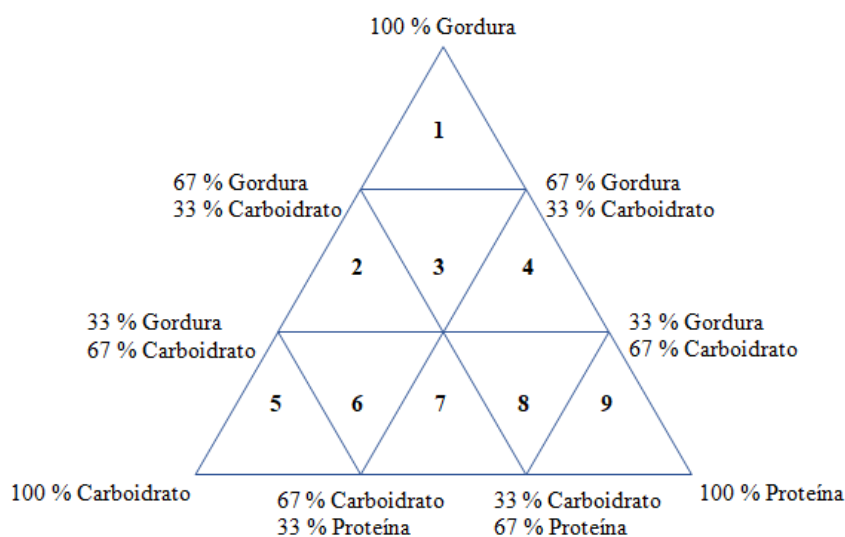
Em 1993, a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), desenvolveu um sistema organizacional de matriz alimentar baseado na composição de macronutrientes de matrizes alimentares para demonstrar a aplicabilidade de um método analítico a uma variedade de alimentos (AOAC, 1993).

Esse sistema organizacional é conhecido como “Triângulo de Composição de Alimentos da AOAC”. Esse triângulo consiste em nove setores com base no teor de proteína, gordura e carboidrato (AOAC, 1993). Wolf e Andrews (1995) explicam que os principais componentes de um alimento que determinam sua composição química básica são a composição aproximada de gordura, proteína, carboidrato, cinza e umidade. As variações no teor de cinzas, embora afetem potencialmente as determinações minerais, em geral têm uma influência menor nos métodos analíticos para outros constituintes dos alimentos. A quantidade de umidade, embora influencie muitos procedimentos analíticos, geralmente pode ser controlada por secagem ou pela adição de água durante o procedimento. Assim, os principais componentes que influenciam o desempenho analítico são os níveis relativos de gordura, proteína e carboidrato nas amostras analíticas, e é por esse motivo que o triângulo da AOAC se baseia nesses três macrocomponentes (WOLF; ANDREWS, 1995).

Estes componentes são graficamente representados por meio de um triângulo, onde cada vértice representa 100% de cada macronutriente e o lado oposto 0 %. Esse triângulo é subdividido em nove setores que servem para agrupar os alimentos de acordo com sua composição química básica (AOAC, 1993). A Figura 18 representa o Triângulo de Composição de Alimentos da AOAC, pelo qual todos os alimentos podem ser organizados de acordo com seus níveis relativos desses três macrocomponentes alimentares.

Com base na premissa do Triângulo, a seleção de uma ou duas matrizes alimentares pertencentes ao mesmo setor, são representativas de outros alimentos dentro desse setor e, se um método analítico fornece resultados precisos para os alimentos testados, também deve fornecer resultados precisos para os outros alimentos do mesmo setor (AOAC, 1993; WOLF; ANDREWS, 1995; SHARPLESS *et al.*, 2004, 2007; WISE; PHILLIPS, 2019).

Figura 18 - Triângulo da AOAC baseado no teor de proteína, gordura e carboidrato



Fonte: Adaptado AOAC (1993)

3.8 Validação de métodos analíticos

O bom desempenho de qualquer técnica analítica depende principalmente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento (RIBEIRO *et al.*, 2008). Uma forma de assegurar esses parâmetros é utilização e aplicação da validação de métodos, uma vez que, a validação de métodos é projetada para fornecer evidências suficientes de que o procedimento analítico atende aos seus objetivos (ICH, 2022).

No Brasil, a validação de métodos analíticos é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio, da RDC N° 166 de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017) e pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO) através da Coordenação Geral de Acreditação do INMETRO (CGCRE), que é responsável pela publicação do documento de caráter orientativo DOQ-CGRE-008 (INMETRO, 2020).

Como a RDC N° 166 de 24 de julho de 2017 é aplicável a métodos analíticos empregados em insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos em todas as suas fases de produção (BRASIL, 2017), a discussão a seguir será baseada nas diretrizes do INMETRO (INMETRO, 2020).

De acordo com o INMETRO, validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (INMETRO, 2020). Desta forma, deve-se realizar a validação em

métodos não normalizados; em métodos criados ou desenvolvidos pelo próprio laboratório; em métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos; e em ampliações e modificações de métodos normalizados (EURACHEM, 2014; INMETRO, 2020). A validação também se faz necessária quando se pretende demonstrar a equivalência dos resultados obtidos por dois métodos, por exemplo, um método recém desenvolvido e um método normalizado/regulamentador existente (EURACHEM, 2014).

Existem duas abordagens principais para a validação de um método analítico, a abordagem de comparação interlaboratorial e a abordagem intralaboratorial. Já a abordagem interlaboratorial envolve a análise de uma mesma amostra ou amostras idênticas, pelo mesmo método de ensaio, em diferentes laboratórios, para determinar os parâmetros de desempenho do método (repetitividade e reprodutibilidade). Já as abordagens intralaboratoriais, correspondem a estudos analíticos que envolvem um único laboratório, utilizando um mesmo método, para analisar a mesma ou diferentes amostras, sob diferentes condições, em um intervalo de tempo justificado (SOUZA, 2007; MIAW *et al.*, 2014).

Desta forma, validar um método é um procedimento demorado, que requer um grande número de experimentos analíticos e cálculos estatísticos (RIBEIRO *et al.*, 2008), além de um relatório de validação que deve apresentar de forma clara os seguintes parâmetros de desempenho, quando aplicável:

- Seletividade;
- Linearidade / Faixa de trabalho / Faixa linear de trabalho / Sensibilidade;
- Limite de Detecção (LD);
- Limite de Quantificação (LQ);
- Tendência/Recuperação;
- Precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade) (INMETRO, 2020).

3.8.1 Seletividade

A seletividade é a extensão na qual um procedimento analítico pode determinar analito(s) particular(es) em mistura(s) ou matriz(es) sem a interferência de outros componentes de comportamento semelhante (MAPA, 2014). Ou seja, é a capacidade de discriminar o analito de outros componentes interferentes (SOUZA, 2007).

A análise de seletividade envolve ensaios com padrões ou material de referência, amostras com e sem analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes (INMETRO, 2020).

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Esses interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, comprometendo o resultado. Adicionalmente, a magnitude desse efeito também pode depender da concentração. Logo, no estudo de seletividade é necessário verificar também a existência de efeito de matriz (INMETRO, 2020).

Para avaliar efeito de matriz em situações em que não se tem uma amostra de referência e nem uma matriz sem o analito disponível deve-se seguir o seguinte procedimento:

- Procedimento: Preparar duas curvas analíticas, que contenham a mesma adição de analito para cada nível de concentração. Uma curva é preparada com adição de analito na matriz da amostra (que já contém um nível do analito) e a outra curva analítica não inclui a matriz de amostra. Devem ser preparados, no mínimo, 5 níveis de concentração com 3 replicatas por nível (INMETRO, 2020).
- Análise do resultado: Comparam-se as inclinações (coeficientes angulares) das curvas analíticas, através do Teste *t* (*Student*). Se as inclinações dessas duas curvas de regressão linear não diferirem significativamente, não há efeito de matriz, o que pode ser observado graficamente pelo paralelismo aproximado das duas curvas. Caso contrário, a curva analítica deve ser preparada na matriz e a linearidade, a precisão e a tendência/recuperação também deverão ser estudadas na matriz (INMETRO, 2020).

3.8.2 Linearidade / Faixa de trabalho / Faixa linear de trabalho / Sensibilidade

O INMETRO define linearidade; faixa de trabalho; faixa linear de trabalho e sensibilidade de um procedimento analítico como (Figura 19):

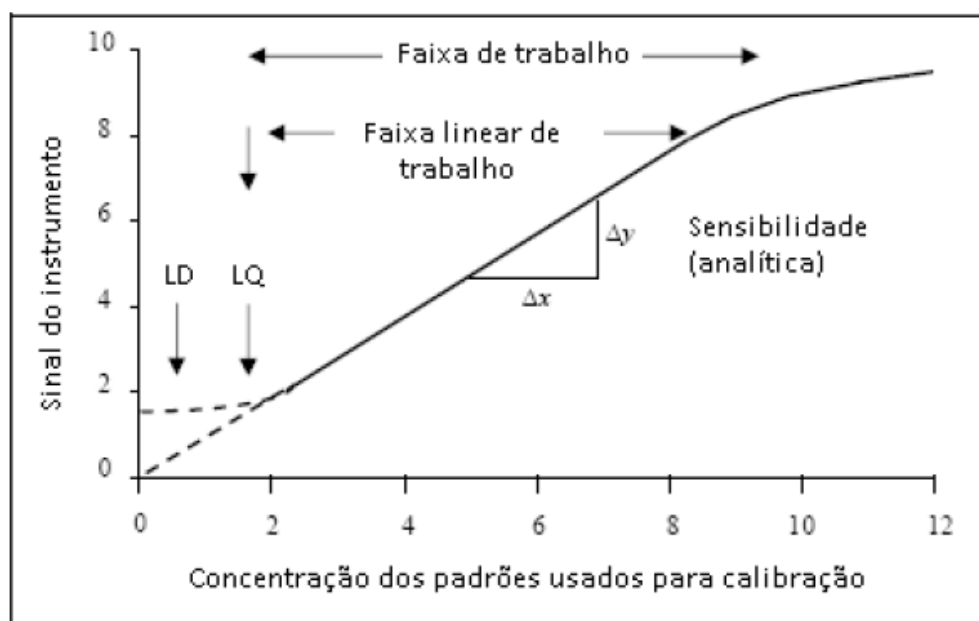
- Linearidade: é a habilidade (dentro de uma dada faixa) em obter resultados os quais são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (INMETRO, 2020).
- Faixa de trabalho: é o intervalo entre a menor concentração e a maior concentração de analito na amostra para o qual se demonstrou que o procedimento analítico tem um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade (INMETRO, 2020), ou seja, é o

intervalo no qual o método fornece resultados com uma incerteza aceitável (EURACHEM, 2014).

- Faixa linear de trabalho: é por inferência a faixa de concentração do analito em que os resultados do método são proporcionais à concentração do analito (INMETRO, 2020).
- Sensibilidade: é a mudança na resposta do instrumento que corresponde a uma mudança na quantidade medida (INMETRO, 2020).

De acordo com Souza (2007) para avaliação da linearidade é necessário o preparo de curvas com ou sem matriz, em sua maioria com cinco a seis níveis de concentração, uniformemente distribuídos, incluindo ou não o ponto zero, e com um mínimo de duas a sete replicatas por nível.

Figura 19 - Exemplo típico de uma curva analítica com a identificação dos parâmetros de desempenho “faixa de trabalho”, “faixa linear de trabalho”, “sensibilidade”, “limite de detecção (LD)” e “limite de quantificação (LQ)”



Fonte: Eurachen (2014); INMETRO (2020)

Como a linearidade de um método não pode ser observada apenas por meio do gráfico dos resultados de resposta em função da concentração do analito (INMETRO, 2020) os resultados dos testes devem ser avaliados por métodos estatísticos apropriados.

3.8.3 Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção (LD) de um procedimento analítico individual é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas para o ensaio (INMETRO, 2020).

O limite de detecção pode ser calculado de diversas formas como através da percepção visual; relação sinal/ruído; estimativa a partir da curva de calibração; estimativa pelo desvio padrão do branco e estimativa por meio de curva de desvio padrão (INMETRO, 2020; ICH, 2022).

3.8.4 Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) de um procedimento analítico individual é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco) (INMETRO, 2020).

Os mesmos métodos que podem ser utilizados na determinação do limite de detecção (LD) também podem ser aplicados na determinação do limite de quantificação (LQ), no entanto, ressalta-se que para cada parâmetro (LD e LQ) esses métodos apresentam suas peculiaridades. Como exemplo, podemos citar o método relação sinal/ruído.

A relação sinal/ruído é determinada pela comparação dos sinais medidos de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito e dos ruídos dos brancos de amostras, definindo-se a concentração mínima em que o analito pode ser detectado com confiança. A relação sinal/ruído típica para a estimativa do limite de quantificação (LQ) é de 10:1, enquanto que para determinar o limite de detecção (LD) é aceitável uma estimativa entre 3:1 ou 2:1 (INMETRO, 2020).

3.8.5 Tendência / Recuperação

Para avaliar a tendência de um método, normalmente são utilizados processos relacionados ao uso de materiais de referência certificados (MRC), participação em comparações interlaboratoriais, comparação com método de referência (ou método validado) e realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2020).

A recuperação mede a tendência total do procedimento (BRASIL, 2011), sendo assim, a recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo (*spike*) (INMETRO, 2020).

As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações (baixa, média e alta) da faixa de uso do método (INMETRO, 2020) podendo ser analisadas em seis réplicas (BRASIL, 2011).

Normalmente os critérios de aceitação para recuperação estão atrelados ao nível de concentração, a tabela 4 apresenta os critérios de aceitação para recuperação propostos pelo INMETRO (INMETRO, 2020).

Tabela 4 – Critérios de aceitação para recuperação

| Analito (%) | Fração Mássica (C) | Unidade | Recuperação média (%) |
|--------------------|---------------------------|-----------------|------------------------------|
| 100 | 1 | 100% | 98 – 102 |
| 10 | 10 ⁻¹ | 10% | 98 – 102 |
| 1 | 10 ⁻² | 1% | 97 – 103 |
| 0,1 | 10 ⁻³ | 0,1% | 95 – 105 |
| 0,01 | 10 ⁻⁴ | 100 ppm (mg/kg) | 90 – 107 |
| 0,001 | 10 ⁻⁵ | 10 ppm (mg/kg) | 80 – 110 |
| 0,0001 | 10 ⁻⁶ | 1 ppm (mg/kg) | 80 – 110 |
| 0,00001 | 10 ⁻⁷ | 100 ppb (µg/kg) | 80 – 110 |
| 0,000001 | 10 ⁻⁸ | 10 ppb (µg/kg) | 60 – 115 |
| 0,0000001 | 10 ⁻⁹ | 1 ppb (µg/kg) | 40 – 120 |

Fonte: INMETRO (2020)

3.8.6 *Precisão*

Precisão pode ser definida como a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (BRASIL, 2011). As três formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetibilidade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação (INMETRO, 2020).

3.8.7 *Repetibilidade*

A repetibilidade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada, por meio, da análise de padrões, material de referência ou adição do analito ao branco da amostra, em várias concentrações na faixa de trabalho (INMETRO, 2020).

Os critérios de aceitação para repetibilidade estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Critérios de aceitação para repetibilidade

| Analito (%) | Fração Mássica (C) | Unidade | DPR(%) |
|--------------------|---------------------------|-----------------|---------------|
| 100 | 1 | 100% | 1,3 |
| 10 | 10 ⁻¹ | 10% | 1,9 |
| 1 | 10 ⁻² | 1% | 2,7 |
| 0,1 | 10 ⁻³ | 0,1% | 3,7 |
| 0,01 | 10 ⁻⁴ | 100 ppm (mg/kg) | 5,3 |
| 0,001 | 10 ⁻⁵ | 10 ppm (mg/kg) | 7,3 |
| 0,0001 | 10 ⁻⁶ | 1 ppm (mg/kg) | 11 |
| 0,00001 | 10 ⁻⁷ | 100 ppb (µg/kg) | 15 |
| 0,000001 | 10 ⁻⁸ | 10 ppb (µg/kg) | 21 |
| 0,0000001 | 10 ⁻⁹ | 1 ppb (µg/kg) | 30 |

DPR: Desvio Padrão Relativo

Fonte: INMETRO (2020)

3.8.8 Precisão intermediária

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sob condições que compreendem o mesmo procedimento de medição, o mesmo local e medições repetidas (INMETRO, 2020). Para determinar a precisão intermediária deve-se estabelecer eventos aleatórios na precisão do procedimento analítico (ICH, 2022). Variações típicas a serem avaliadas podem estar relacionadas a diferentes analistas; diferentes equipamentos; diferentes tempos; diferentes dias e condições ambientais (INMETRO, 2020; ICH, 2022).

3.9 Referência bibliográfica

AFFONFERE, M. *et al.* In-vitro Digestibility Methods and Factors Affecting Minerals Bioavailability: A Review. **Food Reviews International**, p. 1–29, 2021.

ALMINGER, M. *et al.* In vitro models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 413–436, 2014.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Fenilalanina em alimentos**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/alimentos/fenilalanina>>. Acesso em: 09 agosto. 2023.

ANVISA- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA ANVISA. **Informe Técnico N° 49, de 11 de abril de 2012 - Esclarecimentos sobre a Fenilcetonúria**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/fenilalanina-em-alimentos>>. Acesso em: 14 maio. 2019.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists. A Food Matrix Organizational System Applied to Collaborative Studies. **AOAC International**, vol. 17, no. 7, p. 115–120, 1993.

- ARAÚJO, D. F. de S. *et al.* **Food Plants in the Caatinga**. In: JACOB, M. C. M.; ALBUQUERQUE, U. P. (Ed.). *Local Food Plants of Brazil*. [s.l.] Springer, Chan, 2021. p. 225–250.
- BAMIDELE, O. *et al.* Effects of aqueous extract of *Basella alba* leaves on haematological and biochemical parameters in albino rats. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 41, p. 6952–6955, 2010.
- BARREIRA, T. F. *et al.* Diversidade e equitabilidade de Plantas Alimentícias Não Convencionais na zona rural de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 964–974, 2015.
- BARRETO, S. F.; GASPI, F. O. G.; OLIVEIRA, C. F. Chemical study of the main ways of plant secondary metabolism: A bibliographic review. **Revista Científica da Fundação Hermínio Ometto**, v. 8, n. 1, p. 60–72, 2020.
- BASSANINI, G. *et al.* Phenylketonuria Diet Promotes Shifts in Firmicutes Populations. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. 101, p. 1–9, 2019.
- BATISTA, L. L. *et al.* A Review of Medicinal Plants Traditionally used to Treat Male Sexual Dysfunctions – the Overlooked Potential of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen. **Pharmacognosy Reviews**, v. 15, n. 29, p. 01–11, 2021.
- BEDLOVIČOVÁ, Z. *et al.* A Brief Overview on Antioxidant Activity Determination of Silver Nanoparticles. **Molecules**, v. 25, n. 14, p. 3191, 13 jul. 2020.
- BELLO, O. M. *et al.* Wild vegetable *Rumex acetosa* Linn.: Its ethnobotany, pharmacology and phytochemistry – A review. **South African Journal of Botany**, v. 125, p. 149–160, 2019.
- BERNAUD, F. S. R.; FUNCHAL, C. Antioxidant activity of açafá. **Nutrição Brasil**, v. 10, n. 5, p. 310–316, 2011.
- BHAGAVAN, N. V.; HA, C. E. Amino Acids. **Essentials of Medical Biochemistry**. 2nd ed. [S. l.]: Elsevier, 2015. p. 21–29.
- BLAU, N.; VAN SPRONSEN, F. J.; LEVY, H. L. Phenylketonuria. **The Lancet**, v. 376, n. 9750, p. 1417–1427, 2010.
- BOAKYE, A. A. *et al.* Utilizing cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) for food and nutrition security: A review. **Food Science and Nutrition**, v. 6, n. 4, p. 703–713, 2018.
- BOHN, T. *et al.* Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 13, p. 2239–2261, 2018.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Alimentos Regionais Brasileiros**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias e Inovação em Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Fenilcetonúria**. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias e Inovação em Saúde. – Brasília : Ministério da Saúde, 2020. 42 p.

BRASIL. **Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica**. Brasília: [s. n.], 2011.

BRASIL. **Hortaliças não-convencionais: (tradicionais)**. 1. ed. [s.l: s.n.]

BRASIL. **Manual de Hortaliças Não-Convencionais**. Brasília: MAPA/ACS, 2010a.

BRASIL. **RDC Nº 166, de 24 de Julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, Brasília, 2017.

BRASIL, **Instrução Normativa Nº 75, de 8 de outubro de 2020**. Estabelece os requisitos técnicos para declaração da rotulagem nutricional nos alimentos embalados. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Brasília, 2020.

BRODKORB, A. *et al.* INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 2019.

BÛI, N. N. *et al.* Talanta Coumarin-based derivatization reagent for LC-MS analysis of amino acids. **Talanta**, v. 252, p. 123730, 2023.

CALLE, J. *et al.* Exploring the functionality of starches from corms and cormels of *Xanthosoma sagittifolium*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 7, p. 2494–2501, 2019.

CAMPELO, F. A. *et al.* Study of thermoplastic extrusion and its impact on the chemical and nutritional characteristics and two sorghum genotypes SC 319 and BRS 332. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 4, p. 788–802, 2020.

CARDOSO, P. D. S. *et al.* Potencial antibacteriano e perfil farmacognóstico das folhas de *Hibiscus acetosella* Welw Ex Hiern. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 17, n. 2, p. 170, 2018.

CECCANTI, C. *et al.* Mediterranean Wild Edible Plants: Weeds or “New functional crops”? **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2299, 2018.

CELEP, E. *et al.* The bioaccessible phenolic profile and antioxidant potential of *Hypericum perforatum* L. after simulated human digestion. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 717–723, 2017.

CENINI, G.; LLORET, A.; CASCELLA, R. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: From a mitochondrial point of view. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 18, 2019.

CERRATO, A. *et al.* A new software-assisted analytical workflow based on high-resolution mass spectrometry for the systematic study of phenolic compounds in complex matrices. **Talanta**, v. 209, p. 120573, 2020.

CHANG, S. K. C.; ZHANG, Y. **Protein Analysis**. In: NIELSEN, S. (Ed.). *Food Analysis*. [s.l.] Springer International Publishing, 2017. p. 315–331.

CHAVES, N.; SANTIAGO, A.; ALÍAS, J. C. Quantification of the Antioxidant Activity of Plant Extracts: Analysis of Sensitivity and Hierarchization Based on the Method Used. **Antioxidants**, v. 9, n. 1, p. 76, 2020.

CRUZ, M. P.; PERONI, N.; ALBUQUERQUE, U. P. Knowledge, use and management of native wild edible plants from a seasonal dry forest (NE, Brazil). **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 9, n. 1, p. 79, 2013.

COSTA, C. *et al.* Paper spray screening and liquid chromatography/mass spectrometry confirmation for medication adherence testing: A two-step process. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 35, n. S2, p. 1–7, abr. 2021.

DA CUNHA, M. A. *et al.* Urban gardening and neglected and underutilized species in Salvador, Bahia, Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 16, n. 1, p. 67, 2020.

DA ROCHA, C. F. *et al.* Action of the hydroethanolic extract of the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen on the reproductive performance of Wistar female rats: A popular female aphrodisiac from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 214, p. 301–308, 2018.

DA SILVA, I. J. S. *et al.* Microwave-assisted digestion employing diluted nitric acid for mineral determination in rice by ICP OES. **Food Chemistry**, v. 319, p. 126435, 2020.

DA SILVA, L. C. *et al.* *Paper spray ionization and portable mass spectrometers: A review*. **Analytical Methods**, v. 11, n. 8, p. 999–1013, 2019.

DA-COSTA-ROCHA, I. *et al.* *Hibiscus sabdariffa* L. - A phytochemical and pharmacological review. **Food Chemistry**, v. 165, p. 424–443, 2014.

DAI, Z. *et al.* Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthalaldehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 964, p. 116–127, 2014.

DAL’RIO, I.; MATEUS, J. R.; SELDIN, L. Unraveling the *Tropaeolum majus* L. (Nasturtium) Root-Associated Bacterial Community in Search of Potential Biofertilizers. **Microorganisms**, v. 10, n. 3, p. 1–17, 2022.

DAVIDSON, I. **Hydrolysis of Samples for Amino Acid Analysis**. In: HUMANA PRESS INC (ed.). *Protein Sequencing Protocols*. 2nd ed. Totowa: [s. n.], 2003. vol. 211, p. 111–122.

DE CASTRO, C. M.; DEVIDE, A. C. P. Produção Agroecológica de vinagreira (*Hibiscus* spp.): **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 14, n. 4, p. 91–96, 2019.

DE CHAVEZ, H. D. *et al.* Propagation techniques for rapid establishment and production of cocoyam (*Xanthosomma sagittifolium* (L.) Schott). **The International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences**, v. 25, n. 2, p. 83–94, 2014.

DE SOUZA, G. C. *et al.* *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen Reproductive Toxicity in Zebrafish: An In Vivo and In Silico Assessment. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.

DESHMUKH, S. A.; GAIKWAD, D. K. An attempt to solve the taxonomical conflicts in basella alba l. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v. 19, n. 3, p. 669–674, 2020.

DIMA, C. *et al.* Bioavailability and bioaccessibility of food bioactive compounds; overview and assessment by in vitro methods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 6, p. 2862–2884, 2020.

DO NASCIMENTO, V. T. *et al.* Knowledge and Use of Wild Food Plants in Areas of Dry Seasonal Forests in Brazil. **Ecology of Food and Nutrition**, v. 52, n. 4, p. 317–343, jul. 2013.

DRAGO, S. R. **Minerals**. In: GALANAKIS, C. M. (Ed.). *Nutraceutical and Functional Food Components*. 2. ed. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 153–181.

DUARTE, M. R.; HAYASHI, S. S. Estudo anatômico de folha e caule de *Pereskia aculeata* Mill. (Cactaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 103–109, 2005.

DUPONT, D. *et al.* Can dynamic in vitro digestion systems mimic the physiological reality? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 10, p. 1546–1562, 2019.

DUPONT, D.; FERRANTI, P.; MACKIE, A. The 5th International Conference on Food Digestion. **Food Research International**, v. 118, p. 1–3, 2019.

DURAZZO, A. *et al.* Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 9, p. 2221–2243, 2019.

EGEA, M. B.; PIERCE, G. **Bioactive Compounds of Barbados Gooseberry (*Pereskia aculeata* Mill.)**. In: MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y. (Ed.). *Bioactive Compounds in Underutilized Vegetables and Legumes*. Reference Series in Phytochemistry. [s.l.] Springer, Chan, 2021. p. 225–237.

EL-FAWAL, H. A. N. **Neurotoxicology**. In: NRIAGU, J. O. (Ed.). *Encyclopedia of Environmental Health*. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 87–106.

EURACHEM. **Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. 2nd ed. [S. l.: s. n.], 2014.

FAGUNDES, G. E.; MASSUNAGA, N. Therapeutic actions of *Hibiscus acetosella* Welw. ex Hiern Resumo. **Revista Brasileira de Nutricional Funcional**, v. 15, n. 6, p. 13–18, 2016.

FAVORETO, R.; GILBERT, B. *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (Asteraceae) – Jambu. **Revista Fitos**, v. 5, n. 1, p. 83–91, 2010.

FERNANDES, L. A. *et al.* Nutrição mineral de plantas de maxixe-do-reino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 7, p. 719–722, 2005.

FERNANDES, R. S.; OLIVEIRA, A. J. de. Characterization of the properties of amino acids using the genetic code. **Brazilian Electronic Journal of Mathematics**, v. 2, n. 4, p. 81–100, 2021.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, M. L. **Optical Atomic Emission Spectrometry-Inductively Coupled Plasma**. In: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. 3. ed. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 169–176.

FERRÉ, S.; GONZÁLEZ-RUIZ, V.; GUILLARME, D. Analytical strategies for the determination of amino acids : Past , present and future trends. **Journal of Chromatography B**, v. 1132, p. 121819, 2019.

FERREIRA JÚNIOR, W. S.; CAMPOS, L. Z. de O.; DE MEDEIROS, P. M. Unconventional Food Plants: Food or Medicine? In: JACOB, M. C. M.; ALBURQUERQUE, U. P. (Ed.). **Local Food Plants of Brazil**. Ethnobiolo ed. Switzerland: Springer, 2021. p. 29–47.

FREITAS, I. S. *et al.* Exogenous Application of L-Arginine Improves Protein Content and Increases Yield of *Pereskia aculeata* Mill. Grown in Soilless Media Container. **Horticulturae**, v. 8, n. 2, 2022.

FUNEZ, L. A. *et al.* Taxonomic notes on *Erechtites* (Asteraceae: Senecioneae). **Phytotaxa**, v. 489, n. 2, p. 155–170, 2021.

FUNK, V. A. *et al.* **Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae**. 14. ed. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy, Institute of Botany, University of Vienna, 2009.

GALLEGO, D. *et al.* Pathogenic variants of DNAJC12 and evaluation of the encoded cochaperone as a genetic modifier of hyperphenylalaninemia. **Human Mutation**, v. 41, n. 7, p. 1329–1338, 2020.

GARCÍA, Y. M. *et al.* Physicochemical Characterization and Paper Spray Mass Spectrometry Analysis of *Myrciaria Floribunda* (H. West ex Willd.) O. Berg Accessions. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7206, 2021.

GARITTA, J. A. *et al.* Microwave-Assisted Acid Digestion: Evaluation of Reaction Vessel Design and Performance. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 4, p. 702–711, 2021.

GBIF. **Hibiscus acetosella Welw.ex Hiem**. Disponível em: <https://www.gbif.org/pt/occurrence/search?basis_of_record=HUMAN_OBSERVATION&has_coordinate=true&has_geospatial_issue=false&occurrence_status=present&taxon_key=3152551>. Acesso em: 25 abr. 2022b.

GBIF. **Lactuca canadensis L**. Disponível em: <<https://www.gbif.org/pt/species/171439160>>. Acesso em: 12 abr. 2022a.

GE, L.; LI, S. P.; LISAK, G. Advanced sensing technologies of phenolic compounds for pharmaceutical and biomedical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 179, p. 112913, 2020.

GHARIBZAHEDI, S. M. T.; JAFARI, S. M. The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 119-131, 2017.

GHOSH, S. *et al.* Inductively Coupled Plasma –Optical Emission Spectroscopy: A Review. **Asian Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3, n. 1, p. 24–33, 2013.

GOTTI, R. *et al.* Determination of Free Amino Acids in Milk , Colostrum and and UV Detection. **Molecules**, v. 27, p. 4153, 2022.

HAYES, M. Measuring Protein Content in Food: An Overview of Methods. **Foods**, v. 9, n. 10, p. 1340, 23 set. 2020.

ICH, **Harmonisation for better health**. ICH guideline Q2(R2) on validation of analytical procedures. 6th ed. [S. l.: s. n.], 2022. v. 2.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Instrumental. **Orientação sobre validação de métodos analíticos - DOQ-CGCRE-008**. Brasília: [s. n.], 2020.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. [s.l: s.n.]

ISLAM, M. Food and Medicinal Values of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L . Linne Malvaceae) Plant Parts : A Review. **Journal of Nutrition and Food Sciences Review**, v. 1, p. 14–20, 2019.

IZQUIERDO-VEGA, J. A. *et al.* Organic acids from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.)-A brief review of its pharmacological effects. **Biomedicines**, v. 8, n. 100, p. 1–16, 2020.

JAKOBEK, L.; MATIĆ, P. Non-covalent dietary fiber - Polyphenol interactions and their influence on polyphenol bioaccessibility. **Trends in Food Science and Technology**, v. 83, p. 235–247, 2019.

JAKUBCZYK, K. *et al.* Garden nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) - a source of mineral elements and bioactive compounds. **Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny**, v. 69, n. 2, p. 119–126, 2018.

JASTRZEBSKA, A. *et al.* Simple and Effective Derivatization of Amino Acids with 1-Fluoro-2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzene in a Microwave Reactor for Determination of Free Amino Acids in Kombucha Beverages. **Materials**, v. 15, p. 7365, 2022.

JAUDZEMS, G.; FUERER, C. Determination of Total Amino Acids in Infant Formulas , Adult Nutritionals , Dairy , and Cereal Matrixes by UHPLC – UV : Interlaboratory Validation Study , Final Action 2018 . 06. **Journal of AOAC International**, v. 105, n. 6, p. 1625–1639, 2022.

- JEFFERY, T. D.; RICHARDSON, M. L. A review of the effectiveness of hibiscus for treatment of metabolic syndrome. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 270, p. 113762, 2021.
- JURCA, T. *et al.* A Phytocomplex Consisting of *Tropaeolum majus* L. and *Salvia officinalis* L. Extracts Alleviates the Inflammatory Response of Dermal Fibroblasts to Bacterial Lipopolysaccharides. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1–14, 2020.
- KAMBHAMPATI, S. *et al.* Accurate and efficient amino acid analysis for protein quantification using hydrophilic interaction chromatography coupled tandem mass spectrometry. **Plant Methods**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2019.
- KHAN, S. R. *et al.* Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES): a Powerful Analytical Technique for Elemental Analysis. **Food Analytical Methods**, v. 15, n. 3, p. 666–688, 2022.
- KIM, Y. A.; KEOGH, J. B.; CLIFTON, P. M. Polyphenols and glycémie control. **Nutrients**, v. 8, n. 17, p. 1–27, 2016.
- KINUPP, V. F.; DE BARROS, I. B. I. Riqueza de Plantas Alimentícias Não-Convencionais na Região Metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 1, p. 63–65, 2007.
- KINUPP, V. F.; LORENZI, H. **Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**. 1. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2014.
- KLEIN, V. L. G.; BRANDÃO, M.; LACA-BUENDIA, J. P. *Cyclanthera pedata* (L.) Schrad. var. *edulis* (Naud.) Cogn. - uma Cucurbitaceae pouco conhecida na alimentação humana. **Acta Botanica Brasilica**, v. 3, n. 2, p. 307–314, 1989.
- KONG, F.; SINGH, R. P. A Human Gastric Simulator (HGS) to Study Food Digestion in Human Stomach. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 9, p. 627–635, 2010.
- KORPELAINEN, H.; PIETILÄINEN, M. Sorrel (*Rumex acetosa* L.): Not Only a Weed but a Promising Vegetable and Medicinal Plant. **Botanical Review**, v. 86, n. 3–4, p. 234–246, 2020.
- KRAPOVICKAS, A.; FRYXELL, P. Las especies Sudamericanas de Hibiscus secc. Furcaria DC. (Malvaceae-Hibisceae). **Bonplandia**, v. 13, n. 1–4, p. 35–115, 2004.
- KUMORKIEWICZ, A.; WYBRANIEC, S. Thermal Degradation of Major Gomprenin Pigments in the Fruit Juice of *Basella alba* L. (Malabar Spinach). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 34, p. 7500–7508, 2017.
- LARREA-MARÍN, M. T. *et al.* Validation of an ICP-OES method for macro and trace element determination in *Laminaria* and *Porphyra* seaweeds from four different countries. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 8, p. 814–820, 2010.
- LEAL, M. L.; ALVES, R. P.; HANAZAKI, N. Knowledge, use, and disuse of unconventional food plants. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 14, n. 1, p. 6, 17 dez. 2018.

LEBEDA, A.; DOLEŽALOVÁ, I.; NOVOTNÁ, A. Wild and weedy *Lactuca* species, their distribution, ecogeography and ecobiology in USA and Canada. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, n. 8, p. 1805–1822, 2012.

LERI, M. *et al.* Healthy Effects of Plant Polyphenols: Molecular Mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1250, 13 fev. 2020.

LESTARI, L.A. *et al.* Analysis of amino acids in food using High Performance Liquid Chromatography with derivatization techniques : a review. **Food Research**, v. 6, n. 3, p. 435–442, 2022.

LI, C. *et al.* Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. **Trends in Food Science and Technology**, v. 96, p. 114–126, 2020.

LIBERAL, Â. *et al.* Chemical features and bioactivities of *Lactuca canadensis* L., an unconventional food plant from Brazilian cerrado. **Agriculture**, v. 11, n. 8, p. 1–11, 2021.

LIM, T. K. **Edible Medicinal and Non Medicinal Plants : Modified Stems, Roots, Bulbs**. 9. ed. New York: Springer, 2015. v. 9

LIMA, M. A. S. S. *et al.* Physicochemical and sensory analysis of common sorrel (*Rumex acetosa* L.). **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 11, n. 2, p. 462–468, 2021.

LIU, J. *et al.* Development, Characterization, and Application of Paper Spray Ionization. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 6, p. 2463–2471, 2010.

LOPEZ, M. J.; MOHIUDDIN, S. S. **Biochemistry, Essential Amino Acids**. [S. l.: s. n.], 2022.

MACCHIA, M. *et al.* Agronomic and phytochemical characterization of *Cyclanthera pedata* Schrad. cultivated in central Italy. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 8, p. 434–438, 2009.

MACDONALD, A. *et al.* PKU dietary handbook to accompany PKU guidelines. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 15, n. 171, p. 1-21, 2020.

MÆHRE, H. *et al.* Protein Determination—Method Matters. **Foods**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2018.

MANDAJI, C. M.; PENA, R. da S.; CHISTÉ, R. C. Encapsulation of bioactive compounds extracted from plants of genus *Hibiscus*: A review of selected techniques and applications. **Food Research International**, v. 151, p. 110820, 2022.

MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de validação, verificação/confirmação de desempenho, estimativa da incerteza de medição e controle de qualidade intralaboratorial**. Pedro Leopoldo: [s. n.], 2014.

MATTOS, B. A. *et al.* Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. In: PICON, P. D.; GADELHA, M. I. P.; ALEXANDRE, R. F. (Ed.). **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas**. ANVISA ed. Brasília: ANVISA, 2013. p. 363–377.

- MARCONI, G. L. *et al.* D-amino acids in foods. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 555–574, 2020.
- MARKIEWICZ-KESZYCKA, M. *et al.* Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) for food analysis: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 65, p. 80–93, 2017.
- MARTÍN, J.; SARRIA, L. F.; ASUERO, A. G. **The Kjeldahl Titrimetric Finish: On the Ammonia Titration Trapping in Boric Acid**. In: *Advances in Titration Techniques*. [s.l.] InTech, 2017. 11p. 13.
- MARTINELLO, M.; MUTINELLI, F. Antioxidant activity in bee products: A review. **Antioxidants**, v. 10, n. 1, p. 1–42, 2021.
- MCBRIDE, E. M. *et al.* Paper spray ionization: Applications and perspectives. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 722–730, 2019.
- MELO, A. C. *et al.* Hydroethanolic extract of *Tropaeolum majus* promotes anxiolytic effects on rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 5, p. 589–593, 2018.
- MIAW, C. S. *et al.* Methods for detecting the Roundup Ready® soy in soybeans and soy products by polymerase chain reaction : a review and critical analysis of current practices of validation. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 1, p. 9–25, 2014.
- MICHALSKA, K.; SZNELER, E.; KISIEL, W. Sesquiterpene lactones from *Lactuca canadensis* and their chemotaxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 90, p. 90–94, 2013.
- MILIÃO, G. L. *et al.* Unconventional food plants: Nutritional aspects and perspectives for industrial applications. **Future Foods**, v. 5, 2022.
- MINE, Y.; ROY, M. K. **Egg Components for Heart Health: Promise and Progress for Cardiovascular Protective Functional Food Ingredient**. In: MURRAY, M.-Y. (Ed.). *Comprehensive Biotechnology*. 4. ed. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 595–607.
- MINEKUS, M. *et al.* A Multicompartmental Dynamic Computer- controlled Model Simulating the Stomach and Small Intestine. **ATLA**, v. 23, p. 197–209, 1995.
- MINEKUS, M. *et al.* A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. **Food and Function**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.
- MINIGHIN, E. C. *et al.* Evaluation of the Consumption of Fruits and Vegetables by Phenylketonurics in the Metabolic Control of Phenylalanine: An Integrative Review. **Journal of Medicinal Food**, v. 25, n. 5, p. 487–494, 2022.
- MONGE, M. *et al.* Two new records of *Lactuca* L. (Cichorieae, Asteraceae) in South America. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 14, n. 2, p. 117–123, 2016.
- MOORE, S.; STEIN, W. H. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 192, n. 2, p. 663–681, 1951.

MOORE, S.; STEIN, W. H. For the investigations on the chromatographic separation of amino acids outlined in the preceding communication (1) it was necessary to have available a suitable quantitative method for the determination of the concentration. For this purpose, the method is described. **Journal of Biological Chemistry**, v. 176, n. 1, p. 367–388, 1948.

MOURA, I. O. *et al.* Chemical Characterization, Antioxidant Activity and Cytotoxicity of the Unconventional Food Plants: Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) Leaf, Major Gomes (Talinum paniculatum (Jacq.) Gaertn.) and Caruru (*Amaranthus deflexus* L.). **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 5, p. 2407–2431, 2021.

MÜGGE, F. L. B. *et al.* **Bioactive Potential of Brazilian Plants Used as Food with Emphasis on Leaves and Roots**. In: JACOB, M. C. . . .; ALBURQUERQUE, U. P. (Ed.). Local Food Plants of Brazil. *Ethnobiologia* ed. Switzerland: Springer, 2021. p. 65–87.

MULET-CABERO, A. I. *et al.* A standardised semi-dynamic: in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. **Food and Function**, v. 11, n. 2, p. 1702–1720, 2020.

MUNTEANU, I. G.; APETREI, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3380, 25 mar. 2021.

NAGAR, E. E. *et al.* The impact of chemical structure on polyphenol bioaccessibility, as a function of processing, cell wall material and pH: A model system. **Journal of Food Engineering**, v. 289, p. 110304, 2021.

NEVES, D. A. *et al.* Chemical and nutritional characterization of raw and hydrothermal processed jambu (*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen). **Food Research International**, v. 116, n. March 2018, p. 1144–1152, 2019.

ORSINI, F. *et al.* HPTLC, HPTLC-MS/MS and HPTLC-DPPH methods for analyses of flavonoids and their antioxidant activity in *Cyclanthera pedata* leaves, fruits and dietary supplement. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 42, n. 10, p. 290–301, 15 jun. 2019.

OWUSU-DARKO, P. G.; PATERSON, A.; OMENYO, E. L. Cocoyam (corms and cormels)—An underexploited food and feed resource. **Journal of Agricultural Chemistry and Environment**, v. 03, n. 01, p. 22–29, 2014.

PALAFIX-CARLOS, H.; AYALA-ZAVALA, J. F.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. 6–15, 2011.

PARANAVITANA, L. *et al.* Determination of soluble and insoluble-bound phenolic compounds in dehulled, whole, and hulls of green and black lentils using electrospray ionization (ESI)-MS/MS and their inhibition in DNA strand scission. **Food Chemistry**, v. 361, p. 130083, 2021.

PEISINO, M. C. O. *et al.* Health-Promoting Properties of Brazilian Unconventional Food Plants. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 9, p. 4691–4700, 2020.

PEREZ, C. J.; CONCEIÇÃO, R. S.; IFA, D. R. Chemical profiling and separation of bioactive secondary metabolites in Maca (*Lepidium peruvianum*) by normal and reverse phase thin layer chromatography coupled to desorption electrospray ionization-mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 56, n. 2, p. 1–14, 2021.

QAMAR, H. M. U. D. *et al.* Vascular mechanisms underlying the hypotensive effect of *Rumex acetosa*. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n. 1, p. 225–234, 2018.

QIU, X. *et al.* Journal of Food Composition and Analysis Determination of free amino acids in five commercial sweetpotato cultivars by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 92, p. 103522, 2020.

QU, C. *et al.* A rapid UHPLC-QDa method for quantification of human salivary amino acid profiles. **Journal of Chromatography B**, v. 1211, p. 123485, 2022.

RAHAL, A. *et al.* Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–19, 2014.

RAMOS, A. L. C. C. *et al.* Chemical profile of *Eugenia brasiliensis* (Grumixama) pulp by PS/MS paper spray and SPME-GC / MS solid-phase microextraction. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e318974008, 2020.

RAMOS, A.L.C.C. *et al.* Evaluation of the total phenolic content, antioxidative capacity, and chemical fingerprint of *Annona crassiflora* Mart. bioaccessible molecules. **Food Research International**, v.165, p. 112514, 2023.

REFLORA. **Acmella oleracea (L.) R. K. Jansen**. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=1&idsFilhosAlgas=%5B2%5D&idsFilhosFungos=%5B1%2C11%2C10%5D&lingua=&grupo=6&familia=null&genero=&especie=&autor=&nomeVernaculo>>. Acesso em: 19 abr. 2022c.

REFLORA. **Erechtites valerianifolius (Link ex Spreng.) DC**. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB16114>>. Acesso em: 16 abr. 2022a.

REFLORA. **Pereskia aculeata Mill**. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=1&idsFilhosAlgas=%5B2%5D&idsFilhosFungos=%5B1%2C11%2C10%5D&lingua=&grupo=6&familia=null&genero=&especie=&autor=&nomeVernaculo>>. Acesso em: 20 abr. 2022d.

REFLORA. **Tropaeolum majus L**. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=1&idsFilhosAlgas=%5B2%5D&idsFilhosFungos=%5B1%2C11%2C10%5D&lingua=&grupo=6&familia=null&genero=&especie=&autor=&nomeVernaculo>>. Acesso em: 18 abr. 2022b.

RIAZ, G.; CHOPRA, R. A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 102, p. 575–586, 2018.

- RIBEIRO, F. *et al.* Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.
- RIBEIRO, W. S. *et al.* Conservação e fisiologia pós-colheita de folhas de Capuchinha (*Tropaeolum majus* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 598–605, 2011.
- RIVAS, M. *et al.* Nutritional, Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of *Cyclanthera pedata*, an Andinean Fruit and Products Derived from Them. **Food and Nutrition Sciences**, v. 04, n. 08, p. 55–61, 2013.
- ROSSATO, A. E. *et al.* **Fitoterapia racional: aspectos taxonômicos, agroecológicos, etnobotânicos e terapêuticos**. 1. ed. Florianópolis: DIOESC, 2012. v. 1
- ROUSSEAU, S. *et al.* Barriers impairing mineral bioaccessibility and bioavailability in plant-based foods and the perspectives for food processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 5, p. 826–843, 2020.
- ROYAL BOTANIC GARDENS. **Erechtites valerianifolius (Link ex Spreng.) DC**. Disponível em: <<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:203365-1#source-KBD>>. Acesso em: 16 abr. 2022.
- RUFINO, M. do S. M. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.
- RUTHERFURD, S. M; GILANI, G. S. **Amino Acid Analysis**. In: WILEY ONLINE LIBRARY (ed.). *Current Protocols in Protein Science*. 11.9. [S. l.: s. n.], 2009. p. 1–37.
- SHARPLESS, K. E. Filling the AOAC triangle with food-matrix standard reference materials. **Anal Bioanal Chemistry**, v. 378, n. 1, p. 1161–1167, 2004.
- SÁEZ-PLAZA, P. *et al.* An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination. Part I. Early History, Chemistry of the Procedure, and Titrimetric Finish. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 43, n. 4, p. 178–223, 2013.
- SÁEZ-PLAZA, P.; GARCÍA ASUERO, A.; MARTÍN, J. An annotation on the Kjeldahl method. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, v. 85, n. 1, p. 14–19, 2019.
- SAGAR, V. *et al.* The inheritance of betalain pigmentation in *Basella alba* L. **South African Journal of Botany**, p. 1–10, 2022.
- SALAMI, S. O.; AFOLAYAN, A. J. Suitability of Roselle-Hibiscus *sabdariffa* L. as Raw Material for Soft Drink Production. **Journal of Food Quality**, v. 2020, p. 1–9, 2020.
- SANTOS, B. *et al.* Development and Chemical Characterization of Pequi Pericarp Flour (*Caryocar brasiliense* Camb.) and Effect of in vitro Digestibility on the Bioaccessibility of Phenolic Compounds. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, p. 1–11, 2022.
- SANTOS, D. I. *et al.* **Methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds and nutrients**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

SARKAR, S. *et al.* Quantification of total protein content from some traditionally used edible plant leaves: A comparative study. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v. 8, n. 4, p. 166–170, 2020.

SARTORI, V. C. *et al.* **Plantas Alimentícias Não Convencionais – PANC : resgatando a soberania alimentar e nutricional**. Caxias do Sul, Rio Grande do Sul: Educs, 2020.

SELMI, A. *et al.* Analysis of Minerals and Heavy Metals Using ICP-OES and FTIR Techniques in Two Red Seaweeds (*Gymnogongrus griffithsiae* and *Asparagopsis taxiformis*) from Tunisia. **Biological Trace Element Research**, v. 199, n. 6, p. 2342–2350, 2021.

SERRA MOURA, H. F. *et al.* Evaluation of multielement/proximate composition and bioactive phenolics contents of unconventional edible plants from Brazil using multivariate analysis techniques. **Food Chemistry**, v. 363, p. 129995, 2021.

SHANKAR, K.; MEHENDALE, H. M. **Oxidative Stress**. Third Edit ed. [s.l.] Elsevier, 2014. v. 3

SHARPLESS, K. E. *et al.* Standard reference materials for foods and dietary supplements. **Anal Bioanal Chemistry**, v. 389, n. 1, p. 171–178, 2007.

SHEKHAWAT, M. S.; MANOKARI, M. Optimization of in vitro and ex vitro regeneration and micromorphological studies in *Basella alba* L. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 22, n. 4, p. 605–612, 2016.

SHEN, L. *et al.* High throughput paper spray mass spectrometry analysis. **Clinica Chimica Acta**, v. 420, p. 28–33, 2013.

SIBBR. **Acmella oleracea (L.) R. K. Jansen**. Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/284655?lang=pt_BR#classification>. Acesso em: 19 abr. 2022f.

SIBBR. **Basella alba L.** Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/350598?lang=pt_BR#classification>. Acesso em: 14 abr. 2022c.

SIBBR. **Cyclanthera pedata (L.) Schrad.** Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/287860?lang=pt_BR#classification>. Acesso em: 18 abr. 2022e.

SIBBR. **Lactuca canadensis.** Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/347418?lang=pt_BR#names>. Acesso em: 12 abr. 2022a.

SIBBR. **Pereskia aculeata Mill.** Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/368090?lang=pt_BR#classification>. Acesso em: 20 abr. 2022g.

SIBBR. **Rumex acetosa L.** Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/352662?lang=pt_BR#classification>. Acesso em: 13 abr. 2022b.

SIBBR. **Tropaeolum majus L.** Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/354543?lang=pt_BR#classification>. Acesso em: 18 abr. 2022d.

SIBBR. **Xanthosoma sagittifolium (L.) Schott**. Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/350290?lang=pt_BR#classification>. Acesso em: 20 abr. 2022h.

SILVA, E. C. *et al.* Characterization of two types of azedinha in the region of Sete Lagoas, Brazil. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 328–331, 2013.

SILVA, E. *et al.* Physicochemical Characterization, Antioxidant Activity And Fingerprints Of Industrialized “Detox” Mixed Beverages By Paper Spray Mass Spectrometry. **Química Nova**, v. 43, n. 3, p. 319–324, 2020a.

SILVA, J. G. S. *et al.* In vitro digestion effect on mineral bioaccessibility and antioxidant bioactive compounds of plant-based beverages. **Food Research International**, v. 130, p. 108993, 2020b.

SILVA, L. F. L. E. *et al.* Nutritional evaluation of non-conventional vegetables in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p. 1775–1787, 2018.

SILVA, M. *et al.* Antioxidant Activity and Metabolomic Analysis of Cagaitas (*Eugenia dysenterica*) using Paper Spray Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 5, p. 1034–1044, 2019.

SILVA, M. R. *et al.* Determination of chemical profile of eugenia dysenterica ice cream using PS-MS and HS-SPME/ GC-MS. **Química Nova**, v. 44, n. 2, p. 129–136, 2021.

SILVA, V. D. M. *et al.* Bioactive activities and chemical profile characterization using paper spray mass spectrometry of extracts of *Eriobotrya japonica* Lindl. leaves. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 34, n. 19, p. 1–12, 2020c.

SINGH, N. *et al.* Genus *Cyclanthera* Schrad . (Cucurbitaceae) in India with notes on distribution Phytodiversity Genus *Cyclanthera* Schrad . (Cucurbitaceae) in India with notes on distribution of *Cyclanthera brachystachya* (Ser .) Cogn . inHimachalPradesh , India. **Phytodiversity**, v. 2, n. 1, p. 51–55, 2015.

SOUZA, J. V. A.; LIBERATO, M. da C. T. C.; TEIXEIRA, L. D. da S. Do mato à mesa: um estudo bibliográfico acerca do potencial nutricional das plantas alimentícias não-convencionais: *Portulaca oleracea* L. e *Tropaeolum majus* L/ From the bush to the table: a bibliographic study on the nutritional potential of non-conventio. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 40017–40040, 2021.

SOUZA, M. R. de M. *et al.* Protein yield and mineral contents in *pereskia aculeata* under high-density planting system. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 50, p. 1–8, 2020.

SOUZA, R. G. DE *et al.* Fruits of the Brazilian Atlantic Forest: allying biodiversity conservation and food security. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 4, p. 3583–3595, 2018.

SOUZA, Scheila Vitorino Carvalho de. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: Delineamneto e aplicabilidade em análises de alimentos**. 2007. 296 f. Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

SPINOZZI, E. *et al.* Spilanthol-rich essential oil obtained by microwave-assisted extraction from *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen and its nanoemulsion: Insecticidal, cytotoxic and anti-inflammatory activities. **Industrial Crops and Products**, v. 172, p. 114027, 2021.

SULAIMAN, N.; GIVENS, D. I.; ANITHA, S. A Narrative Review: In-vitro Methods for Assessing Bio-Accessibility/Bioavailability of Iron in Plant-Based Foods. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 1–17, 2021.

SUSHILA, R. *et al.* Cytotoxic and antibacterial activity of *Basella alba* whole plant: A relatively unexplored plant. **Pharmacologyonline**, v. 3, n. January, p. 651–658, 2010.

TAN, Y.; ZHOU, H.; MCCLEMENTS, D. J. Application of static in vitro digestion models for assessing the bioaccessibility of hydrophobic bioactives: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 122, p. 314–327, 2022.

TARKO, T.; DUDA-CHODAK, A. Influence of Food Matrix on the Bioaccessibility of Fruit Polyphenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 1315–1325, 2020.

TARKO, T.; DUDA-CHODAK, A.; ZAJAC, N. Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by in vitro simulation methods. A review. **Roczniki Państwowego Zakładu Higieny**, v. 64, n. 2, p. 79–84, 2013.

TENA, N.; MARTÍN, J.; ASUERO, A. G. State of the Art of Anthocyanins: Antioxidant Activity, Sources, Bioavailability, and Therapeutic Effect in Human Health. **Antioxidants**, v. 9, n. 5, p. 451, 23 maio 2020.

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

TROPICOS. **Erechtites valerianifolius (Link ex Spreng.) DC.** Disponível em: <<http://legacy.tropicos.org/Name/2710024>>. Acesso em: 16 abr. 2022a.

TROPICOS. **Hibiscus acetosella Welw.ex Hiem.** Disponível em: <<https://tropicos.org/name/50279904>>. Acesso em: 25 abr. 2022d.

TROPICOS. **Hibiscus sabdariffa L.** Disponível em: <<https://www.tropicos.org/name/19600047>>. Acesso em: 25 abr. 2022c.

TROPICOS. **Stachys byzantina K. Koch.** Disponível em: <<https://tropicos.org/name/17604539>>. Acesso em: 20 abr. 2022b.

ULLOA ULLOA, C. *et al.* An integrated assessment of the vascular plant species of the Americas. **Science**, v. 358, n. 6370, p. 1614–1617, 2017.

UTHPALA, T. G. G.; NAVARATNE, S. B. *Acmella oleracea* Plant; Identification, Applications and Use as an Emerging Food Source – Review. **Food Reviews International**, v. 37, n. 4, p. 399–414, 2021.

VAN WEGBERG, A. M. J. *et al.* The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 12, n. 1, p. 162, 2017.

VARFAJ, I. *et al.* Environmentally Sustainable Achiral and Chiral Chromatographic Analysis of Amino Acids in Food Supplements. **Molecules**, v. 27, p. 7724, 2022.

VIOLI, J. P. *et al.* Trends in Analytical Chemistry Considerations for amino acid analysis by liquid chromatography- tandem mass spectrometry : A tutorial review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 131, p. 116018, 2020.

WADA, E. *et al.* Farmers perception of agromorphological traits and uses of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) grown in Ethiopia. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 35, p. 2681–2691, 2017.

WADA, E. *et al.* Genetic diversity of Ethiopian cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) accessions as revealed by morphological traits and SSR markers. **PLoS ONE**, v. 16, n. 1, p. 1–14, 2021.

WARNER, R. M.; ERWIN, J. E. Variation in floral induction requirements of *Hibiscus* sp. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 126, n. 3, p. 262–268, 2001.

WISE, S. A.; PHILLIPS, M. M. Evolution of reference materials for the determination of organic nutrients in food and dietary supplements — a critical review. **Anal Bioanal Chemistry**, v. 411, n. 1, p. 97–127, 2019.

WOJTUNIK-KULESZA, K. *et al.* Influence of in vitro digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols—a non-systematic review. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1–28, 2020.

WOLF, W. R.; ANDREWS, K. A system for defining reference materials applicable to all food matrices. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 352, p. 73–76, 1995.

WU, G. **Functional amino acids in nutrition and health**. *Amino Acids*, v. 45, ed. 45, p. 407–411, 2013.

XIAO, F.; GUO, F. Impacts of essential amino acids on energy balance. **Molecular Metabolism**, v. 57, p. 101393, 2022.

XU, W. *et al.* Analytical methods for amino acid determination in organisms. **Amino Acids**, v. 52, n. 8, p. 1071–1088, 2020.

XU, W. *et al.* Continuous Lighting and High Daily Light Integral. **Plants**, v. 10, n. 1203, p. 1–16, 2021.

ZANETTI, G. D.; MANFRON, M. P.; HOELZEL, S. C. S. Análise morfo-anatômica de *Tropaeolum majus* L. (*Tropaeolaceae*). **Iheringia - Serie Botanica**, v. 59, n. 2, p. 173–178, 2004.

ZAYAT, A. G.; RANAL, M. A. Germinação De Sementes De Capiçova ' Seed Germination of Capiçova. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 11, p. 1205–1213, 1997.

ZHANG, *et al.* Analytica Chimica Acta A review : Development and application of surface molecularly imprinted polymers toward amino acids, peptides, and proteins. **Analytica Chimica Acta**, v. 1234, p. 340319, 2022.

YILDIZ, Y.; SIVRI, H. S. Maternal phenylketonuria in Turkey: outcomes of 71 pregnancies and issues in management. **European Journal of Pediatrics**, v. 178, n. 7, p. 1005–1011, 2019.

4. APRESENTAÇÃO

O trabalho foi dividido em quatro capítulos. O capítulo I compreende uma revisão integrativa, relacionada à avaliação do consumo de vegetais e frutas por fenilcetonúricos no controle metabólico de fenilalanina. O segundo capítulo trata da seleção das amostras para estudo, assim como a caracterização quanto à composição centesimal, avaliando os parâmetros de umidade, cinzas, lipídios, proteína, fibras solúveis e insolúveis e carboidratos. Neste capítulo também foi avaliado o perfil de minerais das amostras.

No terceiro capítulo, são abordadas as propriedades antioxidantes pelos métodos ABTS, FRAP e DPPH e o perfil químico das amostras, assim como os efeitos da digestão gastrointestinal *in vitro* sobre esse perfil usando técnicas de espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS). No quarto capítulo, foi realizada a validação de um método quantitativo para determinação do teor de fenilalanina nas amostras, baseada na cromatográfica líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE/UV). Foram determinados a linearidade, efeito matriz, seletividade, limite de quantificação e detecção, recuperação, repetibilidade e precisão.

CAPÍTULO I – REVISÃO INTEGRATIVA

Avaliação do consumo de vegetais e frutas por fenilcetonúricos no controle metabólico de fenilalanina: uma revisão integrativa

Este trabalho foi publicado no periódico *Journal of Medicinal Food*.

MINIGHIN, E. C. et al., Evaluation of the Consumption of Fruits and Vegetables by Phenylketonurics in the Metabolic Control of Phenylalanine: An Integrative Review. **Journal of Medicinal Food**, v.25, n. 5, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1089/jmf.2021.0111>. Disponível em: https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jmf.2021.0111?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed%3E

Avaliação do consumo de frutas e vegetais por fenilcetonúricos no controle metabólico de fenilalanina: uma revisão integrativa

Resumo: A fenilcetonúria (PKU) é uma doença autossômica recessiva causada por variantes no gene que codifica a fenilalanina hidroxilase (PAH), limitando o metabolismo da fenilalanina (Phe). Quando a atividade da PAH é ausente ou dificultada, a Phe não é convertida em tirosina, levando a um acúmulo de Phe no sangue, o que pode causar complicações neurológicas graves. Diagnosticada a PKU, o tratamento deve ser iniciado imediatamente, e a base deste é a restrição dietética de alimentos com altos teores de Phe, associada ao uso de substitutos proteicos e ingestão de alimentos com baixo teor de proteína. Essa restrição acompanha os pacientes ao longo de toda a vida, tornando as suas dietas pouco palatáveis e monótonas, o que representa um grande desafio aos profissionais da saúde e aos pacientes, pois esses fatores favorecem a transgressão alimentar. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi fazer uma revisão integrativa baseada em evidências a respeito da ingestão de vegetais e frutas, por fenilcetonúricos, levando em consideração a maior ou menor tolerância a Phe. Uma vez que, alguns pesquisadores têm se dedicado a avaliar o efeito bioquímico do consumo irrestrito de frutas e vegetais na PKU, unificando as informações a esse respeito. Foi observado que a ingestão de frutas e vegetais com baixo teor de proteína, por pacientes com PKU tem se mostrado promissor, uma vez que os estudos têm demonstrado que a ingestão de proteínas de origem vegetal não apresenta efeitos desfavoráveis ao controle metabólico da Phe.

Palavras-chave: fenilcetonúria; planta; metabolismo.

1. Introdução

A fenilcetonúria (PKU) ocorre por um erro inato autossômico recessivo do metabolismo da fenilalanina (Phe), causado por variantes no gene que codifica a fenilalanina hidroxilase (PAH) (BLAU; VAN SPRONSEN; LEVY, 2010; YILDIZ; SIVRI, 2019). Com a atividade dificultada ou inexistente da PAH, a Phe não é convertida em tirosina (Tyr). Isso acarreta o acúmulo de Phe no sangue, no cérebro e nos tecidos do corpo (BROWN; LICHTER-KONECKI, 2016; BASSANINI *et al.*, 2019). No entanto, ressalta-se que a deficiência de tetrahydrobiopterina (BH4), que é o co-fator necessário para a ativação da PAH,

também pode promover essa alteração (MITCHELL; TRAKADIS; SCRIVER, 2011; MATTOS *et al.*, 2013), assim como as mutações bialélicas no DNAJC12 (JUNG *et al.*, 2019; GALLEGO *et al.*, 2020). Cabe lembrar que o gene DNAJC12 é um membro da família de co-chaperonas de choque térmico e desempenha um papel importante no dobramento adequado de PAH, tirosina hidroxilase e triptofano hidroxilase (ANIKSTER *et al.*, 2017). Dessa forma, defeitos no DNAJC12 podem diminuir a atividade dessas hidroxilases de aminoácidos aromáticos, mimetizando clinicamente as deficiências de BH4 (FENG *et al.*, 2019).

Elevadas concentrações de Phe no organismo reduzem a entrada de outros aminoácidos no cérebro (ALPTEKIN *et al.*, 2018), pois a Phe apresenta maior afinidade pelo transportador cerebral, se comparada a outros aminoácidos, ocasionando a formação de metabólitos tóxicos no cérebro (VAN WEGBERG *et al.*, 2017), como as fenilcetonas (MACDONALD *et al.*, 2020) e outros metabólitos, como fenilpituvato, fenilactato e fenilacetato, que podem acumular nos tecidos e fluidos biológicos (FERREIRA *et al.*, 2020). Além disso, os altos níveis de Phe vêm sendo associados ao estresse oxidativo, que pode induzir danos ao DNA, às proteínas e aos lipídios, bem como provocar a diminuição das defesas antioxidantes, além de promover alterações no déficit bioenergético, interrupção da homeostase do cálcio e da síntese de neurotransmissores no cérebro (SCHUCK *et al.*, 2015). Assim, esses metabólitos, juntamente com o excesso de Phe, podem causar complicações neurológicas, em geral graves, mas sempre irreversíveis (BLAU; SPRONSEN; LEVY, 2010). Dessa forma, deficiência intelectual, autismo, microcefalia, epilepsia, odor de urina murina, hipopigmentação de pele e cabelo, eczema e distúrbios psiquiátricos são características clínicas da PKU (VAN WEGBERG *et al.*, 2017; REGIER; GREENE, 2017).

Desta forma, os distúrbios relacionados à Phe podem ser divididos em deficiência de BH4 e deficiência de PAH. A deficiência de BH4 ocorre devido a falhas na síntese de BH4 que resulta em deficiência de guanosina-trifosfato ciclo-hidrolase ou da deficiência de 6-piruvilil-tetra-hidrobiopterina-sintase (MITCHELL; TRAKADIS; SCRIVER, 2011). Nesse caso, as concentrações de Phe podem se encontrarem normais ou elevadas (CAMP *et al.*, 2014).

Diagnosticada a PKU, o tratamento deve ser iniciado imediatamente, a fim de reduzir os níveis sanguíneos de Phe (AMERICAN COLLEGE OF MEDICAL GENETICS AND GENOMICS THERAPEUTIC COMMITTEE, 2014; VAN SPRONSEN *et al.*, 2017). Sendo assim, o tratamento se baseia na restrição dietética de alimentos com alto teor de Phe e de alimentos e/ou bebidas contendo aspartame (BLAU; VAN SPRONSEN; LEVY, 2010; EVANS *et al.*, 2018; BASSANINI *et al.*, 2019), associado à ingestão de suplementos

alimentares isentos de Phe e adicionado de vitaminas, macro e micro minerais (BROWN; LICHTER-KONECKI, 2016; VAN WEGBERG *et al.*, 2017), além de alimentos com baixo teor de proteína (VAN SPRONSEN *et al.*, 2017, FERREIRA *et al.*, 2020). São exemplos de substitutos proteicos: caseína glicomacropéptido (GMP), grandes aminoácidos neutros (LNAA) (SPÉCOLA; CHIESA, 2017). Contudo, alguns tratamentos farmacêuticos vêm sendo utilizados em combinação com a terapia dietética. São exemplos, o dicloridrato de sapropterina (BROWN; LICHTER-KONECKI, 2016) e a pegvaliase (ROCHA *et al.*, 2021).

Para que haja o êxito no tratamento da PKU, um bom e duradouro controle metabólico com as concentrações sanguíneas de Phe na faixa alvo é essencial. Porém, ainda não há um consenso internacional sobre esse parâmetro. A Diretriz Americana que recomenda níveis plasmáticos de Phe devem ser mantidos na faixa de 120 a 360 $\mu\text{mol/L}$, em todos os pacientes, independentemente da idade (AMERICAN COLLEGE OF MEDICAL GENETICS AND GENOMICS THERAPEUTIC COMMITTEE, 2014). Já a Diretriz Europeia recomenda que a concentração alvo do tratamento deve ser de 120 a 360 $\mu\text{mol/L}$ para crianças até 12 anos, e de 120 a 600 $\mu\text{mol/L}$ para pessoas acima dos 12 anos (VAN SPRONSEN *et al.*, 2017).

Destaca-se que limitações dietéticas acompanham os pacientes com PKU ao longo de toda vida. Isso reduz a flexibilidade e a autonomia dos pacientes durante a alimentação, pois as quantidades prescritas de Phe na dieta visam manter a concentração desse aminoácido no sangue dentro da faixa de tratamento adequada para cada nível de PKU (ZIMMERMANN *et al.*, 2012). A execução das recomendações dietéticas para PKU se caracteriza como uma tarefa rigorosa, que exige muito dos pacientes e responsáveis, pois todo o conteúdo de Phe dos alimentos deve ser contabilizado (BERNSTEIN *et al.*, 2017). Dessa forma, a junção de todos esses fatores favorece as transgressões dietéticas dos pacientes (CASTRO *et al.*, 2012).

A fim de minimizar esses impactos, alguns estudos mostram que alimentos que naturalmente apresentam baixo teor de proteína e, conseqüentemente, de Phe podem ser consumidos sem a necessidade de ser contabilizados, como é o caso de algumas frutas e legumes que apresentam teor de Phe abaixo de 75 mg/100 g, como: manteiga, margarinas, óleos vegetais e amido de mandioca ou batata (VAN WEGBERG *et al.*, 2017; ROCHA; MACDONALD, 2018).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi fazer uma revisão integrativa baseada em evidências a respeito da ingestão de frutas e vegetais que apresentam baixo teor de proteína, feita por fenilcetonúricos, levando em consideração o controle metabólico da Phe, uma vez que alguns pesquisadores têm se dedicado a avaliar o efeito bioquímico do consumo desses alimentos na PKU.

2. Métodos

Este estudo consistiu de uma revisão integrativa da literatura científica. Para tanto, foram adotadas seis etapas: elaboração da pergunta norteadora; busca ou amostragem da literatura; coleta de dados; análise crítica dos estudos incluídos; discussão dos resultados e apresentação da revisão integrativa (SOUZA; SILVA; CARVALHO, 2010).

A presente pesquisa teve como pergunta norteadora: O aumento da ingestão de frutas e vegetais com baixo teor de proteína, por fenilcetonúricos, favorece o controle metabólico da Phe? A busca dos artigos científicos ocorreu no mês de abril de 2021, nas bases de dados *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* (Medline/PubMed), Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) e Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações (BDTD). Para cada base de dados utilizada neste estudo, foi desenvolvida uma estratégia de busca adaptada a cada plataforma. Para isso, os descritores centrais utilizados foram os termos “*Phenylketonuria*” e “*Plants*”.

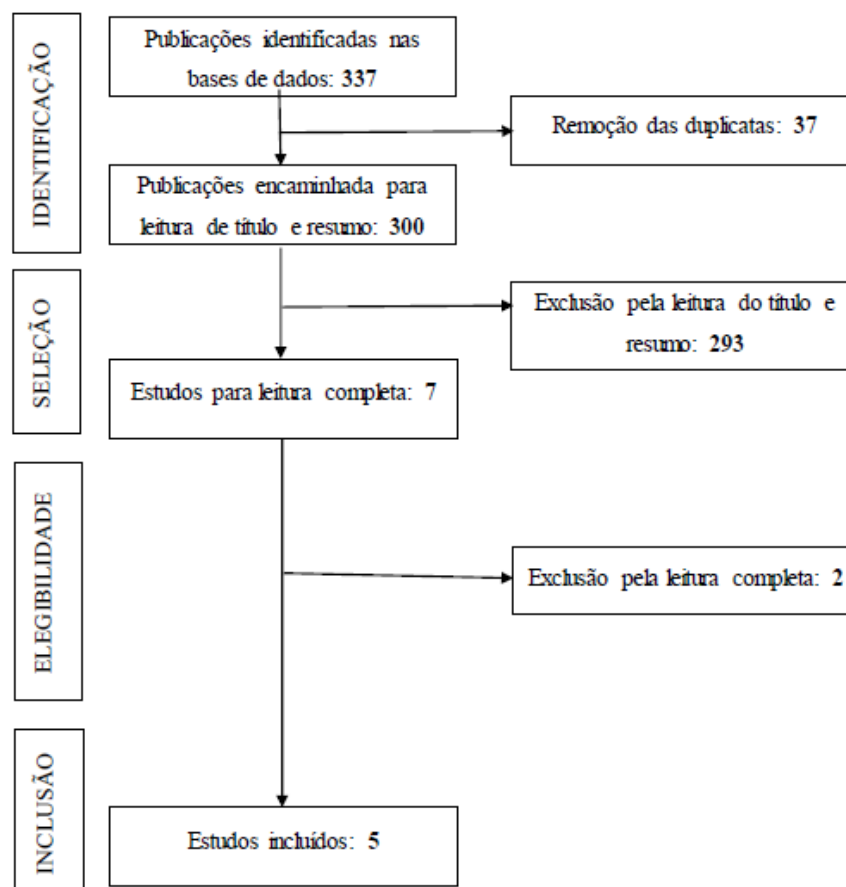
Os critérios de inclusão adotados foram: trabalhos publicados em qualquer período; artigos com resumos e textos completos disponíveis para análise; aqueles publicados nos idiomas português, inglês ou espanhol e cujo título e/ou resumos fizessem referência à temática abordada. Dessa forma, foram inclusos estudos clínicos, desenvolvidos com pacientes, homens e/ou mulheres, adultos e/ou crianças, que apresentassem qualquer nível ou gravidade da PKU e bom controle metabólico da Phe antes da intervenção (fornecimento de uma dieta irrestrita de vegetais) do estudo.

As etapas de seleção consistiram na elaboração de uma planilha no programa *Microsoft office Excel* (versão 2013), com as seguintes variáveis: autor, título, resumo e referência completa. Posteriormente, foi realizada a leitura crítica e reflexiva dos títulos e resumos de todos os trabalhos encontrados, para a primeira seleção dos dados, na qual foram excluídas todas as duplicatas e os estudos que não atendiam aos critérios de inclusão. Posteriormente, procedeu-se uma leitura minuciosa de todos os artigos pré-selecionados, realizando uma nova seleção. Para essa nova seleção, foi avaliado se realmente o artigo contemplava todos os critérios de inclusão. Todos os trabalhos que não se enquadraram nos critérios de inclusão foram excluídos do estudo. Os dados presentes nos artigos selecionados foram compilados e estão apresentados e discutidos no tópico resultados e discussão.

3. Resultado

A amostra inicial foi composta por 337 artigos, distribuídos da seguinte forma: Medline/PubMed 56 artigos; LILACS 196 artigos e BDTD 85 trabalhos (Tabela 1). Dos 337 trabalhos encontrados, 37 estavam em duplicata entre as bases de dados. Após a leitura de todos os títulos e resumos, sete artigos foram selecionados, remanescendo cinco artigos, após a leitura completa do material (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma de inclusão e exclusão de estudos por etapa de seleção



Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 1 – Número de trabalhos selecionados por base de dados antes e após remoção das duplicatas

| Base de dados | Número de trabalhos | |
|----------------|---------------------|---------------|
| | Com duplicata | Sem duplicata |
| Medline/PubMed | 56 | 56 |
| LILACS | 196 | 180 |
| BDTD | 85 | 85 |
| Total | 337 | 321 |

Dos artigos selecionados, todos foram publicados na língua inglesa, sendo dois de origem alemã; um da língua portuguesa; um da língua inglesa e um da suíça. Desses estudos, cinco são pesquisas originais. Em relação aos anos de publicação, apenas um é referente à década passada, realizado no ano de 2003; já os demais artigos (4) estão compreendidos entre os anos de 2012 e 2019.

A Tabela 2 apresenta, de forma sucinta, o que foi realizado nos cinco estudos selecionados. Observa-se que três dos estudos trabalharam com mais de um tipo de PKU, sobressaindo a PKU clássica, que esteve presente em todos os estudos. A idade média dos pacientes dos estudos variou de 4,7 a 19 anos, e quatro dos trabalhos relataram a presença de homens e mulheres, no entanto ressalta-se que as mulheres estiveram presentes em maior número (54,41%) nestes estudos.

Após a leitura completa dos artigos e com a compilação dos dados, constatou-se que três trabalhos (ROHDE *et al.*, 2012; ZIMMERMANN *et al.*, 2012; ROHDE *et al.*, 2014) utilizaram como referência e justificativa para seus estudos o trabalho de MacDonald *et al.* (2003).

O estudo de MacDonald *et al.* (2003) demonstra que o consumo irrestrito de frutas e vegetais que contêm Phe entre 51-100 mg/100 g forneceram quantidades substanciais de Phe na dieta e aumento da ingestão diária deste aminoácido em uma mediana de 51 mg e 39 mg, nos períodos 2 e 3, respectivamente. No entanto, MacDonald *et al.* (2003) destacaram que, embora essas frutas (ex: passas, banana e abacate) e vegetais (ex: brócolis, couve e couve flor) tenham proporcionado um aumento da Phe na dieta, as quantidades ingeridas não foram o suficiente para alterar as concentrações plasmáticas de Phe. Desse modo, conclui-se que frutas e vegetais contendo teores de Phe entre 51 a 100 mg/100 g podem ser incorporados à dieta sem restrições.

Rohde *et al.* (2012) verificaram que o consumo total de Phe aumentou em média 58 mg/dia durante o estudo. Desses 58 mg, cerca de 50% foram derivados de batatas ou cereais, e os outros 50% foram cobertos por laticínios e carnes. Rohde *et al.* (2012) relacionam esse fato à cultura local dos participantes, pois crianças alemãs, saudáveis e na mesma faixa etária do estudo, normalmente consomem apenas 50% da dose diária recomendada de frutas e legumes.

Tabela 2 – Síntese dos principais dados presentes nos artigos selecionados para o estudo

| Autores / Ano | Tipo de estudo | Etapas | Amostragem | Número de paciente | Idade média | Tipo de PKU | Resultados |
|---------------------------------|--------------------|---|--|---------------------------------|---|---------------------------|--|
| MacDonald <i>et al.</i> (2003) | Aberto prospectivo | Os pacientes fizeram o uso irrestrito de frutas e vegetais durante 15 semanas. Semanas 1 a 3: 0-50 mg Phe /100g. Semanas 4 a 8: 51-75 mg Phe/100g. Semanas 9 a 15: 76-100 mg Phe/100g. | Amostras de sangue foram coletadas duas vezes ao dia, antes do café da manhã e antes da refeição noturna, nos últimos três dias das semanas 1, 3, 6, 8, 11, 13 e 15. | 12 (2 homens e 10 mulheres) | 6 (1-24 anos) | Clássica e moderada | A análise de variância de medidas repetidas não mostrou alterações significativas na concentração de Phe, dentro ou entre as três partes do estudo. Ou seja, o uso gratuito de frutas e vegetais contendo Phe 51-75mg/100g e 76-100mg/100g não afetou negativamente o controle plasmático de Phe. |
| Rohde <i>et al.</i> (2012) | Aberto | Durante as duas primeiras semanas os pacientes seguiram o tratamento clássico da PKU. Por mais duas semanas os pacientes consumiram livremente frutas e vegetais. | Amostras de sangue foram coletadas diariamente durante a manhã após jejum noturno | 14 (6 homens e 8 mulheres) | 5,7 (2-10 anos) | Clássica | A ingestão irrestrita de frutas e vegetais na dieta PKU não comprometeu o controle metabólico da Phe a curto prazo. Os pacientes aumentaram sua ingestão diária de Phe em uma média de 58 mg, cerca de 18% da quantidade diária permitida de proteína natural. |
| Zimmermann <i>et al.</i> (2012) | Retrospectivo | Os pacientes fizeram a ingestão de frutas e vegetais com teor de Phe <100mg/100g, em quantidades recomendadas pela OMS para todos os indivíduos, por um período de 3 anos. | O sangue foi coletado 1 hora após o café da manhã ou jantar. A frequência de coleta variou de acordo com a idade. 0 a 2 anos: 1 a 2 semanas 2 a 10 anos: 1 a 4 semanas >10 anos: 1 vez ao mês. A ingestão dietética de Phe foi avaliada em todos os pacientes antes da mudança na dieta. | 80 (40 homens e 40 mulheres) | Clássica: 19 (2-51 anos) Moderada: 10 (2-27 anos) Leve: 16,5 (2-29 anos) | Clássica, moderada e leve | O nível médio de Phe no sangue não diferiu do nível médio de Phe na dieta clássica e foi de 355µmol/L na PKU clássica, 313µmol/L na PKU moderada e 336µmol/L na PKU leve. Em particular, o uso de frutas e vegetais com teor de Phe <100mg/100g não teve efeito negativo nos níveis de Phe, independentemente da gravidade da PKU, da idade e da mudança de dieta. |
| Rohde <i>et al.</i> | Randomizado, | Seis meses antes do | Amostras de sangue foram | 16 | 4,7 | Clássica | As concentrações médias de Phe |

| Autores / Ano | Tipo de estudo | Etapas | Amostragem | Número de paciente | Idade média | Tipo de PKU | Resultados |
|----------------------------|-----------------------------|---|--|------------------------------|--------------------|----------------------|---|
| (2014) | cross-over | estudo os pacientes foram submetidos a uma intervenção cruzada aleatória com 2 semanas de consumo restrito e de livre acesso a frutas e vegetais com <75 mg Phe/100g. Posteriormente, todos os pacientes tiveram acesso gratuito a frutas e vegetais por mais 12 meses. | coletadas nos dias 1, 2, 11, 12, 13, 15, 16, 25, 26, 27, 178, 179, 180, 363, 364, 365 do estudo. | | (2-10 anos) | | no sangue permaneceram dentro da faixa recomendada. A média de ingestão de Phe aumentou significativamente em 65mg/dia (p<0,001) na quarta semana, 68mg/dia (p<0,001) no sexto mês e 70mg/dia (p<0,001) no decimo segundo mês. |
| Pinto <i>et al.</i> (2019) | Longitudinal, retrospectivo | A ingestão de proteína de origem vegetal e/ou animal foi introduzida gradualmente para manter a Phe no sangue <480 µmol/L* ou até que uma ingestão normal de proteínas fosse alcançada. A tolerância a proteína natural foi calculada no início e uma mediana de 6 meses após desafio sistemático com proteína natural. | O sangue foi coletado em jejum 6 meses antes da primeira e segunda avaliação dietética | 40 (24 homens e 16 mulheres) | 17 (12-29 anos) | Clássica, HPA e leve | A ingestão média de proteína de origem vegetal e/ou animal aumentou significativamente da primeira para a segunda avaliação 35 (23-60) vs. 40 (25-75) g/dia. A maioria dos pacientes com PKU clássica aumentou a ingestão de proteína a partir de fontes vegetais (3/4) usando alimentos como pão, macarrão e batata. |

*nível de Phe no sangue alvo superior para pacientes com 12 anos de idade, usando as diretrizes da PKU em Portugal.

PKU: fenilcetonúria; Phe: fenilalanina; HPA: hiperfenilalaninemia; OMS: Organização Mundial da Saúde

Apesar da ingestão de Phe ter aumentado significativamente, Rohde *et al.* (2012) frisaram que o consumo de frutas e vegetais não influenciou a qualidade do tratamento. Destaca-se que purê de outras frutas, maçãs, bananas, cenouras e pepinos foram os vegetais mais consumidos pelos pacientes. Com isso concluíram que o livre consumo de frutas e vegetais não apresentou efeitos adversos ao controle metabólico em curto prazo (4 semanas).

Diferentemente dos estudos de MacDonald *et al.* (2003) e Rohde *et al.* (2012), Zimmermann *et al.* (2012) desenvolveram um estudo a longo prazo (3 anos). Nele, os pesquisadores demonstraram que a ingestão não ponderada de frutas e vegetais que apresentam teor de Phe menor que 100 mg/100 g não desestabiliza o controle metabólico de Phe no sangue em todos os subgrupos de PKU (clássica, moderada e leve) avaliados.

Zimmermann *et al.* (2012) também avaliaram o efeito da dieta rica em frutas e vegetais em diferentes faixas etárias da PKU e constataram que essa abordagem (ingestão irrestrita de frutas e vegetais com teor de Phe abaixo de 100 mg/100 g) é segura para crianças menores de 10 anos. Dessa forma, tanto o grau da PKU, quanto a idade na mudança de dieta não influenciam a capacidade de ingerir frutas e vegetais com teor de Phe inferior a 100 mg/100 g. Em conclusão, Zimmermann *et al.* (2012) indicam que a ingestão de frutas e vegetais com teor de Phe inferior a 100 mg/100 g em quantidades recomendadas pela Organização Mundial da Saúde para indivíduos saudáveis aumenta a autonomia dos pacientes em relação à nutrição, melhorando a qualidade de vida.

Dando continuidade ao estudo de 2012 (ROHDE *et al.*, 2012), Rohde *et al.* (2014) verificaram que as condições do estudo (Tabela 2) são totalmente mantida por um longo período, apesar do aumento geral da tolerância à Phe em 68 mg/dia, ou seja, a ingestão irrestrita de frutas e vegetais não impediu o controle metabólico da Phe a longo prazo. Assim, conclui-se que a consequência mais significativa do estudo não é a quantidade adicional de Phe que os pacientes podem consumir, mas, sim, a liberdade em poder consumir uma gama maior de alimentos saudáveis sem necessidade de calcular suas quantidades (ROHDE *et al.*, 2014).

Dos estudos aqui apresentados, o único que trabalhou com a ingestão de proteína de origem animal e vegetal foi o de Pinto *et al.* (2019), no qual observaram que pelo menos metade dos pacientes de cada nível da PKU (clássica, HPA e leve) estudada foi capaz de aumentar a ingestão de proteína no mínimo 20%. Também foi observado

que o controle mediano de Phe no sangue permaneceu estável e dentro da faixa alvo (< 480 $\mu\text{mol/L}$), ao comparar os resultados da primeira (279 $\mu\text{mol/L}$) e da segunda avaliação (288 $\mu\text{mol/L}$).

Levando em consideração apenas os dados que fazem referência à ingestão de proteína vegetal, Pinto *et al.* (2019) observaram que o grupo de pacientes ($n = 6$) que fizeram apenas a ingestão desse tipo de proteína tiveram uma prescrição mediana total de proteína de 23 g/dia na segunda avaliação. Ou seja, os pacientes passaram a tolerar mais proteína vegetal que o prescrito em suas dietas. Nesse contexto, Pinto *et al.* (2019) ressaltam que a mediana de Phe no sangue desses pacientes permaneceu inalterada, concluindo que os resultados obtidos no estudo são reprodutíveis em todas as classes de PKU, e que grande parte dos pacientes com PKU, toleram mais proteína que o prescrito, o que pode influenciar positivamente na qualidade de vida dos pacientes.

4. Discussão

De forma geral, todos os estudos aqui apresentados concluíram que a ingestão de frutas e vegetais com baixo teor proteico não apresenta efeitos desfavoráveis ao controle metabólico da Phe em pacientes com PKU. Esses resultados foram observados em todos os estudos (Tabela 2), independentemente do tempo de intervenção, da idade, do sexo e da gravidade da doença. Isso se aplica até mesmo para os pacientes que apresentavam a PKU clássica, que é a forma mais severa e restritiva quanto à alimentação da PKU.

Dessa forma, o acréscimo irrestrito de frutas e vegetais que apresentam teor de Phe abaixo de 100 mg/100 g na dieta dos fenilcetonúricos apresenta-se favorável. Isso ocorre, uma vez que os pacientes conseguem aumentar a ingestão diária de Phe, manter os níveis plasmáticos de Phe dentro da faixa alvo e, por consequência, diversificar a dieta, deixando-a menos monótona e mais equilibrada, o que também pode auxiliar na adesão dietética.

A maior inserção de frutas e vegetais com baixo teor de proteína na alimentação desses pacientes pode auxiliar no fornecimento de vitaminas e de minerais, juntamente com os suplementos alimentares isentos de Phe, que normalmente já fazem parte da rotina alimentar dos pacientes e são uma das principais fontes de micronutrientes da dieta já que são enriquecidos com ferro, zinco selênio e vitamina

B12, por exemplo (VAN WEGBERG *et al.*, 2017). Além disso, ressalta-se que frutas e vegetais também são ricos em fibras.

Baseando-se na hipótese de que as fibras alimentares inibem a reabsorção completa das proteínas, acredita-se que, embora esses alimentos tenham proporcionado um aumento da Phe na dieta, ainda pode não ter sido o suficiente para alterar as concentrações metabólicas desse aminoácido. Isso porque a baixa digestibilidade das proteínas vegetais, associada a fibras resistentes nas paredes celulares das plantas, e os fatores antinutricionais podem aumentar as perdas de proteínas endógenas no íleo terminal (SALGADO *et al.*, 2002) e aumentar a excreção de nitrogênio nas fezes (GILANI; COCKELL; SEPEHR 2005).

Sendo assim, pressupõe-se que quanto maior o teor de fibras das frutas e vegetais, menor é a digestibilidade das proteínas e maior é a excreção de nitrogênio nas fezes. Assim, por consequência, indivíduos que fazem maior consumo desses alimentos podem ter maior tolerância à Phe, enquanto esse acontecimento pode estar de fato, relacionado à má utilização desse aminoácido nesses alimentos (EGGUM, 1995; ROHDE *et al.*, 2012).

Além de não intervir no controle metabólico da Phe, o consumo irrestrito de frutas e vegetais com teor de Phe abaixo de 100 mg/100 g pode auxiliar no manejo de outras comorbidades, normalmente relacionadas a pacientes com PKU, como obesidade (BURRAGE *et al.*, 2012), anemia (BURTON *et al.*, 2018), doenças cardiovasculares, diabetes mellitus (TREFZ *et al.*, 2019). Já que o consumo de frutas e vegetais está associada à redução da inflamação e, conseqüentemente, a efeitos benéficos à saúde, como a prevenção de doenças crônicas (STEFLENER *et al.*, 2016; HOSSEINI *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2021).

Entende-se que todas as pesquisas aqui apresentadas possuem limitações importantes, como a falta de cálculo amostral e individual da ingestão de Phe durante o estudo, a padronização da dieta, o curto período de estudo e a utilização de um grupo controle. Outra limitação que impede um melhor aproveitamento dos estudos é a falta de informação quanto a frutas e vegetais utilizados pelos pacientes durante o estudo. Apesar disso, esses trabalhos servem como ponto de partida para a realização de mais estudos que abordem os efeitos de outras fontes de proteína, como, por exemplo, a proteína animal e a de cereais, uma população maior e por um período maior, levando em consideração a idade, o sexo e o fenótipo da PKU e com melhor delineamento. Também reconhecemos como limitação do presente estudo a parte metodológica, pois

as buscas de trabalhos poderiam ter sido realizadas em outras bases de dados, sem limitar o idioma em inglês, português e espanhol.

Em conclusão, a ingestão de proteína de origem vegetal, por meio de frutas e vegetais, tem se mostrado favorável a pacientes com PKU, uma vez que os estudos têm demonstrado que o consumo dessa proteína não tem apresentado efeitos negativos ao controle metabólico da Phe.

Com a inserção de frutas e vegetais que apresentam teores de Phe abaixo de 100 mg/100 g na dieta, os pacientes com PKU passam a ter maior autonomia na escolha dos alimentos e, assim, adquirem uma dieta mais equilibrada e saudável. Nesse sentido, essa abordagem dietética torna-se promissora por poder reduzir a carga de uma dieta muito restritiva. No entanto, ressalta-se a necessidade de mais estudos que abordem os efeitos da ingestão irrestrita de alimentos que apresentam baixo teor de proteína, incluindo diferentes faixas etárias e classes da PKU.

5. Referência bibliográfica

ALPTEKIN, I. M. et al. The impact of phenylketonuria on PKU patients' quality of life: Using of the phenylketonuria-quality of life (PKU-QOL) questionnaires. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 27, p. 79–85, 2018.

AMERICAN COLLEGE OF MEDICAL GENETICS AND GENOMICS THERAPEUTIC COMMITTEE. Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline. **Genetics in Medicine**, v. 16, n. 2, p. 188–200, 2014.

ANIKSTER, Y. et al. Biallelic Mutations in DNAJC12 Cause Hyperphenylalaninemia, Dystonia, and Intellectual Disability. **The American Journal of Human Genetics**, v. 100, n. 2, p. 257–266, 2017.

BASSANINI, G. et al. Phenylketonuria Diet Promotes Shifts in Firmicutes Populations. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. 101, p. 1–9, 2019.

BERNSTEIN, L. et al. Multiclinic Observations on the Simplified Diet in PKU. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2017, p. 1–5, 2017.

BLAU, N.; VAN SPRONSEN, F. J.; LEVY, H. L. Phenylketonuria. **The Lancet**, v. 376, n. 9750, p. 1417–1427, 2010.

BROWN, C. S.; LICHTER-KONECKI, U. Phenylketonuria (PKU): A problem solved? **Molecular Genetics and Metabolism Reports**, v. 6, p. 8–12, 2016.

BURRAGE, L. C. et al. High prevalence of overweight and obesity in females with phenylketonuria. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 107, n. 1–2, p. 43–48, 2012.

BURTON, B. K. et al. Prevalence of comorbid conditions among adult patients diagnosed with phenylketonuria. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 125, n. 3, p. 228–234, 2018.

CAMP, K. M. et al. Phenylketonuria scientific review conference: State of the science and future research needs. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 112, n. 2, p. 87–122, 2014.

CASTRO, I. P. S. et al. Relationships between phenylalanine levels, intelligence and socioeconomic status of patients with phenylketonuria. **Jornal de Pediatria**, v. 88, n. 4, p. 353–356, 2012.

EGGUM, B. O. The influence of dietary fibre on protein digestion and utilization in monogastrics. **Archiv für Tierernaehrung**, v. 48, n. 1–2, p. 89–95, 1995.

EVANS, S. et al. The influence of parental food preference and neophobia on children with phenylketonuria (PKU). **Molecular Genetics and Metabolism Reports**, v. 14, p. 10–14, 2018.

FENG, Y. et al. Identification of an inherited pathogenic DNAJC12 variant in a patient with hyperphenylalaninemia. **Clinica Chimica Acta**, v. 490, p. 172–175, 2019.

FERREIRA, B. K. et al. White matter disturbances in phenylketonuria: Possible underlying mechanisms. **Journal of Neuroscience Research**, v. 99, n. 1, p. 349–360, 2021.

GALLEGO, D. et al. Pathogenic variants of DNAJC12 and evaluation of the encoded cochaperone as a genetic modifier of hyperphenylalaninemia. **Human Mutation**, v. 41, n. 7, p. 1329–1338, 2020.

GILANI, G. S.; COCKELL, K. A.; SEPEHR, E. Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acid availability in foods. **Journal of AOAC International**, n. 88, p. 976–978, 2005.

HOSSEINI, B. et al. Effects of fruit and vegetable consumption on inflammatory biomarkers and immune cell populations: a systematic literature review and meta-analysis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 108, n. 1, p. 136–155, 2018.

JUNG-KC, K. et al. Phenylalanine hydroxylase variants interact with the co-chaperone DNAJC12. **Human Mutation**, v. 40, n. 4, p. 483–494, 2019.

MAC DONALD, A. et al. Free use of fruits and vegetables in phenylketonuria. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 26, n. 4, p. 327–338, 2003.

MACDONALD, A. et al. PKU dietary handbook to accompany PKU guidelines. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1–21, 2020.

- MATTOS, B. A. et al. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. In: PICON, P. D.; GADELHA, M. I. P.; ALEXANDRE, R. F. (Ed.). **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas**. ANVISA ed. Brasília: ANVISA, 2013. p. 363–377.
- MITCHELL, J. J.; TRAKADIS, Y. J.; SCRIVER, C. R. Phenylalanine hydroxylase deficiency. **Genetics in Medicine**, v. 13, n. 8, p. 697–707, 2011.
- PINTO, A. et al. Over restriction of dietary protein allowance: The importance of ongoing reassessment of natural protein tolerance in phenylketonuria. **Nutrients**, v. 11, n. 5, 2019.
- REGIER, D. S.; GREENE, C. L. Phenylalanine Hydroxylase Deficiency Summary Diagnosis Suggestive Findings. In: [s.l: s.n.]p. 1–23.
- ROCHA, J. C. et al. Development of a practical dietitian road map for the nutritional management of phenylketonuria (PKU) patients on pegvaliase. **Molecular Genetics and Metabolism Reports**, v. 28, p. 100771, 2021.
- ROCHA, J. C.; MACDONALD, A. Treatment options and dietary supplements for patients with phenylketonuria. **Expert Opinion on Orphan Drugs**, v. 6, n. 11, p. 667–681, 2018.
- ROHDE, C. et al. Unrestricted consumption of fruits and vegetables in phenylketonuria: No major impact on metabolic control. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, n. 5, p. 633–638, 2012.
- ROHDE, C. et al. Unrestricted fruits and vegetables in the PKU diet: A 1-year follow-up. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 3, p. 401–403, 2014.
- SALGADO, P. et al. Legume grains enhance ileal losses of specific endogenous serine-protease proteins in weaned pigs. **Nutrition**, n. 132, p. 1913–1920, 2002.
- SCHUCK, P. F. et al. Phenylketonuria Pathophysiology: on the Role of Metabolic Alterations. **Aging and disease**, v. 6, n. 5, p. 390–399, 2015.
- SPÉCOLA, N.; CHIESA, A. Alternative Therapies for PKU. **Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening**, v. 5, p. 232640981668573, 2017.
- STEFLE, D. et al. Fruit and vegetable consumption and mortality in Eastern Europe: Longitudinal results from the Health, Alcohol and Psychosocial Factors in Eastern Europe study. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 23, n. 5, p. 493–501, 2016.
- TAVARES DE SOUZA, M.; DIAS DA SILVA, M.; DE CARVALHO, R. Revisão integrativa: o que é e como fazer. **Einstein**, v. 8, n. 1, p. 102–6, 2010.
- TREFZ, K. F. et al. Clinical burden of illness in patients with phenylketonuria (PKU) and associated comorbidities - a retrospective study of German health insurance claims data. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 14, n. 1, p. 181, 2019.

VAN SPRONSEN, F. J. et al. Key European guidelines for the diagnosis and management of patients with phenylketonuria. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 5, n. 9, p. 743–756, set. 2017.

VAN WEGBERG, A. M. J. et al. The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 12, n. 1, p. 162, 2017.

WANG, D. D. et al. Fruit and Vegetable Intake and Mortality. **Circulation**, v. 143, n. 17, p. 1642–1654, 2021.

YILDIZ, Y.; SIVRI, H. S. Maternal phenylketonuria in Turkey: outcomes of 71 pregnancies and issues in management. **European Journal of Pediatrics**, v. 178, n. 7, p. 1005–1011, 2019.

ZIMMERMANN, M. et al. Positive effect of a simplified diet on blood phenylalanine control in different phenylketonuria variants, characterized by newborn BH4 loading test and PAH analysis. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 106, n. 3, p. 264–268, 2012.

CAPÍTULO II – TRABALHO EXPERIMENTAL

Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC): composição centesimal e perfil de minerais

Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC): composição centesimal e perfil de minerais

Resumo: Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) é um termo utilizado para caracterizar plantas com uma ou mais partes comestíveis como folhas e flores, mas que não fazem parte do circuito global de comercialização. Essas espécies podem contribuir significativamente para a alimentação humana, uma vez que, podem ser fontes de uma grande variedade de nutrientes. Em alguns casos, podem ser usadas em dietas especiais, como a de pacientes com fenilcetonúria, que requerem uma dieta com baixo teor proteico, sendo recomendado o consumo de espécies vegetais com teores de proteína abaixo de 5% em matéria úmida. Neste contexto, objetivou-se selecionar PANC hipoproteicas (para pacientes fenilcetonúricos) e caracterizar quanto à composição centesimal e o teor de minerais. Foram selecionadas 15 amostras de PANC, incluindo folhas, caule, flor, fruto e sépala, distribuídos em nove famílias botânicas e 12 espécies, compreendendo almeirão-de-árvore, azedinha, bertalha, capiçoba, capuchinha, chuchu-de-vento, jambu, ora-pro-nóbis com e sem espinho, peixinho, taioba, vinagreira e vinagreira-roxa. Para avaliar a composição centesimal as amostras foram submetidas à análise de umidade, cinzas, lipídios, proteínas, fibras e carboidratos. Os resultados foram expressos em g/100 g em base seca. Já o perfil de minerais foi realizado por ICP-OES, com os resultados expressos em mg/100 g de base seca. Os resultados demonstraram que as PANC avaliadas podem ser uma alternativa para diversificar a alimentação de alguns indivíduos com fenilcetonúria, uma vez que, os teores de proteínas foram considerados baixos (5,54 a 28,36 g/100 g em base seca). Além disso, verificou-se valores interessantes para macro e microminerais, destacando a bertalha no fornecimento de K (7.031,96 mg/100 g), o ora-pro-nóbis com espinho para Ca (4.862 mg/100 g) e Mg (785,21 mg/100 g). Além disso, em algumas espécies como peixinho (141,37 mg/100 g) e vinagreira-roxa (106,16 mg/100 g) os teores de Fe observados foram superiores aos reportados para plantas convencionais. Estudos dessa natureza são importantes para obter informações quanto ao potencial alimentício dessas espécies que ainda são pouco exploradas. Ressalta-se que o uso de PANC permite uma dieta diversificada com qualidade nutricional.

Palavras-chave: Fenilcetonúria. Micronutrientes. Proteína. Vegetais não convencionais.

1. Introdução

Composta por diversas plantas nativas, exóticas e naturalizadas, a flora brasileira em sua biodiversidade apresenta inúmeras espécies, ainda pouco exploradas quanto ao potencial nutricional, químico, farmacêutico e econômico (ZIMMER; OTERO; ZAMBIAZI, 2020; PEREIRA; MEDEIROS; ARAÚJO, 2021). Muitas dessas espécies, são consideradas como Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) e em função desse potencial, vem ganhando destaque na comunidade científica.

Essas espécies, não fazem parte do circuito global de comercialização (KINUP; LORENZI, 2014). Além disso, possuem uma ou mais partes com potencial alimentar, tais como: folhas, frutos, rizomas, flores, talos e sementes (KINUP; LORENZI, 2014; PAULA FILHO; BARREIRA; PINHIRO-SANT'ANA, 2022). Historicamente, vêm sendo negligenciadas, devido ao avanço da agricultura globalizada e homogenia (monocultura) com a entrada das chamadas hortaliças modernas, melhoradas geneticamente e bem estabelecidas no mercado (PEISINO *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2021; MILIÃO *et al.*, 2022).

No entanto, com a popularização do termo PANC, criado pelo biólogo brasileiro Valdely Ferreira Kinupp, essas espécies que antes eram conhecidas em uma região específica, mas pouco explorada em outras regiões do país, passaram a despertar interesse crescente da população (OTERO; FERREIRA-RIBEIRO, 2019; COBUS *et al.*, 2023). Essa demanda também surge a partir do apelo do consumidor por uma alimentação mais saudável. Essas plantas podem contribuir significativamente para a alimentação humana, uma vez que, podem ser fontes de uma grande variedade de nutrientes, como proteínas, carboidratos, minerais, vitaminas, fibras alimentares e compostos fenólicos (MOURA *et al.*, 2021; SERRA-MOURA *et al.*, 2021; MILIÃO *et al.*, 2022). Muitas vezes, esse conteúdo nutricional, pode ser mais significativo quando comparado com outras plantas alimentícias convencionais (KINUPP; LORENZI, 2014; SILVA *et al.*, 2018; PEISIANO *et al.*, 2019; DA CUNHA *et al.*, 2020).

Dentre os constituintes presentes o conteúdo proteico merece destaque, pois pode desempenhar um papel importante para a sustentabilidade, biodiversidade e na distribuição mais eficiente de proteína de boa qualidade para toda população (FASOLIN *et al.*, 2019; MILIÃO *et al.*, 2022). Kinupp e Barros (2007), ao avaliarem o teor de proteína em 69 espécies nativas consideradas PANC verificaram que as espécies como erva-moura (*Solanum americanum*); mestruz (*Coronopus didymus*) e urtiga (*Urtica*

circularis) apresentam teores de proteína superior a plantas alimentícias convencionais enquanto outras apresentam teores bem abaixo como a tarumã (*Vitex megapotamica*), que, em base seca, apresenta 2,07% de proteína e de ananá (*Ananas bracteatus*) com 2,93%.

Desta forma, ressalta-se que o consumo dessas espécies pode representar uma nova opção alimentar, principalmente para grupos populacionais que buscam uma alimentação mais saudável, ou para aquelas que possuem alguma restrição alimentar, como os fenilcetonúricos. No entanto, a inclusão de informações sobre a sua composição torna-se importante para avaliar a oferta dessas fontes alimentares e verificar a possibilidade de adequação nutricional desses alimentos na dieta (OTERO; FERREIRA-RIBEIRO, 2019). Neste contexto o objetivo deste estudo foi selecionar PANC hipoproteicas (para pacientes fenilcetonúricos) e caracterizar quanto à composição centesimal e o teor de minerais.

2. Material e métodos

2.1 Coleta, preparo e seleção das Amostras

Todas as amostras do presente estudo foram coletadas no Banco de Hortaliças Não Convencionais do Campo Experimental Santa Rita da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) (Latitude 19°27'15.80"S e Longitude 44° 9'24.37"W), em Prudente Morais, Minas Gerais, Brasil. As coletas ocorreram durante o período da manhã, no decorrer dos meses de novembro de 2020 a outubro de 2021, respeitando o ciclo de produção de cada amostra.

Para a seleção das amostras, seguiu-se o critério de inclusão e exclusão de alimentos para a elaboração da Tabela de Composição de Alimentos para Fenilcetonúricos, proposto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2022). Sendo assim, foi incluso no estudo apenas PANC que apresentaram teor de proteína entre 0,10 a 5,00% em base úmida (Dado apresentado no apêndice A).

Para avaliar se a PANC se encaixava no perfil hipoproteico, foi realizada uma consulta à literatura, para verificar o teor de proteína; que foi posteriormente confirmado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2016), utilizando o fator de conversão de 5,75 (BRASIL, 2020).

As espécies das plantas selecionadas foram herborizadas, registradas e as exsicatas depositadas no Herbário PAMG da EPAMIG (Tabela 1). A pesquisa aqui apresentada foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob o número de registro AC4BDD3.

Tabela 1 - Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) selecionadas

| Nome popular | Nome científico | Família | Registro | Parte de interesse |
|----------------------------|--|---------------|----------|--------------------|
| Almeirão-de-árvore | <i>Lactuca canadensis</i> L. | Asteraceae | 58852 | Folha |
| Azedinha | <i>Rumex acetosa</i> L. | Polygonaceae | 58869 | Folha |
| Bertalha | <i>Basella alba</i> L. | Basellaceae | 58855 | Folha |
| Capiçoba | <i>Erechtites valerianifolius</i> (Link ex Spreng.) DC | Asteraceae | 58850 | Folha |
| Capuchinha | <i>Tropaeolum majus</i> L. | Tropaeolaceae | 58875 | Flor e Folha |
| Chuchu-de-vento | <i>Cyclanthera pedata</i> (L.) Schrad | Cucurbitaceae | 58859 | Fruto |
| Jambu | <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen | Asteraceae | 58848 | Folha |
| Ora-pro-nóbis espinhos com | <i>Pereskia aculeata</i> Mill. | Cactaceae | 57026 | Folha |
| Ora-pro-nóbis espinhos sem | <i>Pereskia aculeata</i> Mill. | Cactaceae | 58920 | Folha |
| Peixinho | <i>Stachys byzantina</i> K. Koch | Lamiaceae | 58863 | Folha |
| Taioba | <i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott | Araceae | 58843 | Folha e Talo |
| Vinagreira | <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. | Malvaceae | 58868 | Sépala |
| Vinagreira-roxa | <i>Hibiscus acetosella</i> Welw. ex Hiem | Malvaceae | 58864 | Folha |

Após a coleta, foi realizada a seleção das partes de interesse das PANC, seguida da higienização, por meio, de lavagem e imersão em solução clorada a 200 mg/L por 15 minutos, e desidratação em estufa com circulação de ar forçada (Biopar S480AD) a 35°C por 48 horas. As amostras já desidratadas foram devidamente armazenadas em sacos de papel pardo e encaminhadas para o Laboratório de Química de Alimentos do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Em seguida, foram trituradas em liquidificador (ARNO, Modelo L.S) até a obtenção de um pó fino e homogêneo

(padronizado em tamis 14 mesh), para posterior armazenamento em frasco de vidro, em local seco, arejado e ao abrigo de luz até o momento das análises. Simultaneamente ao processo de desidratação realizou-se a determinação do teor de umidade das amostras *in natura*, em estufa (Fanem 320-SE) a 105°C até peso constante (AOAC, 2016).

2.2 Composição centesimal

Além das análises de umidade e proteína apresentadas no tópico anterior, foram avaliados os teores, de cinzas em mufla (Magnu's analógico) a 550°C; de lipídios por extração semi-contínua em Soxhlet (Quimis 9002), seguida da remoção por destilação do solvente éter etílico e de fibras solúveis e insolúveis pelo método enzimático-gravimétrico (AOAC, 2016). Além disso, o teor de carboidrato total foi obtido por diferença. Todo o experimento foi realizado em triplicata e o resultado calculado em g/100 g de matéria seca.

2.3 Quantificação de minerais

Para determinar o teor dos minerais (Na, K, Ca, Fe, Cu, Cr, Mg, Mn, Zn), as amostras foram primeiramente submetidas, ao processo de digestão ácida (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Para isso, 1 g de cada amostra foi colocada em estufa a 105°C (Marconi MA 035), para redução do teor de umidade e posterior carbonização em mufla a 550°C (Vulcan 3-1750) até que as cinzas ficassem brancas. Após esta etapa, as amostras foram resfriadas e acrescidas de 1 mL de solução de ácido nítrico 37%, retornando-as novamente para a mufla. Esse processo foi repetido até que as amostras ficassem completamente mineralizadas. As cinzas então, foram dissolvidas em 1 mL de ácido clorídrico 37% e transferidas quantitativamente com água MilliQ para balão volumétrico de 50 mL. Todo o processo de digestão ácida foi realizado em triplicata, juntamente com a amostra branco e o branco fortificado, que era composto por 50 mg/L de Na, Ca, K; 12,5 mg/L de Mg; 5 mg/L de Fe; 2,5 mg/L de Cu; 0,5 mg/L de Cr e Zn; 0,25 mg/L de Mn. A amostra branco fortificada foi utilizada como amostra controle, para avaliar a reprodutibilidade do método.

As amostras foram avaliadas utilizando-se espectrômetro de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP-OES) (Perkin Elmer, mod Optima 2000DV Sampler, mod As90plus). Sob as seguintes condições experimentais: potência

de rádio frequência de 1.330 watts; taxa de fluxo de argônio de plasma de 15 L/min; caudal de argônio auxiliar de 0,20 L/min; taxa de fluxo de gás de nebulização de 0,60 L/min para os minerais Na, K, Ca, Fe, Cr, Mg, Mn e Zn, e 0,80 L/min para Cu; orientação do plasma em relação ao caminho óptico axial para os minerais Cu, Cr, Fe, Zn e Mn e radial para Na, Mg, K e Ca; taxa de fluxo da amostra de 1,50 mL/min; réplica 1 e linhas espectrais monitoradas a 589,592 nm (Na), 766,490 nm (K), 422,673 nm (Ca), 259,939 nm (Fe), 327,393 nm (Cu), 267,716 nm (Cr), 280,271 nm (Mg), 257,610 nm (Mn) e 213,857 nm (Zn).

A determinação do teor de minerais por ICP-OES foi realizada usando uma curva de calibração preparada nas seguintes concentrações: Na, K, Ca e Mg (1 a 100 mg/L); Fe (0,1 a 10 mg/L); Cu e Zn (0,05 a 5 mg/L) e Cr e Mn (0,005 a 0,5 mg/L). Todo o experimento foi realizado em triplicata e os resultados expressos em mg/100 g de matéria seca.

2.4 Análise estatística

Todos os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão, sendo esses submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey a 5% de significância através do programa estatístico Minitab Statistical Software 21.

3. Resultados e Discussão

3.1 Composição Centesimal

A composição centesimal das amostras está apresentada na Tabela 2. Com exceção da umidade, todos os resultados foram expressos em g/100 g de matéria seca.

Os teores de umidade variaram na faixa de 70,22 g/100 g (vinagreira-roxa) a 95,22 g/100 g (fruto do chuchu-de-vento). Observou-se que a parte do vegetal analisada impactou diretamente no teor de umidade, sendo que as amostras de folhas apresentaram em geral, menor teor de umidade comparando-se com amostras de fruto de chuchu-de-vento teor 95,22 g/100 g, talo de taioba 93,72 g/100 g e flor de capuchinha 86,26 g/100 g.

Tabela 2 – Composição centesimal das Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC)

| Amostra | Teor (g/100 g) | | | | | | | |
|--------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | Umidade | Cinzas | Lipídios | Proteína | Fibra Total | Fibra Insolúvel | Fibra Solúvel | Carboidratos* |
| Almeirão-de-árvore | 87,10 ± 0,02 ^d | 11,53 ± 0,28 ^{fg} | 6,48 ± 0,43 ^b | 13,58 ± 0,33 ^k | 49,13 ± 1,17 ^{bc} | 43,19 ± 0,30 ^b | 5,94 ± 0,87 ^{de} | 19,28 ± 1,73 ^e |
| Azedinha | 90,53 ± 0,03 ^c | 13,72 ± 0,14 ^c | 2,07 ± 0,07 ^{gh} | 17,75 ± 0,37 ^g | 49,90 ± 1,08 ^b | 38,99 ± 0,78 ^c | 10,91 ± 0,30 ^b | 16,56 ± 1,19 ^f |
| Bertalha | 90,51 ± 0,02 ^c | 21,09 ± 0,23 ^a | 3,48 ± 0,14 ^d | 24,19 ± 0,13 ^b | 44,51 ± 1,27 ^f | 34,83 ± 0,72 ^{fg} | 9,68 ± 0,55 ^b | 6,73 ± 0,96 ^{hi} |
| Capiçoba | 84,83 ± 0,03 ^f | 13,10 ± 0,25 ^{cd} | 2,59 ± 0,08 ^{ef} | 17,96 ± 0,01 ^g | 36,69 ± 0,77 ^h | 29,81 ± 1,34 ⁱ | 6,88 ± 0,57 ^{cd} | 29,66 ± 1,08 ^b |
| Capuchinha- Flor | 86,26 ± 0,02 ^e | 10,62 ± 0,28 ^h | 2,47 ± 0,14 ^{efg} | 19,26 ± 0,01 ^f | 37,71 ± 0,14 ^{gh} | 32,49 ± 0,13 ^h | 5,22 ± 0,01 ^{efg} | 29,94 ± 0,52 ^b |
| Capuchinha- Folha | 82,14 ± 0,01 ⁱ | 12,01 ± 0,15 ^{ef} | 5,33 ± 0,09 ^c | 21,67 ± 0,20 ^d | 36,25 ± 0,36 ^h | 29,40 ± 0,41 ⁱ | 6,85 ± 0,05 ^{cd} | 24,74 ± 0,28 ^c |
| Chuchu-de-vento- Fruto | 95,22 ± 0,02 ^a | 9,75 ± 0,23 ⁱ | 1,24 ± 0,08 ^j | 11,46 ± 0,07 ^l | 45,91 ± 0,72 ^{def} | 38,25 ± 0,01 ^{cd} | 7,65 ± 0,72 ^c | 31,64 ± 0,55 ^b |
| Jambu | 83,46 ± 0,02 ^h | 13,02 ± 0,21 ^{cd} | 2,26 ± 0,10 ^{fg} | 14,17 ± 0,24 ^{ij} | 49,00 ± 0,29 ^{bc} | 43,38 ± 0,68 ^b | 5,62 ± 0,39 ^{def} | 21,55 ± 0,49 ^{de} |
| Ora-pro-nóbis c/espinhos | 84,20 ± 0,02 ^g | 13,75 ± 0,16 ^c | 2,72 ± 0,09 ^e | 28,36 ± 0,08 ^a | 50,70 ± 0,07 ^b | 43,96 ± 0,12 ^b | 6,74 ± 0,19 ^{cd} | 4,45 ± 0,16 ⁱ |
| Ora-pro-nóbis s/espinhos | 83,78 ± 0,03 ^h | 16,41 ± 0,44 ^b | 1,57 ± 0,08 ^{ij} | 20,65 ± 0,20 ^e | 54,19 ± 0,59 ^a | 49,25 ± 0,69 ^a | 4,94 ± 0,10 ^{efg} | 7,18 ± 0,62 ^h |
| Peixinho | 72,93 ± 0,03 ^k | 8,88 ± 0,31 ^j | 1,75 ± 0,05 ^{hi} | 14,56 ± 0,42 ^{hi} | 52,77 ± 0,24 ^a | 48,21 ± 0,22 ^a | 4,56 ± 0,25 ^{fgh} | 22,04 ± 0,31 ^d |
| Taioba- Folha | 85,99 ± 0,02 ^e | 12,19 ± 0,26 ^{ef} | 6,49 ± 0,17 ^b | 22,84 ± 0,17 ^c | 47,27 ± 0,04 ^{cd} | 43,10 ± 0,34 ^b | 4,17 ± 0,29 ^{gh} | 11,21 ± 0,28 ^g |
| Taioba- Talo | 93,72 ± 0,02 ^b | 12,68 ± 0,16 ^{de} | 2,16 ± 0,08 ^{fgh} | 5,91 ± 0,06 ^m | 39,34 ± 0,22 ^g | 35,83 ± 0,17 ^{ef} | 3,51 ± 0,05 ^h | 39,91 ± 0,09 ^a |
| Vinagreira - Sépala | 81,74 ± 0,02 ^j | 6,45 ± 0,25 ^k | 0,64 ± 0,03 ^k | 5,54 ± 0,01 ^m | 46,54 ± 1,04 ^{de} | 33,31 ± 0,74 ^{gh} | 13,23 ± 0,31 ^a | 40,83 ± 0,88 ^a |
| Vinagreira-roxa | 70,22 ± 0,02 ^l | 10,97 ± 0,08 ^{gh} | 8,24 ± 0,10 ^a | 14,90 ± 0,20 ^h | 44,63 ± 0,29 ^{ef} | 36,80 ± 0,21 ^{de} | 7,83 ± 0,08 ^c | 21,26 ± 0,32 ^{de} |

Resultados expressos em base seca, exceto o teor de umidade.

Valores expressos na mesma coluna seguidos por letras diferentes indicam diferença estatística ($p \leq 5\%$).

Valores médios ± desvio padrão (n=3). * Por diferença.

Resultado semelhante ao do presente estudo foi observado por Viana *et al.* (2015), que encontraram teores de umidade de 83,19% para beralha e 70,72% para o peixinho. Apesar destas variações, os resultados confirmaram que a água constitui o maior componente dos vegetais (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

O teor de cinzas que se refere ao resíduo mineral fixo variou de 6,45 g/100 g para a súpala da vinagreira a 21,09 g/100 g para a beralha. Comparando os teores de cinzas presentes nas amostras de PANC, com os de alguns vegetais convencionais como couve 14,62 g/100 g (MACHADO; CANNIATTI-BRAZACA; PIEDADE, 2006), alface 10,88 g/100 g (SANTOS *et al.*, 2020), beterraba 6,43 g/100 g e chuchu 5,77 g/100 g (STORCK *et al.*, 2013) pode-se dizer que as PANC apresentaram teores de cinzas relevante frente a esses vegetais. O resíduo mineral fixo é um indicativo da composição mineral total do alimento e, quando altos valores desses resíduos são quantificados, sugere-se que a planta seja uma fonte suplementar de minerais (MOURA *et al.*, 2021).

Em todas as plantas estudadas o teor de lipídios totais foi determinado abaixo de 10 g/100 g. Resultado esse esperado, já que, geralmente, os lipídeos aparecem em quantidades baixas em vegetais. Teores de lipídios superiores ao do presente estudo podem ser observados por Botrel *et al.* (2020), que ao avaliarem amostras de azedinha, capuchinha, peixinho e ora-pro-nóbis obtiveram respectivamente 3,43; 6,35; 3,77; 4,62 g/100 g. Essa diferença pode ser atribuída a fatores edafoclimáticos como solo, clima, temperatura e chuva, mas também a fatores metodológicos, uma vez que, o presente estudo usou como solvente o éter etílico e Botrel *et al.* (2020) utilizaram éter de petróleo.

Os teores de proteína das espécies vegetais variaram de 5,54 a 28,36 g/100 g para súpala da vinagreira e ora-pro-nóbis com espinhos respectivamente. O talo da taioba apresentou teor inferior de proteína, quando comparado aos talos de outros vegetais convencionais como o dos brócolis (22,42 g/100 g), couve-flor (21,65 g/100 g), espinafre (21,59 g/100 g) e beterraba (20,55 g/100 g) (STORCK *et al.*, 2013). Podendo constatar o mesmo ao comparar, os teores de proteína das folhas da taioba (22,84 g/100 g) com as folhas desses mesmos vegetais (brócolis – 36,17 g/100 g, couve-flor – 31,74 g/100 g, espinafre – 33,33 g/100 g e beterraba – 27,65 g/100 g) (STORCK *et al.*, 2013). O que torna esse vegetal, uma opção a ser considerada na inclusão de dietas com restrição de proteínas, como a dos fenilcetonúricos.

Em relação ao teor de fibra as amostras de ora-pro-nóbis sem espinho (54,19

g/100 g) e peixinho (52,77 g/100 g) se destacam quanto ao teor de fibras total e fibra insolúvel (49,25 e 48,21 g/100 g respectivamente). Enquanto que a amostra sépala da vinagreira se destaca em relação ao teor de fibra solúvel com 13,23 g/100 g. Esses dados apontam que as PANC podem ser uma boa alternativa no fornecimento de fibras alimentares, principalmente se comparar com o teor de fibra total de alguns vegetais convencionais como agrião (10,93 g/100 g) e couve-flor (19,92 g/100 g) (ARAUJO; MENEZES; TOMAZINI, 2009), alface (23,14 g/100 g), chicória (25,35 g/100 g) (ARAUJO; MENEZES, 2010).

Uma alta ingestão de fibras tem sido associada a um risco reduzido de várias condições de saúde, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes, hipertensão, obesidade, distúrbios gastrointestinais e melhoria na função imunológica (ANDERSON *et al.*, 2009; JAKUBCZYK *et al.*, 2022; TSITSOU *et al.*, 2023). Além disso, as fibras insolúveis reduzem o tempo de trânsito no intestino e aumentam o volume fecal, aliviando os sintomas de constipação. Enquanto que as fibras solúveis podem sofrer fermentação parcial ou total, principalmente no intestino grosso pela microbiota intestinal, produzindo subprodutos geralmente benéficos, como ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato), gases (CO₂, CH₄, e H₂) e ácido láctico (KHORASANIHA *et al.*, 2023).

Neste estudo, os teores de carboidratos foram calculados pela diferença de cem menos os teores de cinzas, proteínas, lipídios e fibra total, o que justifica as diferenças encontradas. Observa-se na Tabela 2 que as folhosas apresentaram menores teores, variando de 4,45 (ora-pro-nóbis com espinhos) a 29,66 g/100 g (capiçoba), que as demais partes avaliadas na presente pesquisa que variaram de 29,94 a 40,83 g/100 g para flor da capuchinha e sépala da vinagreira respectivamente. Resultado já esperado, uma vez, que vegetais folhosos normalmente não são fontes desse constituinte.

3.2 Minerais

O teor de minerais, em base seca, das 15 amostras de PANC está apresentado na Tabela 3. Dentre os macrominerais avaliados (Na, K, Ca e Mg), o K é o mineral que mais se destacou, juntamente com o Ca em todas as amostras.

Tabela 3 – Teor de minerais das Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC)

| Amostra | Minerais (mg/100 g) | | | | | | | | |
|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | Na | K | Ca | Fe | Cu | Cr | Mg | Mn | Zn |
| Almeirão-de-árvore | 33,89±1,11 ^e | 4812,45±339,69 ^c | 2777,48±193,84 ^d | 26,25±1,13 ^{ef} | 0,13±0,01 ^h | 0,21 ± 0,01 ^b | 196,70±6,50 ^h | 2,30±0,15 ^{ef} | 4,21±0,31 ^b |
| Azedinha | 46,82±0,18 ^c | 4328,08±205,17 ^c | 629,04±55,69 ^{ij} | 25,19±2,17 ^{ef} | 0,48±0,03 ^{de} | 0,17±0,001 ^c | 515,76±39,39 ^c | 4,84±0,37 ^c | 2,96±0,09 ^{cd} |
| Bertalha | 63,49±2,43 ^a | 7031,96±424,69 ^a | 911,85±34,72 ^{hi} | 31,17±1,91 ^{de} | 0,45±0,02 ^{def} | 0,08±0,004 ^e | 486,30±14,50 ^c | 2,55±0,08 ^e | 4,57±0,16 ^b |
| Capiçoba | 51,78±2,59 ^{bc} | 3651,4 ±215,15 ^d | 1423,87±80,58 ^{fg} | 46,65±2,67 ^{cd} | 0,64±0,05 ^c | 0,18±0,001 ^c | 117,35±1,11 ⁱ | 4,83±0,09 ^c | 1,81±0,10 ^e |
| Capuchinha- Flor | 48,99±1,26 ^{bc} | 3392,99±201,54 ^d | 787,20±35,41 ⁱ | 58,94±1,75 ^c | 0,86±0,03 ^b | nd | 326,82±6,14 ^{de} | 2,40±0,08 ^{ef} | 7,59±0,23 ^a |
| Capuchinha- Folha | 41,52±2,50 ^d | 2608,89±36,33 ^e | 3093,33±203,59 ^d | 20,19±0,55 ^{efg} | 0,37± 0,01 ^{efg} | nd | 259,38±1,56 ^{fg} | 1,92±0,06 ^{fg} | 7,88±0,21 ^a |
| Chuchu-de-vento | 53,46±0,03 ^b | 5856,19±55,53 ^b | 452,91±25,91 ^j | 7,75±0,16 ^{gh} | 0,38±0,02 ^{def} | 0,03±0,003 ^f | 222,03±4,46 ^{gh} | 0,86±0,05 ^h | 2,64±0,06 ^{cde} |
| Jambu | 29,12±3,05 ^{efg} | 3472,92±53,58 ^d | 1362,86±13,83 ^{fg} | 46,40±0,37 ^{cd} | 1,01±0,05 ^a | 0,41±0,01 ^a | 319,02±2,17 ^{de} | 4,32± 0,002 ^{cd} | 3,00±0,10 ^c |
| Ora-pro-nóbis c/espinhos | 41,37±0,61 ^d | 3271,49±131,86 ^d | 4862,94±213,44 ^a | 21,77±0,46 ^{efg} | 0,67±0,05 ^c | nd | 785,21±29,43 ^a | 5,58± 0,29 ^b | 4,29±0,86 ^b |
| Ora-pro-nóbis s/espinhos | 26,49±2,01 ^{gh} | 3508,82±114,58 ^d | 4404,88±122,44 ^b | 24,75±1,28 ^{ef} | 0,49±0,01 ^d | nd | 573,92±33,61 ^b | 4,17±0,36 ^d | 2,67±0,04 ^{cde} |
| Peixinho | 28,02± 2,77 ^{fg} | 1471,16±29,04 ^f | 1471,80± 62,62 ^{fg} | 141,37±19,68 ^a | 0,25±0,03 ^g | nd | 291,23± 2,48 ^{ef} | 1,61±0,12 ^g | 1,99±0,14 ^{de} |
| Taioba- Folha | 26,33±0,51 ^{gh} | 3549,09±266,76 ^d | 1868,95±113,44 ^e | 13,33±1,26 ^{fgh} | 0,63± 0,01 ^c | nd | 351,11±14,68 ^d | 4,33±0,23 ^{cd} | 4,68±0,13 ^b |
| Taioba- Talo | 32,96±1,16 ^{ef} | 4492,89±326,41 ^c | 1150,34±42,09 ^{gh} | 2,54±0,11 ^h | 0,36±0,02 ^{efg} | nd | 250,01±7,32 ^{fg} | 1,83±0,06 ^{fg} | 4,22±0,14 ^b |
| Vinagreira- Sépala | 32,29±2,03 ^{ef} | 1174,23±48,22 ^{fg} | 1544,76±50,17 ^{ef} | 13,58±0,40 ^{fgh} | 0,12±0,01 ^h | nd | 119,29±6,12 ⁱ | 1,00±0,05 ^h | 4,52±0,72 ^b |
| Vinagreira-roxa | 21,58±0,98 ^h | 719,36±51,33 ^g | 3816,03±36,12 ^c | 106,26±3,13 ^b | 0,35±0,10 ^{fg} | 0,15±0,01 ^d | 289,87±4,78 ^{ef} | 8,84±0,42 ^a | 2,18±0,03 ^{cde} |

Valores expressos na mesma coluna seguidos por letras diferentes indicam diferença estatística ($p \leq 5\%$).

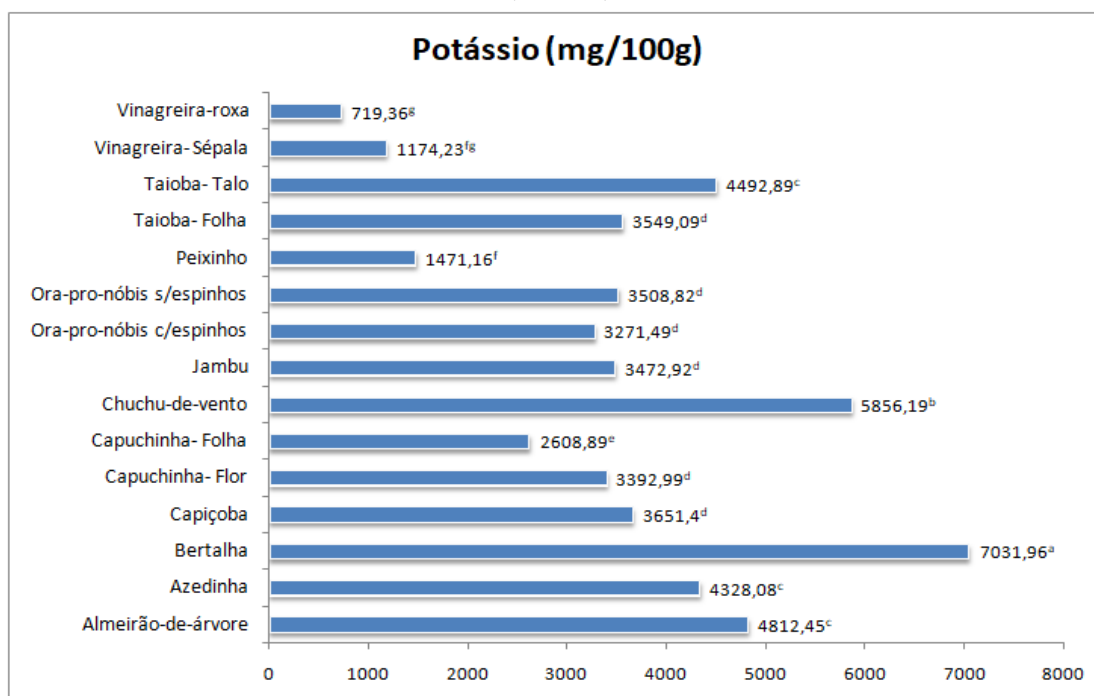
Valores médios ± desvio padrão (n=3).

Resultados expressos em base seca.

nd= não detectado.

O teor de K das amostras variou de 719,36 (vinagreira-roxa) a 7.031,96 mg/100 g (bertalha) (Figura 1). Ao comparar os teores desses minerais com o de algumas espécies convencionais consideradas boas fontes desse elemento como couve (4.428,57 mg/100 g) e espinafre (4.666,67 mg/100 g) (TACO, 2011) verifica-se que 33,33% das PANC aqui estudadas, bertalha, chuchu-de-vento, almeirão-de-árvore, talo de taioba, azedinha (Tabela 3) também podem ser consideradas excelentes fontes desse micronutriente. Assim como para o K, a amostra de bertalha foi a que apresentou maior teor de Na (63,49 mg/100 g), resultado esse inferior ao apresentado por Botrel *et al.* (2020).

Figura 1 – Teor de potássio (K) em amostras de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC)



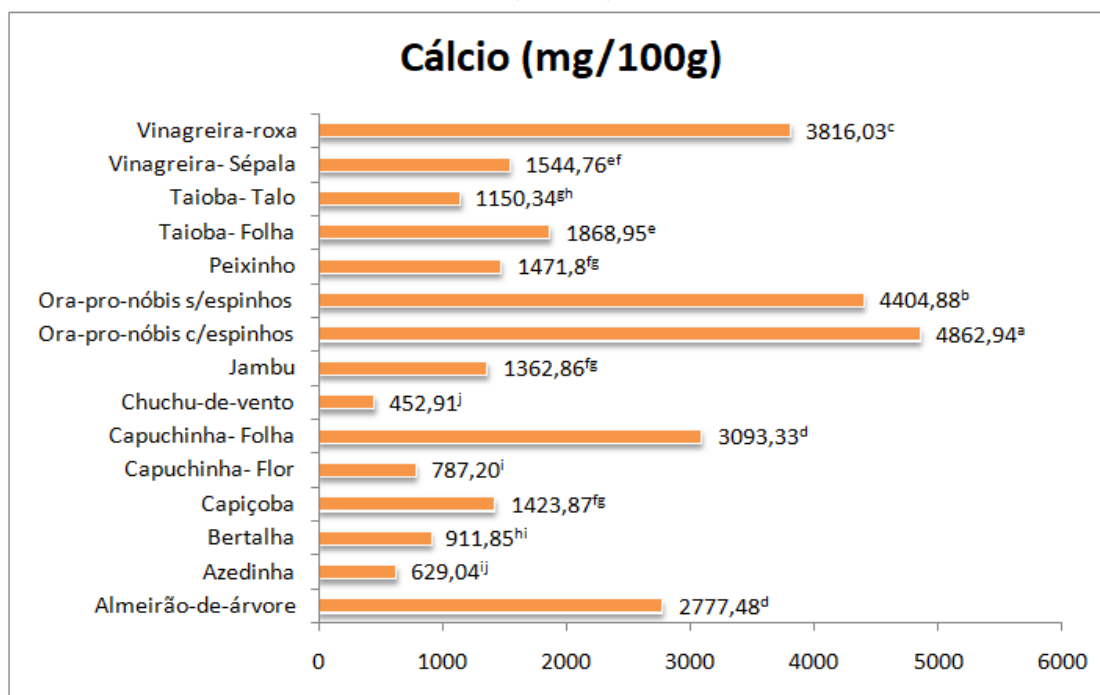
Fonte: Dados da pesquisa

Quanto ao teor de Ca, 73,33% das amostras apresentaram mais de 1.000,00 mg/100 g, variando de 1.150,34 (talo da taioba) a 4.862 mg/100 g (ora-pro-nóbis com espinho) (Figura 2), teores esses superiores ao dos brócolis (977,27 mg/100 g) (TACO, 2011), vegetal convencional considerado boa fonte desse mineral.

O Mg foi o terceiro mineral presente em maior proporção em todas as amostras, sendo que seus teores variam de 117,35 mg/100 g para a capiçoba a 785,21 mg/100 g para o ora-pro-nóbis com espinho. As amostras de PANC apresentaram teores inferiores desse micronutriente ao compará-las com o espinafre (1.138,89 mg/100 g), no entanto, são equivalentes quando comparadas à couve (384,62 mg/100 g), brócolis (340,91 mg/100 g) e

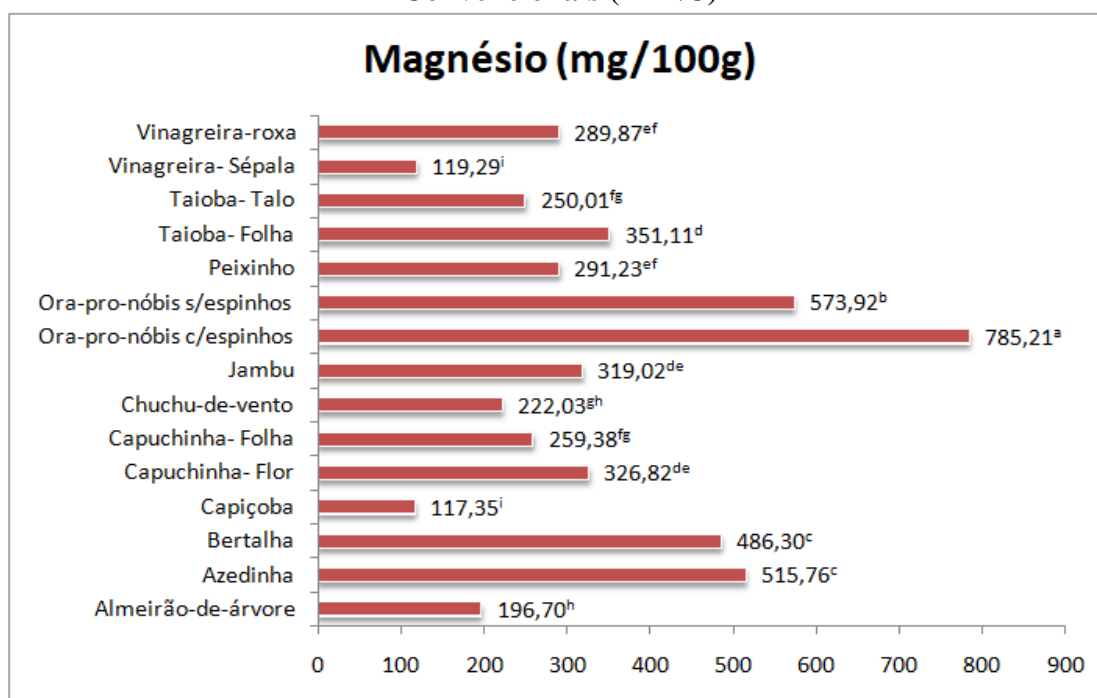
acelga (147,06 mg/100 g) (TACO, 2011). O que reforça a importância de uma alimentação diversificada e balanceada.

Figura 2 - Teor de cálcio (Ca) em amostras de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC)



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 3 - Teor de Magnésio (Mg) em amostras de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC)

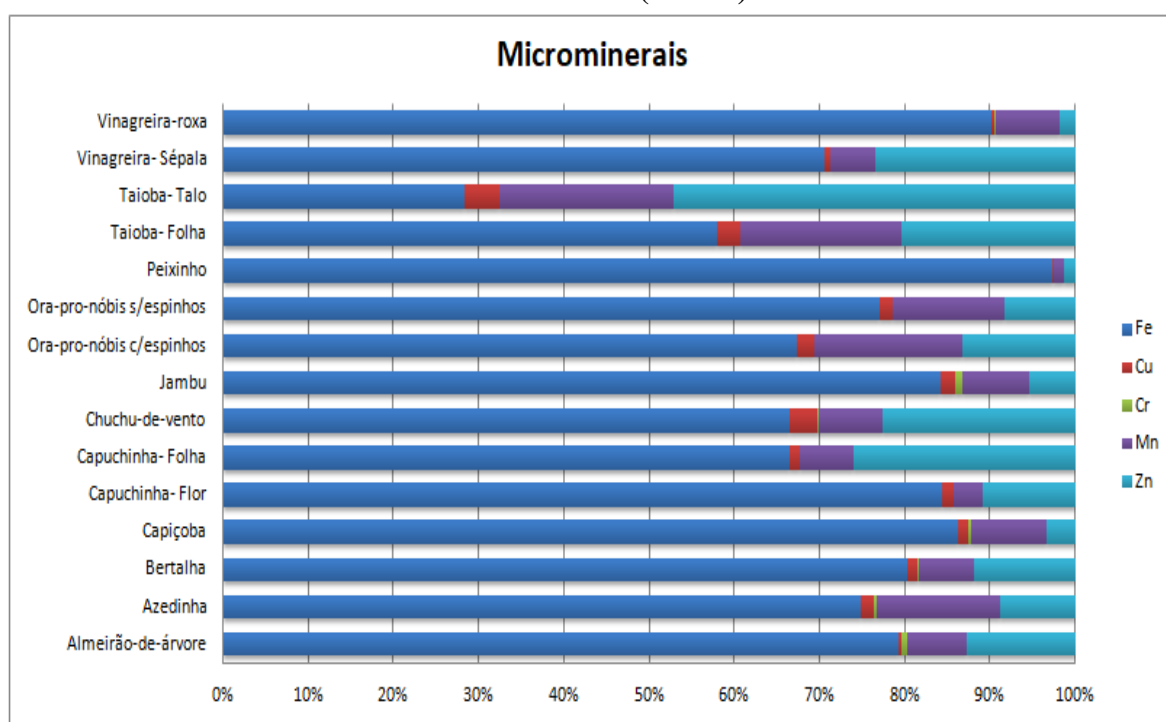


Fonte: Dados da pesquisa

Considerado um micronutriente essencial para todas as formas de vida o Mg atua como co-fator em centenas de reações metabólicas importantes para o nosso organismo (LU *et al.*, 2020), como regular a proliferação celular, o metabolismo ósseo e o funcionamento neuromuscular, regular a inflamação e manter a hemostasia (FRITZEN *et al.*, 2023). Assim baixos níveis de Mg no organismo vêm sendo associado com várias doenças crônicas e inflamatórias, como doença de Alzheimer, asma, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, resistência à insulina, diabetes tipo 2, hipertensão, doenças cardiovasculares, enxaquecas e osteoporose (RAZIEH; AFROOZ; HAMID, 2022).

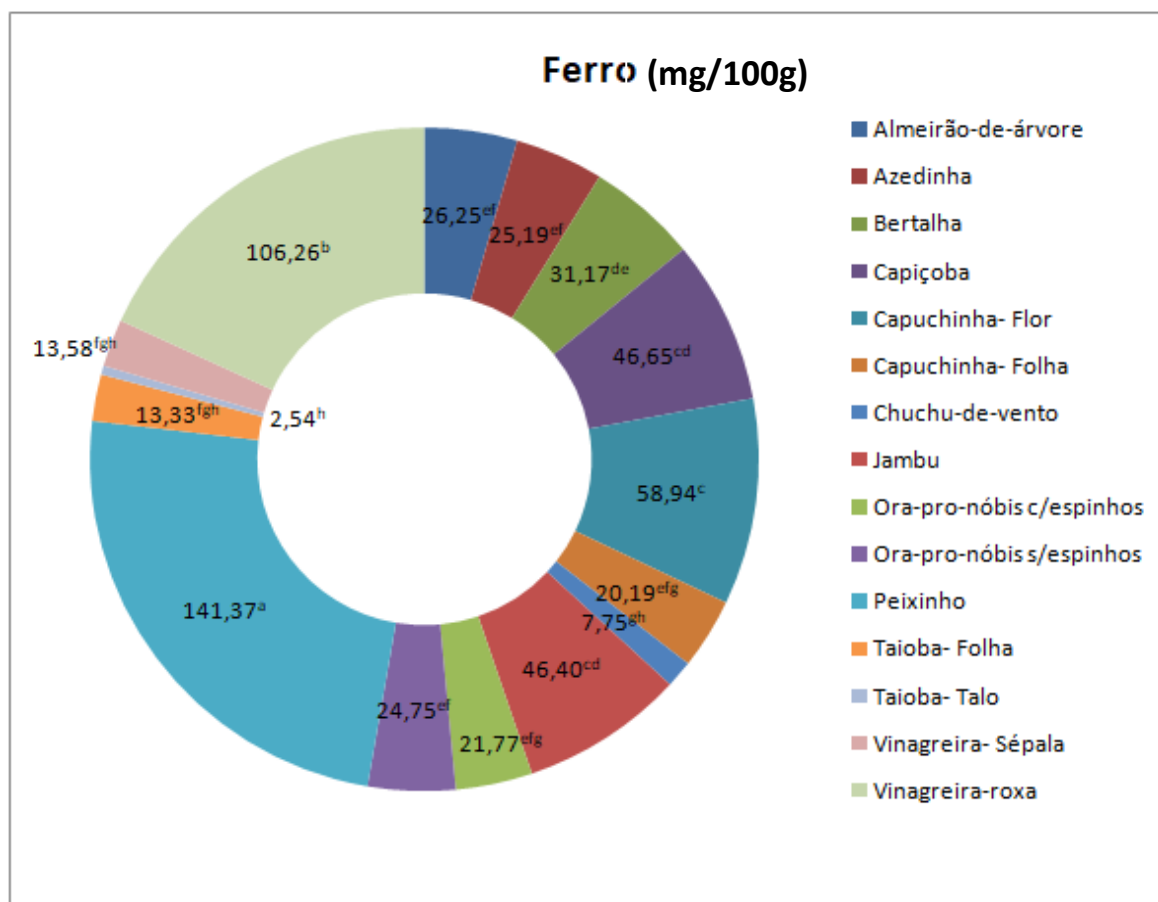
Entre os microminerais analisados (Fe, Cu, Cr, Mn e Zn), o Fe se destacou em todas as amostras (Figura 4). Destaca-se as PANC peixinho e vinagreira-roxa com 141,37 e 106,16 mg/100 g respectivamente (Figura 5), cujos teores ultrapassam os de fontes popularmente conhecidas, como o agrião (50,82 mg/100 g) e a alface-roxa (58,14 mg/100 g) (TACO, 2011). Resultados semelhante (135,00 mg/100 g) ao encontrado no presente estudo para o peixinho foi observado por Viana *et al.* (2015), enquanto Botrel *et al.* (2015), obtiveram resultado inferior (27,69 mg/100 g). Diferenças observadas nos valores obtidos neste trabalho, quando comparado com outros autores, pode ser influência de fatores climáticos, sistema de cultivo época de colheita.

Figura 4 – Proporção (%) de microminerais presente em Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC)



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5 - Teor de Ferro (Fe) em amostras de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC)



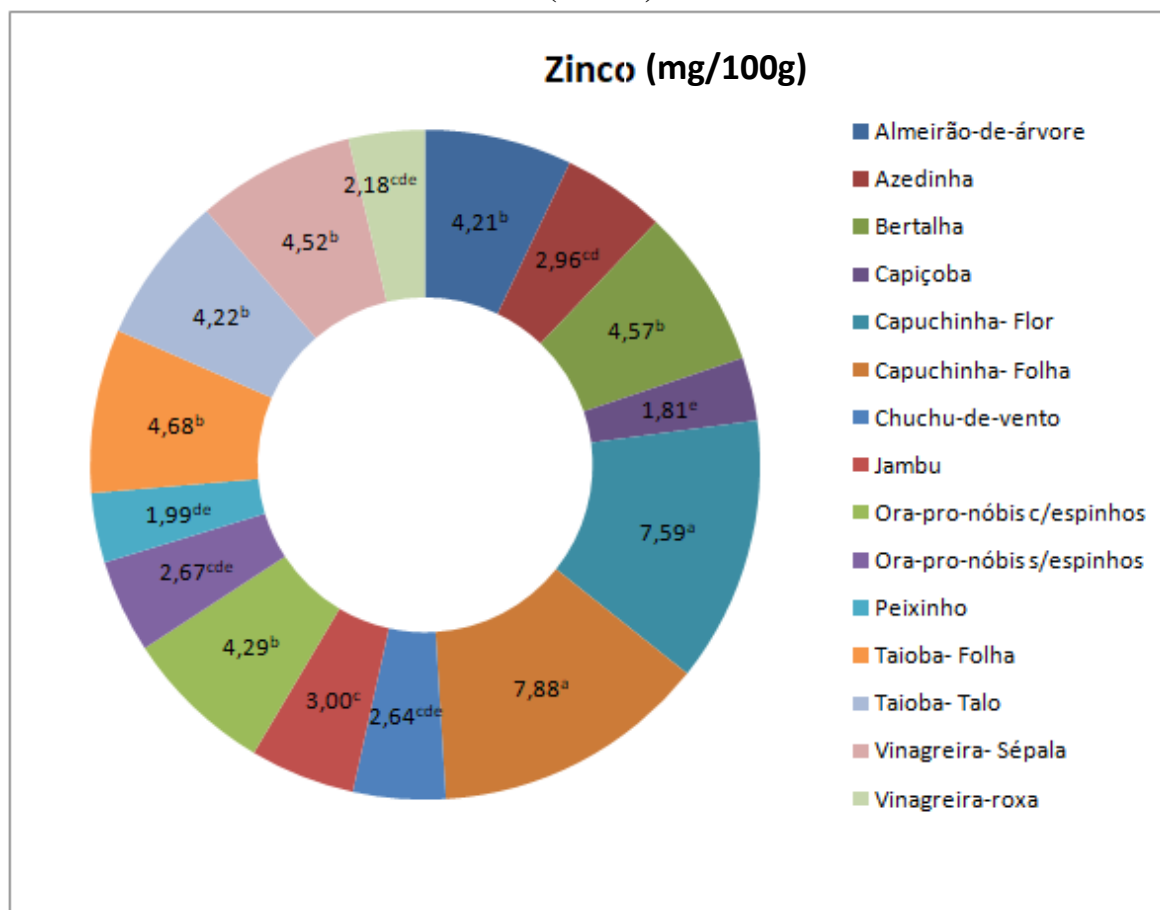
Fonte: Dados da pesquisa

O Zn é um micronutriente essencial e normalmente está presente em baixa quantidade em vegetais. No entanto, neste estudo algumas espécies se destacaram em relação a esse mineral, como é o caso da capuchinha que apresentou um teor de 7,88 e 7,59 mg/100 g para suas folhas e flores respectivamente, taioba (talo e folha), sépala da vinagreira, ora-pro-nóbis com espinho, almeirão-de-árvore e bertalha que apresentam teores acima de 4 mg/100 g, similar ao apresentado pelas espécies convencionais como espinafre (4,17 mg/100 g), couve (4,40 mg/100 g) e mostarda (4,55 mg/100 g) (Figura 6). Desta forma estas espécies de PANC ao serem introduzidas na alimentação podem contribuir no fornecimento deste micromineral.

Em relação ao teor de Cr as amostras variaram de 0,03 (chuchu-de-vento) a 0,41 mg/100 g (jambu), enquanto para o Mn foi de 0,86 a 8,84 mg/100 g para chuchu-de-vento e vinagreira-roxa respectivamente; e para o Cu de 0,12 mg/100 g para a sépala da vinagreira a 1,01 mg/100 g para o jambu. Resultado semelhante ao do presente estudo pode ser notado ao comparar o teor de Mn apresentado pela vinagreira-roxa e o de Cu apresentado pelo jambu,

com o espinafre (Mn – 9,86 mg/100 g e Cu – 0,83 mg/100 g), uma folhosa convencional, popularmente conhecida pelo fornecimento destes minerais (TACO, 2011).

Figura 6 - Teor de Zinco (Zn) em amostras de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC)



Fonte: Dados da pesquisa

A ingestão desses micronutrientes está associada a diversas funções no organismo, o Cr é importante no metabolismo de gorduras e carboidratos, assim como para a função cerebral e outros processos corporais; o Mn é importante para o funcionamento normal do cérebro e atividade adequada do sistema nervoso, além de fazer parte de muitas enzimas assim como o Cu, que também é essencial para o bom funcionamento dos órgãos e processos metabólicos (GHARIBZAHEDI; JAFARI, 2017).

Nota-se que as PANC avaliadas apresentam teores significativos de macro e microminerais corroborando com os resultados obtidos na análise de composição centesimal, mais especificamente, análise do resíduo mineral fixo apresentada na seção anterior. Assim, sugere-se que essas espécies de PANC aqui estudadas podem ser consideradas uma boa alternativa para a suplementação de minerais na dieta.

4. Conclusão

As PANC aqui estudadas apresentam-se como uma boa alternativa para diversificar a alimentação diária da população em geral e de indivíduos que apresentam alguma restrição alimentar quanto à proteína. Em relação à composição de macro e micronutrientes, verificou-se que muitos minerais apresentaram teores comparáveis ou superiores a outros vegetais convencionais. Estes achados reforçam a vantagem em ampliar o consumo e a comercialização das PANC. Para tal, ampla divulgação do valor nutricional dessas espécies vegetais e incentivo ao consumo consciente são necessários. Estudos complementares seriam necessários para avaliar a bioacessibilidade dos minerais, assim como analisar fatores antinutricionais desses vegetais.

5. Referência bibliográfica

ANDERSON, J. W. *et al.* Health benefits of dietary fiber. **Nutrition Reviews**, v. 67, n. 4, p. 188-2005, 2009.

ANVISA, A. N. de V. S. **Conteúdo de Fenilalanina em Alimentos**. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/en_US/fenilalanina-em-alimentos>. Acesso em: 16 maio. 2022.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 20th ed. LATIMER JR, George W. (ed). Gaithersburg, Maryland, EUA: AOAC, 2016.

ARAÚJO, E. M.; MENEZES, H. C. Estudo de fibras alimentares em frutas e hortaliças para uso em nutrição enteral ou oral. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 1-6, 2010.

ARAÚJO, E. M.; MENEZES, H. C.; TOMAZI, J. M. Fibras solúveis e insolúveis de verduras, tubérculos e canela para uso em nutrição clínica. **Food Science and Technology**, v. 29, n. 2, p. 1-6, 2009.

BOTREL, N. *et al.* Nutritional value of unconventional leafy vegetables grown in the Cerrado Biome/Brazil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 23, p. 1-8, 2020.

BRASIL, **Instrução Normativa Nº 75, de 8 de outubro de 2020**. Estabelece os requisitos técnicos para declaração da rotulagem nutricional nos alimentos embalados. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Brasília, 2020.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: Fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005.

- COBUS, D. *et al.* Unconventional Food Plants (UFPs): an approach to the nutritional and functional properties of nasturtium (*Tropaeolum majus* L.). **Food Science Today**, v.1, n. 1. p. 1-6, 2023.
- DA CUNHA, M. A. *et al.* Urban gardening and neglected and underutilized species in Salvador, Bahia, Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 16, n. 1, p. 67, 2020.
- FASOLIN, L. H. *et al.*, Emergent food proteins – Towards sustainability, health and innovation. **Food Research International**, v. 125, n.6, p. 108586, 2019.
- FRITZEN, R. *et al.* Magnesium Deficiency and Cardiometabolic Disease. **Nutrients**, v.15, p. 2355, 2023.
- GHARIBZAHEDI, S. M. T.; JAFARI, S. M. The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 119-131, 2017.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.
- JAKUBEZYK, K. *et al.* Edible Flowers as a Source of Dietary Fibre (Total, Insoluble and Soluble) as a Potential Athlete’s Dietary Supplement. **Nutrients**, v.14, p. 1-10, 2022.
- KHORASANIHA *et al.* Diversity of fibers in common foods: Key to advancing dietary research. **Food Hydrocolloids**, n. 130, p. 108495, 2023.
- KINUPP, V. F.; DE BARROS, I. B. I. Riqueza de Plantas Alimentícias Não-Convencionais na Região Metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 1, p. 63–65, 2007.
- KINUPP, V. F.; LORENZI, H. **Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**. 1. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2014.
- LU, L. *et al.* Magnesium intake is inversely associated with risk of obesity in a 30-year prospective follow-up study among American young adults. **European Journal of Nutrition**, v, 59, p. 3745–3753, 2020.
- MACHADO, F. M. V. F.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; PIEDADE, S. M. de S. Avaliação da Disponibilidade de Ferro em Ovo, Cenoura e Couve e em suas Misturas. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 3, p. 610-618, 2006.
- MILIÃO, G. L. *et al.* Unconventional food plants: Nutritional aspects and perspectives for industrial applications. **Future Foods**, v. 5, 2022.
- MOURA, I. O. *et al.* Chemical Characterization, Antioxidant Activity and Cytotoxicity of the Unconventional Food Plants: Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) Leaf, Major Gomes (*Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.) and Caruru (*Amaranthus deflexus* L.). **Waste Biomass Valorization**, v. 12, n.5, p. 2407-2431, 2021.

OTERRO, D. M.; FERREIRA-RIBEIRO, C. D. Potential Bioactive Compounds of Unconventional Food Plants. **Agricultura Research & Technology**, v. 23, n. 2, p. 257-259, 2019.

PAULA FILHO, G. X.; BARREIRA, T. F.; PINHIERO-SANT'ANA, H. M. Chemical Composition and Nutritional Value of Three *Sonchus* Species. **International Journal of Food Science**, v. 2022, p. 1-9, 2022.

PEISINO, M. C. O. *et al.* Health-Promoting Properties of Brazilian Unconventional Food Plants. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 9, p. 4691–4700, 2019.

PEREIRA, F. de O.; de MEDEIROS, F. D.; ARAÚJO, P. L. Natural Toxins in Brazilian Unconventional Food Plants: Uses and Safety. In: JACOB, M.C.M.; ALBUQUERQUE, U.P. (org) **Local Food Plants of Brazil**. Ethnobiology. Springer. 2021, p. 89-114.

RAZIEH, A.; AFROOZ, M.; HAMID, S. Effect of magnesium on severity and mortality of COVID-19 patients: A systematic review. **Journal of Acute Disease**, v. 11, n. 4, p. 120-126, 2022.

ROLNIK, A.; OLAS, B. The Plants of the Asteraceae Family as Agents in the Protection of Human Health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 3009- 3016 . 2021.

SERRA MOURA, H. F. *et al.* Evaluation of multielement/proximate composition and bioactive phenolics contents of unconventional edible plants from Brazil using multivariate analysis techniques. **Food Chemistry**, v. 363, p. 129995, 2021.

SILVA, L. F. L. E. *et al.* Nutritional evaluation of non-conventional vegetables in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p. 1775–1787, 2018.

SILVA, L. F. L. *et al.* Nutritional characterisation and grouping of unconventional vegetables in Brazil. **The Journal of Horticultural Science And Biotechnology**, p. 1-7, 2021.

STORCK, C. R. *et al.* Folhas, talos, cascas e sementes de vegetais: composição nutricional, aproveitamento na alimentação e análise sensorial de preparações. **Ciência Rural**, v. 43, n. 3, p. 537–543, 2013.

TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4 revisada ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011.

TSITSOU, S. *et al.* Acute Effects of Dietary Fiber in Starchy Foods on Glycemic and Insulinemic Responses: A Systematic Review of Randomized Controlled Crossover Trials. **Nutrients**, v.15, p. 2383, 2023.

VIANA, M. M. S. *et al.* Composição fitoquímica e potencial antioxidante de hortaliças não convencionais. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 504–509, 2015.

ZIMMER, T. B. R.; OTERO, D. M.; ZAMBIAZI, R. C.; Physicochemical and bioactive compounds evaluation of *Physalis pubescens* Linnaeus. **Revista Ceres**, v. 67, n. 6, p. 432-438, 2020.

CAPÍTULO III – TRABALHO EXPERIMENTAL

Perfil químico de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) do Brasil antes e após processo de digestão gastrointestinal *in vitro* e capacidade antioxidante

Este capítulo gerou quatro trabalhos publicados em congressos internacionais.

MINIGHIN, E. C. et al. Chemical profile of Unconventional Food Plants (UFP), almeirão-de-árvore (*Lactuca canadensis*), capiçoba (*Erechtites valerianifolius*) and jambu (*Acmella oleracea*) before and after *in vitro* gastrointestinal digestion process. In: PROCEEDINGS OF 2ND INTERNATIONAL CONGRESS ON BIOACTIVE COMPOUNDS, 2022, Campinas. **Anais eletrônicos...** Campinas, Galoá, 2022. Disponível em: <<https://proceedings.science/icbc/icbc-2022/trabalhos/chemical-profile-of-unconventional-food-plants-ufp-almeirao-de-arvore-lactuca-ca?lang=pt-br>>.

SOARES, I. I. C.; MINIGHIN, E. C. et al. Chemical profile evaluation of *Tropaeolum majus* L. by paper spray ionization mass spectrometry. In: PROCEEDINGS OF 2ND INTERNATIONAL CONGRESS ON BIOACTIVE COMPOUNDS, 2022, Campinas. **Anais eletrônicos...** Campinas, Galoá, 2022. Disponível em: <<https://proceedings.science/icbc/icbc-2022/trabalhos/chemical-profile-evaluation-of-tropaeolum-majus-l-by-paper-spray-ionization-mass?lang=pt-br>>.

MINIGHIN, E. C. Atividade antioxidante da ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) e da vinagreira-roxa (*Hibiscus acetosella*) In: II INTERNATIONAL CONGRESS ON SCIENCE, BIODIVERSITY AND SUSTAINABILITY, 2023, Belo Horizonte. **Anais... II International Congress on Science, Biodiversity and Sustainability.** p.225, 2023.

MINIGHIN, E. C. Atividade antioxidante das plantas alimentícias não convencionais (PANC) *Rumex acetosa* e *Stachys byzantina* In: II INTERNATIONAL CONGRESS ON SCIENCE, BIODIVERSITY AND SUSTAINABILITY, 2023, Belo Horizonte. **Anais... II International Congress on Science, Biodiversity and Sustainability.** p. 226, 2023.

Perfil químico de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) do Brasil antes e após processo de digestão gastrointestinal *in vitro* e capacidade antioxidante

Resumo: As Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) são plantas comestíveis subutilizadas e, muitas vezes negligenciadas, pois geralmente são consumidas por pequena parcela da população ou utilizadas apenas em determinada região, mas são fontes de nutrientes e compostos bioativos, apresentando alto valor nutricional. Para que essas plantas se tornem mais conhecidas e consumidas, ressalta-se a necessidade de estudá-las. Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais das PANC do Brasil e determinar o perfil químico antes e após o processo de digestão gastrointestinal *in vitro* das mesmas. Foram avaliadas 15 amostras de PANC, entre folhas, talo, flor, fruto e sépala, distribuídas em nove famílias botânicas e 12 espécies, compreendendo *Acmella oleracea*, *Basella alba*, *Cyclanthera pedata*, *Erechtites valerianifolius*, *Hibiscus acetosella*, *Hibiscus sabdariffa*, *Lactuca canadensis*, *Pereskia aculeata*, *Rumex acetosa*, *Sthachys byzantina*, *Tropaeolum majus* e *Xanthosoma sagittifolium*. Essas amostras, após a determinação do teor de compostos fenólicos e da capacidade antioxidante, foram submetidas à digestão gastrointestinal *in vitro*, compreendida nas fases, oral, gástrica e intestinal e o perfil químico das amostras secas e das frações bioacessíveis foi determinado por espectrometria de massas (PS-MS). As PANC estudadas apresentaram teores de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante relevante comparando-se a alguns vegetais convencionais. Em relação ao perfil químico das amostras, foi possível identificar compostos de diversas classes químicas, como ácidos fenólicos, ácidos graxos, flavonóides, terpenos, ácidos orgânicos, aminoácidos, entre outros. Verificou-se que houve diferença de constituição desses compostos entre as amostras secas e bioacessíveis, tanto no modo positivo quanto no modo negativo, indicando que o processo de digestão *in vitro* interfere na bioacessibilidade dos compostos. Diante dos resultados obtidos, conclui-se que o consumo de PANC é uma alternativa viável de alimentação saudável, devido à presença de substâncias promotoras de saúde, mas a bioacessibilidade desses compostos é influenciada pela matriz alimentar. Por isso, a associação das PANC com os vegetais convencionais pode ser uma boa opção, de modo a ter um maior aproveitamento nutricional na dieta.

Palavras-chave: Alimentação alternativa. Compostos bioativos. Bioacessibilidade

1. Introdução

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do mundo, abrigando mais de 50.000 espécies nativas de plantas, fungos e algas e mais de 100.000 espécies de animais (COSTA *et al.*, 2023; GOMES *et al.*, 2023). Apesar disso, existe um grande número de espécies vegetais com distribuições restritas, regionalizadas ou cuja indicação de uso tenha sido negligenciada (LEAL; ALVES; HANAZAKI, 2018). Esses grupos de plantas têm recebido grande atenção nos últimos anos, e vem sendo conhecidos como Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) (COSTA *et al.*, 2023; SOUZA *et al.*, 2021).

As PANC são as plantas que não fazem parte do circuito global de comercialização e, apesar de possuírem uma ou mais partes comestíveis (KINUPP; DE BARROS, 2007; KINUPP; LORENZI, 2014), não fazem parte da alimentação rotineira da grande maioria da população, podendo apresentar um contexto cultural e regional (COSTA *et al.*, 2023), já que muitas vezes são consumidas e cultivadas por algumas comunidades locais, que as usam como fonte de renda e como alimento tradicional (SOUZA *et al.*, 2021).

Estimativas demonstram que existam aproximadamente três mil espécies de PANC no Brasil (KINUPP; LORENZI, 2014; CRUZ *et al.*, 2023). Essas plantas podem ser nativas, exóticas, cultivadas e espontâneas (LEAL; ALVES; HANAZAKI, 2018), além disso, podemos incluir nesse universo partes não convencionais de vegetais convencionais, como talo, cascas, flores e sépala (MOURA *et al.*, 2021). Como exemplos de PANC podemos citar, vinagreira (*Hibiscus sabdariffa* L.), jambu (*Acmella oleracea* (L.)), taioba (*Xanthosoma sagittifolium* (L.)), capiçoba (*Erechtites valerianifolius*), peixinho (*Sthachys byzantina*), ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) e bertalha (*Basella alba* L.).

O consumo das PANC contribui significativamente para a nutrição humana, pois podem servir como fonte suplementar de macro e micronutrientes, além de compostos bioativos (SERRA MOURA *et al.*, 2021, COSTA *et al.*, 2023), o que tem despertado um interesse crescente e recente da população, principalmente da comunidade científica (MILIÃO *et al.*, 2022). Alguns estudos têm relatado que a composição nutricional dessas plantas pode ser semelhante, ou até mesmo superior, a algumas espécies vegetais convencionais, amplamente consumidas, como couve, alface, espinafre e agrião (KINUPP; LORENZI, 2014; SILVA *et al.*, 2018; DA CUNHA *et al.*, 2020).

No entanto, grande parte desses estudos não consideram as mudanças físico-químicas que ocorrem com os vegetais durante o processo digestivo no organismo. Sabe-se que os vegetais são ricos em compostos bioativos, e seu potencial biológico está diretamente

associado à sua concentração e biodisponibilidade no organismo (SOUZA *et al.*, 2022; RAMOS *et al.*, 2023; DURÁN-CASTAÑEDA *et al.*, 2023). A biodisponibilidade está associada à absorção, transporte e utilização desses compostos, enquanto que a bioacessibilidade está relacionada o quanto desses compostos ficam disponíveis para absorção (WU; OLIVEIRA; LILA, 2023).

Assim sendo, salienta-se a necessidade de estudos que estimem os efeitos do processo gastrointestinal sobre a bioacessibilidade dos compostos nutricionais e não nutricionais desses vegetais, já que, durante a digestão, muitos desses metabólitos, como os compostos fenólicos, podem ficar totalmente ou parcialmente indisponíveis para absorção (CELEP *et al.*, 2017). Uma maneira para avaliar isso é determinar o perfil químico, ou seja, identificar os possíveis compostos existentes nas PANC antes e após o processo de digestão *in vitro*. Dentre as técnicas que podem ser usadas para tal finalidade, a Espectrometria de Massas com ionização por *Paper Spray* tem sido amplamente empregada para a aquisição de impressões digitais de diferentes matrizes em uma ampla faixa de massas em um tempo curto de análise e a um custo analítico consideravelmente acessível (CORREIA *et al.*, 2023; GARCÍA *et al.*, 2021; RAMOS *et al.*, 2023; SANTOS *et al.*, 2022).

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi determinar o perfil químico das PANC do Brasil antes e após processo de digestão gastrointestinal *in vitro* e avaliar a capacidade antioxidante das mesmas.

2. Material e métodos

2.1 Amostra

As PANC avaliadas neste estudo estão apresentadas na Tabela 1 e na Figura 1. Essas amostras foram adquiridas no Banco de Hortaliças Não Convencionais do Campo Experimental Santa Rita da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) (Latitude 19°27'15.80"S e Longitude 44° 9'24.37"W), em Prudente de Moraes, Minas Gerais, Brasil.

As coletas ocorreram durante os meses de dezembro de 2020 a outubro de 2021, no período da manhã e de acordo com o ciclo de produção de cada amostra (Tabela 1). Após as coletas, as amostras foram secas em estufa com circulação de ar forçada (Biopar S480AD) a 35°C por 48 horas, trituradas em liquidificador (ARNO, Modelo L.S) até a obtenção de um

pó fino e homogêneo (tamis 14 mesh) e armazenadas ao abrigo da luz em temperatura ambiente.

As exsiccatas de cada amostra foram registradas e depositadas no Herbário PAMG da EPAMIG. Além disso, também foi realizado o registro da presente pesquisa no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), com o código AC4BDD3.

Tabela 1 - Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) e partes estudadas

| Nome Científico | Nome popular | Abreviação | Parte estudada | Data de colheita |
|--|---------------------------|-----------------|----------------------|------------------|
| <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen | Jambu | Ao | Folha | Set./2021 |
| <i>Basella alba</i> L. | Bertalha | Ba | Folha | Set./2021 |
| <i>Cyclanthera pedata</i> (L.) Schrad | Chuchu-de-vento | Cp | Fruto | Set./2021 |
| <i>Erechtites valerianifolius</i> (Link ex Spreng.) DC | Capiçoba | Ev | Folha | Jul/2021 |
| <i>Hibiscus acetosella</i> Welw. ex Hiem | Vinagreira-roxa | Ha | Folha | Dez./2020 |
| <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. | Vinagreira | Hs | Sépala | Jul/2021 |
| <i>Lactuca canadensis</i> L. | Almeirão-de-árvore | Lc | Folha | Set./2021 |
| <i>Pereskia aculeata</i> Mill. | Ora-pro-nóbis sem espinho | Pa | Folha | Out./2021 |
| <i>Pereskia aculeata</i> Mill. | Ora-pronóbis com espinho | Pa _t | Folha | Out./2021 |
| <i>Rumex acetosa</i> L. | Azedinha | Ra | Folha | Jul/2021 |
| <i>Sthachys byzantina</i> K. Koch | Peixinho | Sb | Folha | Dez./2020 |
| <i>Tropaeolum majus</i> L. | Capuchinha | Tm | Folha (L) e Flor (F) | Set./2021 |
| <i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott | Taioba | Xs | Folha (L) e Talo (S) | Dez./2020 |

Figura 1 – Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC)

Acmella oleracea (L.) R.K. Jansen
(Ao)



Basella Alba L.
(Ba)



Cyclanthera pedata (L.) Schrad
(Cp)



Erechtites valerianifolius (Link
ex Spreng.) (Ev)



Hibiscus acetosella Welw. ex
Hiem (Ha)



Hibiscus sabdariffa L.
(Hs)



Lactuca canadensis L.
(Lc)



Pereskia aculeata Mill. (sem
espinhos) (Pa)



Pereskia aculeata Mill. (com
espinhos) (Pa.)



Rumex acetosa L.
(Ra)



Sthachys byzantina K. Koch
(Sb)



Tropaeolum majus L.
(Tm)



Xanthosoma sagittifolium (L.)
Schott (Xs)



Fonte: Dra. Marinalva Pedrosa (2022)

2.2 Compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante

Para determinar o teor de compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante, as amostras foram submetidas a extração de acordo com Rufino *et al.* (2010). Para a obtenção dos extratos, 0,20 g de cada amostra foi extraída duas vezes, sucessivamente, empregando-se 4 mL de solução de metanol:água (50:50 v/v) e 4 mL de solução de acetona:água (70:30 v/v), com intervalo de 1 hora de repouso em temperatura ambiente, entre os solventes. Após cada período de repouso, as amostras foram centrifugadas (Fanem Mod. 206 BL) por 15 minutos a $25.407 \times g$ e o sobrenadante recuperado em balão de 10 mL, ajustando o volume final com água destilada. O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu*, proposto por Singleton; Orthofer; Lamuela-Raventós (1999), e o resultado expresso em ácido gálico equivalente (mg GAE/100 g de amostra seca).

Para determinar a capacidade antioxidante das amostras, foram utilizados os métodos espectrofotométricos ABTS, FRAP e DPPH, descritos por Rufino *et al.* (2010). Os resultados foram expressos em μM de Trolox/g de amostra seca, μM de sulfato ferroso/g de amostra seca e EC50 expresso em g de amostra seca/g de DPPH. Com relação ao teste DPPH, para os testes de ABTS, FRAP e DPPH respectivamente. Ressalta-se que quanto menor for a média do EC50 apresentada pela amostra, maior será a ação antioxidante.

Todo o processo de extração, assim como, todas as análises relacionadas foram realizados ao abrigo da luz e em triplicata.

2.3 Digestão gastrointestinal *in vitro*

A digestão gastrointestinal *in vitro* das amostras foi realizada segundo a metodologia proposta por Minekus *et al.* (2014) e Brodkorb *et al.* (2019). Todo o procedimento foi realizado ao abrigo da luz e em triplicata, juntamente com um branco de amostra.

A primeira etapa do procedimento é a fase oral. Nesta etapa, as amostras foram submetidas ao processo de hidratação com fluido salivar simulado na proporção 1:2 (amostra: fluido), por 15 minutos. O fluido salivar simulado foi composto por 1,126 g de KCl; 0,756 g de KH₂PO₄; 1,142 g de NaHCO₃; 0,030 g MgCl₂(H₂O)₆; 0,019 g de (NH₄)₂CO₃ e 0,220 g de CaCl₂(H₂O)₂ em 1000 mL de água ultrapura (pH 6,5 ± 0,1) (MINIGHIN *et al.*, 2020). Após o processo de hidratação, as amostras foram acrescidas de 5 mL de solução de α-amilase (75 U/mL Sigma-Aldrich A3176-500KU) e incubadas (Incubadora Tecnal TE- 424) sob agitação (122 rpm) e temperatura (37°C) constantes por 2 minutos.

Em seguida, iniciou-se a segunda etapa, a fase gástrica, acrescentando às amostras 5 mL de fluido gástrico simulado composto por 0,514 g de KCl; 0,122 g de KH₂PO₄; 2,10 g de NaHCO₃; 2,761 g de NaCl; 0,020 g de MgCl₂(H₂O)₆; 0,075 g de (NH₄)₂CO₃ e 0,022 g de CaCl₂(H₂O)₂ em 1000 mL de água ultrapura (pH 3,0 ± 0,1), contendo pepsina (2000 U/mL Sigma-Aldrich P7000) (MINIGHIN *et al.*, 2020). Nesta etapa, o pH das amostras foi ajustado para 3,0±0,1 (HCl 1 mol/L) e as mesmas incubadas por 2 horas sob as mesmas condições da etapa anterior.

Posteriormente, deu-se início a terceira e última etapa, a fase do intestino delgado. Foram adicionadas às amostras 5 mL de fluido intestinal simulado contendo bile (1,40 µmol/mg Sigma-Aldrich B8631) e 5 mL de fluido intestinal simulado contendo pancreatina (3,60 U/mL Sigma-Aldrich P1750). Em seguida, o pH foi ajustado para 7,0±0,1 (NaOH 1 mol/L) e as amostras incubadas por 2 horas sob as mesmas condições das etapas anteriores. O fluido intestinal simulado foi composto por 0,507 g de KCl; 0,109 g de KH₂PO₄; 7,14 g de NaHCO₃; 2,246 g de NaCl; 0,067 g de MgCl₂(H₂O)₆; 0,088 g de CaCl₂(H₂O)₂ em 1000 mL de água ultrapura (pH 7,0 ± 0,1) (MINIGHIN *et al.*, 2020). Ao final da terceira etapa, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 8.790 × g, a 4°C (Novatecnica - NT 825) e as frações bioacessíveis foram recolhidas e armazenadas -18°C em tubo falcon e ao abrigo da luz, até o momento das posteriores análises.

2.4 Avaliação do perfil químico

Para avaliar o perfil químico das amostras secas e de suas respectivas frações bioacessíveis, primeiramente, as amostras secas (0,20 g) foram submetidas ao processo de extração sólido-líquido com 8 mL de metanol por 20 minutos em repouso, seguida de centrifugação a $25.407 \times g$ por 20 minutos. Posteriormente, os extratos das amostras secas e as frações bioacessíveis foram analisadas em espectrômetro de massas LCQ Fleet (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA), equipado com uma fonte de ionização ambiente por *paper spray* (PS-MS).

Desta forma, todas as amostras foram avaliadas nos modos de ionização positivo e negativo, sob as seguintes condições instrumentais: tensão da fonte PS-MS igual a + 4,5 kV (modo positivo) e - 3,5 kV (modo negativo); tensão capilar de 40 V; temperatura do tubo de transferência de 275°C; voltagem de lentes de tubo de 120 V; faixa de massa de 100 a 1000 m/z em ambos os modos de ionização; energia de colisão para fragmentação de 15 a 45 eV. Os espectros de massa obtidos foram processados no software Xcalibur versão 2.1 (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) (GARCÍA *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2022; SOUZA *et al.*, 2022; RAMOS *et al.*, 2023).

Para as análises em PS-MS, 2,0 µL de amostra (extrato ou fração bioacessível) e 40 µL de metanol foram transferidos para o papel cromatográfico, cortado em triângulo equilátero (1,5 cm) e posicionado em frente à entrada do espectrômetro de massa. Este papel foi apoiado por um conector de metal e posicionado a aproximadamente 10 mm de distância com o auxílio de uma plataforma móvel (XYZ). Em seguida, conectou-se o aparelho à uma fonte de alta tensão do espectrômetro através de um fio de cobre (GARCÍA *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2022; SOUZA *et al.*, 2022; RAMOS *et al.*, 2023).

Todo o experimento foi realizado em triplicata e a tentativa de identificação dos compostos foi baseada na comparação das razões massa carga (m/z) e fragmentos descritos na literatura com os dados instrumentais obtidos.

2.5 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey a 5 % de significância através do programa Minitab Statistical Software 21 para verificar se houve diferença estatística entre as amostras de PANC quantos aos parâmetros de teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante.

3. Resultado e discussão

3.1 Compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante

Embora nos últimos anos as análises de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante tenham sido amplamente pesquisadas em todo mundo, poucos estudos foram realizados para avaliar as PANC disponíveis no Brasil. A Tabela 2 apresenta os teores de compostos fenólicos totais bem como a capacidade antioxidante das amostras de PANC.

Tabela 2- Compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC)

| Amostra | Análise | | | |
|--|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|--|
| | CFT (mg GAE/100g) | ABTS (μ M Trolox/g) | FRAP (μ M sulfato ferroso/g) | DPPH (EC50 expresso em g de amostra/g de DPPH) |
| Jambu (Ao) | 1.803,33 \pm 5,69 ^e | 132,37 \pm 3,62 ^e | 650,74 \pm 29,97 ^b | 379,50 \pm 12,28 ^{ghi} |
| Bertalha (Ba) | 872,83 \pm 32,10 ^j | 58,53 \pm 3,06 ^{fg} | 76,99 \pm 2,36 ⁱ | 1.406,06 \pm 56,00 ^d |
| Chuchu-de-vento (Cp) | 782,13 \pm 11,82 ^k | 29,93 \pm 0,48 ^h | 107,34 \pm 3,38 ⁱ | 1.809,11 \pm 167,23 ^c |
| Capiçoba (Ev) | 3.323,85 \pm 18,80 ^a | 246,50 \pm 4,80 ^c | 628,82 \pm 25,87 ^b | 265,96 \pm 6,87 ^{hi} |
| Vinagreira-roxa (Ha) | 1.711,03 \pm 3,66 ^f | 190,82 \pm 11,41 ^d | 441,81 \pm 22,85 ^d | 591 \pm 6,59 ^g |
| Vinagreira (Hs) | 1.441,53 \pm 63,47 ^g | 118,64 \pm 5,19 ^e | 280,54 \pm 9,89 ^f | 1.426,17 \pm 21,78 ^d |
| Almeirão-de-árvore (Lc) | 1.346,50 \pm 23,65 ^h | 126,12 \pm 2,17 ^e | 382,88 \pm 2,32 ^e | 511,18 \pm 10,14 ^{gh} |
| Ora-pro-nóbis sem espinho (Pa) | 485,03 \pm 4,13 ^l | 45,21 \pm 0,51 ^{gh} | 170,99 \pm 14,55 ^h | 2.668,43 \pm 216,23 ^b |
| Ora-pro-nóbis com espinho (Pa ₁) | 942,61 \pm 19,14 ^j | 72,81 \pm 1,35 ^f | 175,01 \pm 5,34 ^{gh} | 1.005,29 \pm 11,97 ^e |
| Azedinha (Ra) | 1.053,83 \pm 7,78 ⁱ | 188,19 \pm 2,51 ^d | 226,51 \pm 4,38 ^{fg} | 596,84 \pm 4,60 ^g |
| Peixinho (Sb) | 2.543,36 \pm 16,18 ^c | 402,30 \pm 14,36 ^a | 1.301,88 \pm 44,63 ^a | 182,98 \pm 6,76 ⁱ |
| Capuchinha folha (Tm – L) | 2.227,52 \pm 13,37 ^d | 75,69 \pm 3,32 ^f | 377,29 \pm 4,79 ^e | 357,77 \pm 4,25 ^{ghi} |
| Capuchinha flor (Tm – F) | 3.144,50 \pm 38,70 ^b | 285,28 \pm 12,33 ^b | 571,97 \pm 4,15 ^c | 612,94 \pm 6,52 ^{fg} |
| Taioba folha (Xs – L) | 1.072,48 \pm 14,84 ⁱ | 82,68 \pm 2,06 ^f | 197,13 \pm 5,01 ^{gh} | 894,17 \pm 1,79 ^{ef} |
| Taioba talo (Xs – S) | 269,07 \pm 0,39 ^m | 29,04 \pm 1,91 ^h | 210,13 \pm 15,93 ^{gh} | 4.219,15 \pm 258,09 ^a |

Valores expressos na mesma coluna seguidos de letras diferentes indicam diferença estatística ($p \leq 5\%$). Valores médios \pm desvio padrão ($n = 3$). Resultados expressos em base seca. EC50: Quantidade de amostra necessária para reduzir a concentração inicial do radical DPPH em 50%. CFT = Compostos fenólicos totais. GAE = Ácido Gálico Equivalente.

Os teores de compostos fenólicos totais variaram de 269,07 mg GAE/100 g para o talo da taioba (Xs-S) a 3.323,85 mg GAE/100 g para a folha da capiçoba (Ev). Resultado já esperado, visto que as folhas são consideradas as principais fontes de compostos bioativos,

como carotenóides e compostos fenólicos (MARIUTTI *et al.*, 2021; MILIÃO *et al.*, 2022). Os teores de compostos fenólicos totais das PANC folhosas supracitadas são semelhantes aos relatados para hortaliça convencional almeirão (2.680 mg GAE/100 g (BEZERRA *et al.*, 2017) e superiores aos apresentados para a couve (230,20 mg GAE/100 g) (RIGUEIRA *et al.*, 2016) e alface (1.690,00 mg GAE/100 g) (TIVERON *et al.*, 2012).

Para avaliar a capacidade antioxidante, as amostras de PANC foram submetidas a diferentes testes, o que permitiu uma avaliação mais ampla do potencial antioxidante das PANC. Os métodos utilizados foram o do ABTS, FRAP e DPPH, que de acordo com Rufino *et al.* (2010), são as técnicas mais amplamente utilizadas. O mecanismo de ação desses métodos baseia-se na doação de um elétron pelo antioxidante para o radical livre, reduzindo os intermediários oxidados para a forma estável (TENA; MARTÍN; ASUERO, 2020).

De modo geral, a capacidade antioxidante das PANC analisadas variou conforme a espécie e o método, apresentando valores superiores ou inferiores aos encontrados em algumas folhosas convencionais, como agrião (97,10 μM de Trolox/g), alface (85,80 μM de Trolox/g), chicória (54,90 μM de Trolox/g), espinafre (41,20 μM de Trolox/g), salsa (30,70 μM de Trolox/g), rúcula (25,50 μM de Trolox/g) e acelga (25,40 μM de Trolox/g) pelo método ABTS, e cebolinha (130,80 μM de sulfato ferroso/g), rúcula (113,80 μM de sulfato ferroso/g), salsa (104,80 μM de sulfato ferroso/g) e acelga (50,50 μM de sulfato ferroso/g) pelo método FRAP (TIVERON *et al.*, 2012).

Com base nesses resultados, as PANC apresentam-se como uma fonte interessante de compostos fenólicos na alimentação. Uma vez que o consumo desses compostos vem sendo associado a diversos efeitos benéficos à saúde, como a prevenção de doenças cardiovasculares, câncer, doenças inflamatórias, doenças neurodegenerativas e distúrbios gastrointestinais (THAKUR *et al.*, 2020). Esses dados reforçam a importância de uma alimentação variada e equilibrada.

3.2 Perfil químico

Embora o teor de compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante possam ser um indicador dos potenciais benefícios das PANC, a identificação dos possíveis compostos fitoquímicos presentes nas PANC nos traz dados mais contundentes. Assim, o perfil químico das amostras de PANC secas e de suas respectivas frações bioacessíveis foi traçado baseado em informações, mediante fragmentação e comparação com dados já relatados na literatura científica. A tentativa de identificação de compostos utilizando PS/MS

ocorreu nos modos de ionização positivo e negativo e estão apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Esses compostos pertencem a diversas classes químicas, como a dos ácidos fenólicos, flavonóides, alcaloides esteroides, diglicosídeos, ácidos graxos, aminoácidos, ácidos orgânicos, entre outras. Sendo a classe dos flavonóides a que apresentou a maior quantidade de compostos possivelmente identificados, nos dois modos de ionização.

Observa-se na Tabela 3, que o perfil químico apresentado para as amostras e respectivas frações bioacessíveis diferiram, indicando que o processo de digestão gastrointestinal *in vitro* interfere na disponibilidade dos fitoquímicos. Nas frações bioacessíveis das amostras de almeirão-de-árvore (Lc), azedinha (Ra), bortalha (Ba), folha da capuchinha (Tm-L) e ora-pro-nóbis com espinhos (Pa_t), não foi observado nenhum composto anteriormente identificado nas amostras secas. Assinalando que o processo de digestão *in vitro* pode ter causado a degradação ou a formação de novos compostos derivados. Fatores relacionados à complexidade molecular, que poderá interferir na estabilidade do composto, e propriedades químicas dos compostos, que varia de substância para substância, bem como alterações de pH durante o processo de digestão e a interação com outros constituintes da matriz alimentar como minerais, fibras, proteínas, podem justificar essas alterações (ALMINGER *et al.*, 2014; GULLON *et al.*, 2015; BERGANTIN *et al.*, 2017; RAMOS *et al.*, 2023).

No entanto, foi possível constatar que amostras da mesma família botânica apresentaram semelhanças no perfil químico, detectadas no modo de ionização positivo. Observa-se que nas amostras almeirão-de-árvore (Lc) e jambu (Ao), pertencentes à família das Asteraceae, os compostos ácido feruloilquínico (m/z 368) e quercetina 3-O-(6"-O-malonil) glicosídeo (m/z 550) foram detectados antes do processo de digestão gastrointestinal *in vitro*. Já o composto luteolina 7-O-rutinosídeo (m/z 594) foi identificado nas amostras após digestão gastrointestinal *in vitro*. Esse composto pertence à classe dos flavonóides, subclasse das flavonas, e já foi anteriormente identificado em alfaces (KIM *et al.*, 2019), alcachofra (YANG *et al.*, 2020), e chá Honeybush (JOUBERT *et al.*, 2010). Os flavonóides vêm sendo relacionados a efeitos benéficos à saúde, principalmente pelo potencial antitrombótico, ou seja, prevenção da formação primária de coágulos pela inibição da agregação plaquetária (BOJIĆ *et al.*, 2019). Neste contexto, a luteolina-7-O-rutinosídeo demonstrou possuir ação vasorrelaxante em musculatura lisa do vaso aórtico de ratos (BABAEI *et al.*, 2008), assim como, atividade anticoagulante e antiplaquetária (YOON *et al.*, 2015), indicando, assim, o potencial benefício do almeirão-de-árvore (Lc) e do jambu (Ao) na prevenção de eventos cardiovasculares.

Tabela 3 – Perfil químico de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) por *Paper Spray Mass Spectrometry* (PS/MS) no modo positivo

| m/z | MS/MS | Tentativa de identificação | Ao | | Ba | | Cp | | Ev | | Ha | | Hs | | Lc | | Pa | | Pa _t | | Ra | | Sb | | Tm - L | | Tm - F | | Xs - L | | Xs - S | | Referência | | |
|--------------------|-----------|----------------------------|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|-----------------|---|----|---|----|---|--------|---|--------|---|--------|---|--------|---|----------------------------|--|--|
| | | | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | | | |
| Alcaloides | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 194, 168, | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Nascimento <i>et al.</i> (2020) | |
| | 149, 131, | (2E,6Z,8E)-N-isobutil- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Savic <i>et al.</i> (2021) | | |
| 222 | 123, 121, | 2,6,8-decatrienamida | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Stein <i>et al.</i> (2021) | | |
| | 107, 93, | (Espilantol) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Zhang <i>et al.</i> (2021) | | |
| | 81, 67 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 280, | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 280 | 237, | Tatarina A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | X | - | X | (2014), Ma <i>et al.</i> (2019) | |
| | 236 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 425 | 425 | Jervine | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Idris <i>et al.</i> (2022) | |
| Aminoácidos | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 161 | 161 | Di-L-alanine | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | X | Wahman <i>et al.</i> (2021) | |
| | 189, 188, | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 205 | 170, 164, | L-triptofano | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | Abu-Reidah <i>et al.</i> (2015), Ma <i>et al.</i> (2019), Wahman <i>et al.</i> (2021), Liao <i>et al.</i> (2012) | |
| | 159 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 367 | 331 | Fructosil-triptofano | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | X | - | - | - | Abu-Reidah <i>et al.</i> (2015) | |
| Betacianina | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 551 | 389 | Betanina-5-O-β-glucoside | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Mosquera <i>et al.</i> (2020) | |
| 593 | 507 | 2-Decarboxy-phyllocactin | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Mosquera <i>et al.</i> (2020) | |

| m/z | MS/MS | Tentativa de identificação | Ao | | Ba | | Cp | | Ev | | Ha | | Hs | | Lc | | Pa | | Pa _t | | Ra | | Sb | | Tm - L | | Tm - F | | Xs - L | | Xs - S | | Referência | | | |
|---------------------|-------------------|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|-----------------|---|----|---|----|---|--------|---|--------|---|--------|---|--------|---|------------|---------------------------------|--|---------------------------------|
| | | | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | | | | |
| 593 | 389, 345 | 6'-O-malonil-2-decarboxibetanina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Barbosa <i>et al.</i> (2017) | |
| Betaxantinas | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 313 | 269 | Threonina-betaxantina | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Mosquera <i>et al.</i> (2020) | |
| 359 | 315 | Fenilalanina-betaxantina | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Svenson <i>et al.</i> (2008) | |
| 391 | 347 | Dopa-betaxantina | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Svenson <i>et al.</i> (2008) | |
| Fatty acid | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 279 | 131, 121, 109, 95 | Ácido α -Linolênico | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | X | - | Abu-Reidah <i>et al.</i> (2015) | | |
| 282 | 97, 84, 83, 81 | Ácido oleico | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | X | - | - | - | - | - | - | Cruz <i>et al.</i> (2016) | |
| 284 | 157, 88 | Etilpalmitato | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Cruz <i>et al.</i> (2016) |
| Flavonóides | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 273 | 143 | Butein | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Al-Yousef <i>et al.</i> (2020) | |
| 285 | 285 | Acacetina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | X | - | Wahman <i>et al.</i> (2021) | |
| 301 | 284, 256 | Chrisoriol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | X | X | X | - | - | Abu-Reidah <i>et al.</i> (2015), Wahman <i>et al.</i> (2021) | |
| | 286 | 7-Metoxi 2'-hidroxi genistein (Cajananin) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Ammar <i>et al.</i> (2020) | |
| | 258 | Diosmetina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Abu-Reidah <i>et al.</i> (2019) |

| m/z | MS/MS | Tentativa de identificação | Ao | | Ba | | Cp | | Ev | | Ha | | Hs | | Lc | | Pa | | Pa _t | | Ra | | Sb | | Tm - L | | Tm - F | | Xs - L | | Xs - S | | Referência | |
|-----|---------------|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|-----------------|---|----|---|----|---|--------|---|--------|---|--------|---|--------|-----------------------------|---------------------------------|--|
| | | | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | | |
| 302 | 302, 283 | Peonidina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | X | X | X | Wahman <i>et al.</i> (2021) | |
| 317 | 302 | Isorhamnetina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | X | - | - | - | - | - | - | - | - | Abu-Reidah <i>et al.</i> (2019) | |
| 319 | 301 | Miricetin | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | X | X | Wahman <i>et al.</i> (2021) | | |
| 331 | 331 | Tricin | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | X | - | - | Wahman <i>et al.</i> (2021) | | |
| 345 | 315, 299, 287 | Dihidroxi-trimetoxiflavona | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Ammar <i>et al.</i> (2020) | |
| 481 | 319 | Miricetina-3-hexosídeo | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | Ronchetti (2018) | |
| 491 | 491 | Cianidina 3-O-(6"-O-acetilglicosídeo) | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Kim <i>et al.</i> (2019) | |
| 499 | 287 | Cianidina-3-O-glicosídeo | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Tardugno <i>et al.</i> (2018) | |
| 551 | 551, 465, 303 | Quercetina 3-O-(6"-O-malonil) glicosídeo | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Bergantin <i>et al.</i> (2017), Kim <i>et al.</i> (2019) |
| | 289 | Eriodictiol-O-rutinoside | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | X | X | X | Abu-Reidah <i>et al.</i> (2015) | |
| | 433 | Pelargonidina-ramnosil-glicosídeo | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | X | - | - | - | - | - | - | Barrio <i>et al.</i> (2018) |
| 579 | 271 | Apigenin 7-O-rutinoside | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Abu-Reidah <i>et al.</i> (2019) |
| | 579, 315, 301 | Kaempferol dimetil éter dipentosídeo/ Peonidina-3-O-xilosil ramnosídeo Naringenina 7-O-neohesperidoside (naringina) | - | - | - | - | - | - | - | X | X | X | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Al-Yousef <i>et al.</i> (2020), Zhang <i>et al.</i> (2014) |

| m/z | MS/MS | Tentativa de identificação | Ao | | Ba | | Cp | | Ev | | Ha | | Hs | | Lc | | Pa | | Pa _t | | Ra | | Sb | | Tm - L | | Tm - F | | Xs - L | | Xs - S | | Referência | |
|------|------------------------|----------------------------|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|-----------------|---|----|---|----|---|--------|---|--------|---|--------|---|--------|--------|-------------------------------------|-------------------|
| | | | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | | |
| 581, | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Kim <i>et al.</i> | |
| 273 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | (2019) | | |
| 561, | Kaempferol | 3-O- | X | X | - | - | - | - | X | X | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | Abu-Reidah <i>et al.</i> | |
| 519, | arabinosilgalactosídeo | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | (2015) | | |
| 489, | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 581 | 399 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Chiung-Huei <i>et al.</i> | |
| 287, | Cianidina | 3- | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Chiung-Huei <i>et al.</i> | |
| 449 | sambubiosídeo | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | (2011); Peng <i>et al.</i> | |
| 593 | 447 | Peonidina | - | - | - | - | - | - | - | - | X | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | El-Shiekh <i>et al.</i> | |
| | | dirhamnosídeo | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | (2020); Sáyago-Ayerdi <i>et al.</i> | |
| 617 | Escolimósido | | - | X | - | - | - | - | X | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Al-Yousef <i>et al.</i> | |
| 595, | Apigenina-6,8-di-C- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | (2020) | |
| 431 | glucopiranósido | (Vicenina 2) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Kim <i>et al.</i> | |
| 433, | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | (2019) | |
| 367, | Saponarin | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Abu-Reidah <i>et al.</i> | |
| 595 | 337 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | (2015), | |
| 433 | Kaempferol rutinosídeo | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Wahman <i>et al.</i> | |
| 431, | Kaempferol-3-O-(6-O- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | (2021) | |
| 413, | p-cumaroil) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Wahman <i>et al.</i> | |
| 170 | glicosídeo | (Potengriffioside A) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | (2021) | |
| 433, | Kaempferol | 3-O- | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Abu-Reidah <i>et al.</i> | |
| 367, | neohesperidosídeo | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | (2015) | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Abu-Reidah <i>et al.</i> | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | (2015) | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Haq <i>et al.</i> |

| m/z | MS/MS | Tentativa de identificação | Ao | | Ba | | Cp | | Ev | | Ha | | Hs | | Lc | | Pa | | Pa _t | | Ra | | Sb | | Tm - L | | Tm - F | | Xs - L | | Xs - S | | Referência | |
|-------------------|---------------|--|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|-----------------|---|----|---|----|---|--------|---|--------|---|--------|---|--------|---|---|---------------------------------|
| | | | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | | |
| 337, | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 271 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 449, | | Cianidina-rhamnosyl- | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | X | - | - | - | - | - | - | |
| 271 | | glucosídeo | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Barrio <i>et al.</i> (2018) | |
| 287 | | Cianidina 3-(6"-coumaroyl) glucosídeo | - | - | - | - | - | - | - | X | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Sarkar <i>et al.</i> (2017) | |
| 595, | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 449, | | Luteolin-7-O- | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 287 | | neohesperidosídeo | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Liao <i>et al.</i> (2012) | |
| 383, | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 353 | | Diglucosil apigenina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Abu-Reidah <i>et al.</i> (2019) |
| 597 | 481, 465, 303 | Delphinidina sambubiosídeo | - | - | - | - | - | - | - | X | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Peng <i>et al.</i> (2011); El-Shiekh <i>et al.</i> (2020) | |
| 609 | 609, 579, 463 | Peonidina-3-(p-coumaroyl-glucosídeo) isômero | - | - | - | - | - | - | - | X | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Al-Yousef <i>et al.</i> (2020) | |
| | 299 | Diosmetina-neohesperidosídeo | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | Abu-Reidah <i>et al.</i> (2015) | |
| | 611, 449 | Luteolin-3',7-di-O-glucosídeo | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | Wahman <i>et al.</i> (2021) | |
| 611 | 449 | Kaempferol-3-dihexosídeo | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | Ronchetti (2018) | |
| | 611, 449, 287 | Cianin (cianidina 3,5-di-O-glucosídeo) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Kim <i>et al.</i> (2019) | |
| 643 | 481 | Myricetina -3-dihexosídeo | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | Ronchetti (2018) | |
| Glicosídeo | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 360 | 314 | Trigloquinina III | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | Abu-Reidah <i>et al.</i> (2015) | |

| m/z | MS/MS | Tentativa de identificação | Ao | | Ba | | Cp | | Ev | | Ha | | Hs | | Lc | | Pa | | Pa _t | | Ra | | Sb | | Tm - L | | Tm - F | | Xs - L | | Xs - S | | Referência | |
|--------------------------------|-------------------------|--|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|-----------------|---|----|---|----|---|--------|---|--------|---|--------|---|--------|---|---|--------------------------|
| | | | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | | |
| Ácidos hidroxicinâmicos | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 165 | 147, 119 | Ácido <i>p</i> -cumárico | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Kim <i>et al.</i> (2019) |
| 339 | 339, 321, 147 | Ácido 3- <i>p</i> -Cumaroilquínico | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | Bazylko <i>et al.</i> (2013); Kim <i>et al.</i> (2019) | |
| 355 | 393, 377 | Ácido (1,5)- <i>O</i> -cafeoilquínico | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Kim <i>et al.</i> (2019) | |
| 369 | 391, 195 | Ácido feruloilquínico | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Kim <i>et al.</i> (2019) | |
| 443 | 481, 443, 425, 297, 279 | Ácido (2R,3R)-2,3-di- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroiltartárico | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Kim <i>et al.</i> (2019) | |
| Iridóides | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 197 | 179, 161, 135, 107, 151 | Loliolide | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Abu-Reidah <i>et al.</i> (2019); Haq <i>et al.</i> (2020) | |
| 499 | 335 | Verproside II | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | Abu-Reidah <i>et al.</i> (2015) | |
| Ácidos orgânicos | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 139 | 121, 111, 97, 93, 79 | Ácido 4-hidroxibenzóico | - | - | - | - | - | - | - | X | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Al-Yousef <i>et al.</i> (2020) | |
| 213 | 196, 195 | Ácido 2,4,5-trimetoxibenzóico | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | Zhang <i>et al.</i> (2014), Ma <i>et al.</i> | |

| m/z | MS/MS | Tentativa de identificação | Ao | | Ba | | Cp | | Ev | | Ha | | Hs | | Lc | | Pa | | Pa _t | | Ra | | Sb | | Tm - L | | Tm - F | | Xs - L | | Xs - S | | Referência |
|------------------------|-----------------------------|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|-----------------|---|----|---|----|---|--------|---|--------|---|--------|---|--------|--------|--|
| | | | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | |
| 137, 95 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | (2019) | |
| Outros | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 135 | 135 | Hidroxycoumarina | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | El-Shiekh <i>et al.</i> (2020) |
| 149 | 150, 107, 79 | N-benzilacetamida | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | X | X | - | - | - | - | Cruz <i>et al.</i> (2016) |
| 282 | 201 | Laurocapram | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | X | - | Abu-Reidah <i>et al.</i> (2015) |
| Fenilpropanoide | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 314 | 177, 145, 136, 121 | N-Feruloiltiramine | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Al-Yousef <i>et al.</i> (2020), El-Shiekh <i>et al.</i> (2020) |
| 361 | 344, 329 | Ácido rosmarínico | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | Abu-Reidah <i>et al.</i> (2015) |
| Quinona | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 416 | 417, 416 | γ-Tocoferol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Torres <i>et al.</i> (2022) |
| Esteróides | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 393 | 393, 273 | 22-desidrocolesterol | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Al-Yousef <i>et al.</i> (2020) |
| 414 | 396, 381, 329 | β-Sitosterol/ γ-Sitosterol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | X | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Malek <i>et al.</i> (2009); Torres <i>et al.</i> (2022) |
| Tanino | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 331 | 123 | Hexósido de ácido (iso)vanílico II | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | X | - | Abu-Reidah <i>et al.</i> (2015) |
| Terpenos | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 279 | 261, 149 | 7α-Hidroxi-14,15-dinorlabd-8(17)-en-13- | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Haq <i>et al.</i> (2020) |

| m/z | MS/MS | Tentativa de identificação | Ao | | Ba | | Cp | | Ev | | Ha | | Hs | | Lc | | Pa | | Pa _t | | Ra | | Sb | | Tm - L | | Tm - F | | Xs - L | | Xs - S | | Referência |
|-----|--------------------|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|-----------------|---|----|---|----|---|--------|---|--------|---|--------|---|--------|---|------------|
| | | | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | |
| | | ona | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 349 | 331, 258, 130 | Geraniol-dinitrobenzoato | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | X | - | - |
| 357 | 339 | Salviacocina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 441 | 423, 203, 189, 161 | Cucurbita-5,23-dieno-3,7,25-triol (3β,7β,23E)-forma | - | - | - | - | X | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | 423, 231, 189 | Cucurbita-5(10),6,23-trieno-3,25-diol 3β-forma | - | - | - | - | X | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 475 | 285 | Salvinorina C I | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 499 | 481, 463, 385 | Cucurbitacina S | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 537 | 481, 444 | 13-cis-β-caroteno / di-cis-β-caroteno | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 553 | 535, 369, 171 | Miriconaldi semicarbazona | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 579 | 519, 485, 355 | Cucurbitacina E | - | - | - | - | X | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| 611 | 567 | Humilinalide C | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | X |

Com relação às amostras de ora-pro-nóbis com e sem espinhos (Pa e Pa_t) (Cactaceae), observou-se que os terpenóides β -Sitosterol (m/z 414) e γ -Sitosterol (m/z 414) e a betacianina 6'-O-malonil-2-descarboxibetanina (m/z 593) foram detectados na fração bioacessível das duas amostras. Dentre os terpenóides identificados, destaca-se o β -Sitosterol, que é um composto naturalmente presente nas membranas das células vegetais com estrutura química semelhante ao colesterol (PONNULAKSHMI *et al.*, 2019). Possui várias ações biológicas, como efeitos ansiolíticos e sedativos, analgésicos, imunomoduladores, antimicrobianos, anticancerígenos, anti-inflamatórios, hipolipemiante, hepatoprotetor, efeito protetor contra doenças respiratórias, efeito cicatrizante, atividades antioxidantes e antidiabéticas (BABU; JAYARAMAN, 2020), indicando os vários benefícios à saúde da população ao se consumir ora-pro-nóbis. O sitosterol também foi identificado por Souza *et al.* (2022) em amostras de folhas de ora-pro-nóbis.

Comportamento semelhante foi observado para as amostras da família Malvaceae (sépala da vinagreira (Hs) e vinagreira-roxa (Ha)). O composto dipentósido de éter dimetílico de kaempferol (m/z 579), e as antocianinas cianidina-3-sambubiósido (m/z 581), delphinidina-3-sambubiósido (m/z 597) e isômero peonidina-3-(p-cumaroil-glicosídeo) (m/z 609) foram identificados nas amostras. No entanto, apenas o composto m/z 579 permaneceu nas respectivas frações bioacessíveis. Alguns estudos indicam que a cianidina sambubiósido e delphinidina sambubiósido são as principais antocianinas presentes no gênero *Hibiscus* (DE MOURA *et al.*, 2019; MAJDOUB *et al.*, 2021). A degradação desses compostos ao longo da digestão gastrointestinal *in vitro*, em amostras de vinagreira, foi anteriormente relatada por Sáyago-Ayerdi *et al.* (2021). Essa redução ocorre provavelmente devido à exposição ao calor (37°C) por um período prolongado (2 horas), durante a simulação da digestão *in vitro*.

A Tabela 4 apresenta todos os possíveis compostos identificados no modo de ionização negativo. Assim como no modo positivo, foram constatadas alterações no perfil químico de todas as amostras após o processo de digestão gastrointestinal *in vitro*. As amostras apresentaram, em suas respectivas frações bioacessíveis, a manutenção de pelo menos três compostos já identificados nas amostras antes do processo de digestão gastrointestinal *in vitro*, com exceção das amostras bertalha (Ba) e talo da taioba (Xs-S). A manutenção destes compostos é algo positivo, uma vez que se mostram bioacessíveis para exercerem suas funções biológicas no organismo.

Tabela 4 - Perfil químico de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) por *Paper Spray Mass Spectrometry* (PS/MS) no modo negativo

| m/z | MS/MS | Tebtativa de identificação | Ao | | Ba | | Cp | | Ev | | Ha | | Hs | | Lc | | Pa | | Pat | | Ra | | Sb | | Tm - L | | Tm - F | | Xs - L | | Xs - S | | Referência | |
|--------------------------------|-------------------|--|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|----|---|-----|---|----|---|----|---|--------|---|--------|---|--------|---|--------|---|---|---------------------------------|
| | | | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | I | B | | |
| Aminoácidos e derivados | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 219 | 157 | 5-Hidroxitriptofano | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | Abu-Reidah <i>et al.</i> (2015) |
| 259 | 197, 130 | γ - Glutamil-leucina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | Abu-Reidah <i>et al.</i> (2015) |
| 342 | 180 | Frutossil tirosina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | Abu-Reidah <i>et al.</i> (2015) | |
| Antraquinonas | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 253 | 225 | Crisofanol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Ma <i>et al.</i> (2012) | |
| 269 | 225, 154 | Emodin | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Wang <i>et al.</i> (2018) | |
| 283 | 268 | Physcion | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | X | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Ma <i>et al.</i> (2012) Wang <i>et al.</i> (2018); Haq <i>et al.</i> (2020) | |
| Betalaina | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 551 | 389 | Betanina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Mata <i>et al.</i> (2016) | |
| Cumarina | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 177 | 177, 149, 133, 93 | 6,7-Dihidroxycumarina (Esculetina) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | Ma <i>et al.</i> (2019) | |
| 339 | 177 | Esculin | X | - | - | - | - | X | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Ferrare <i>et al.</i> (2018) | |
| Ácido Graxos | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 229 | 185 | Dimetilsebacato (derivado do ácido sebácico) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Cabañas-García <i>et al.</i> (2019) | |
| 277 | 277 | Ácido linolênico | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Torres <i>et al.</i> (2022) | |
| 281 | 281 | Ácido oleico | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Seukep <i>et al.</i> (2020) | |
| 293 | 293, 265 | Ácido 13-ceto-9Z,11E-octadecadienóico | X | - | - | - | - | X | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Seukep <i>et al.</i> (2020) | |
| 293 | 236, 221, 186 | Ácido hidroxi-octadecatrienoico | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Aghakhani <i>et al.</i> (2017) |
| 295 | 277, 195, 171 | Ácido α -artemisólico | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | X | X | X | Abu-Reidah <i>et al.</i> (2015) | |

Antes do processo de digestão *in vitro* não foi possível identificar nenhum composto na amostra de beralha (Ba), no entanto, na fração bioacessível foram identificados quatro possíveis compostos, sendo eles o derivado do ácido hidroxicinâmico, ácido ferúlico (m/z 193), o aminoácido triptofano (m/z 203) e os flavonóis kaempferol-3-rutinoside (m/z 593) e quercetina 3-rutinosídeo (m/z 609). Portanto, o processo de digestão propiciou a presença de importantes compostos na beralha. A não identificação de compostos na amostra de beralha (Ba) antes do processo de digestão *in vitro* pode estar relacionada ao método de identificação de compostos proposto na presente pesquisa. Como já mencionado anteriormente, a identificação dos compostos ocorreu baseada em dados já disponíveis na literatura para a espécie em questão ou para espécies da mesma família. Desta forma, a identificação de compostos da amostra de beralha ficou limitada à pesquisa em apenas um artigo (PACHECO *et al.*, 2019), o que pode ter influenciado neste resultado.

Com relação à amostra talo de taioba (Xs-S), foram listados 19 possíveis compostos antes do processo de digestão *in vitro* e outros sete diferentes compostos na fração bioacessível. Esse resultado pode estar relacionado à presença de fibras na amostra, já que normalmente os talos dos vegetais apresentam teor considerável de fibra (STORCK *et al.*, 2013). Jakobek e Matić (2019), ao realizarem uma revisão de literatura sobre a influência das fibras alimentares na bioacessibilidade de compostos fenólicos, verificaram que as fibras reduzem a bioacessibilidade de polifenóis na parte superior do trato digestivo.

Para Palafox-Carlos; Ayala-Zavala e González-Aguilar (2011), dois fatores estão envolvidos no processo de digestão de compostos fenólicos. O primeiro é o aprisionamento físico dos compostos em conjuntos estruturados, como o tecido vegetal; e o segundo é o aumento da viscosidade dos fluidos gástricos, restringindo o processo de mistura peristáltica que promove o transporte de enzimas para seus substratos, sais biliares para gordura não micelizada e compostos fenólicos solúveis para a parede intestinal. No entanto, esses mesmos autores explicam que a taxa de liberação de compostos fenólicos das partículas fibrosas no fluido intestinal é inversamente proporcional ao tamanho da partícula e diretamente proporcional ao gradiente de soluto (PALAFOX-CARLOS; AYALA-ZAVALA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2011), o que pode justificar os setes possíveis compostos detectados na fração bioacessível da amostra talo de taioba (Xs-S). Diante desses dados, o consumo de partes não convencionais dos vegetais, como o talo de taioba, é uma excelente opção do ponto de

vista nutricional bem como ambiental, pelo aproveitamento de um resíduo orgânico, que geralmente é descartado, evitando o desperdício e a geração de resíduos.

Os sete compostos identificados no talo da taioba (Xs-S) foram o ácido málico (m/z 133), ácido p-cumálico (m/z 163), 6,7-di-hidroxycumarina (m/z 177), ácido quínico (m/z 191), ácido cítrico (m/z 191), luteolina-8-C-glicosídeo (m/z 447) e calodendroside A (m/z 627). Dentre esses compostos, destaca-se o flavonóide luteolina-8-C-glicosídeo, que foi igualmente detectado na amostra de folha de taioba (Xs-L). Lam *et al.* (2016), ao realizarem uma revisão da literatura relatam que propriedades medicinais deste composto incluem potencial antioxidante, antienvhecimento, antiviral, antibacteriana, anti-inflamatória, vasodilatadora e cardioprotetora, radioprotetora. Portanto, tanto as folhas quanto o talo de taioba são fontes de compostos bioativos com alegação funcional, benéficos à nossa saúde, indicando a importância do consumo desses vegetais.

Assim como foi observado no modo positivo (Tabela 3), os perfis químicos que foram obtidos no modo negativo, para amostras pertencentes à mesma família botânica, apresentaram perfil semelhante. Verifica-se na Tabela 4 que os compostos ácido eicosanóico (m/z 311), ácido caftárico (m/z 311 e 312), isômero coumaroil hexosídeo (m/z 325) e esculina (m/z 339) foram listados apenas nas amostras não digeridas de almeirão-de-árvore (Lc), capiçoba (Ev) e jambu (Ao) (Asteraceae). O ácido caftárico já foi anteriormente identificado nos vegetais convencionais chicória (BERGANTIN *et al.*, 2017) e alface (KIM *et al.*, 2019) e o composto esculina na chicória (FERRARE *et al.*, 2018). Já os flavonóides monoacetato de miricetina (m/z 378), kaempferol-O-glicosídeo (m/z 447) e luteolina glicosídeo (m/z 447) foram detectados somente nas respectivas frações bioacessíveis, provavelmente, devido à ação enzimática e, ou alteração do pH, que promoveram a liberação desses compostos. Enquanto que o isômero ácido dicaffeoilquínico (m/z 515) esteve presente nas três amostras antes e após a digestão *in vitro*. A presença desses compostos após a digestão se torna vantajosa do ponto de vista nutricional, uma vez que ao consumir essas PANC, tais substâncias estarão disponíveis para exercerem seus efeitos benéficos à nossa saúde.

Com relação às amostras de ora-pro-nóbis com e sem espinhos (Pa e Pa₁) (Cactaceae), observou-se que os compostos ácido succínico (m/z 117), ácido piscídico (m/z 255), ácido linolênico (m/z 277), 2-feniletil β-d-glicopiranosídeo (m/z 283), nordihidrocapsiato (m/z 293), 3,5-Dihidroxi-4-metiloxolano-2-ilmetoxi-6-hidroximetiloxano-3,4,5-triol (m/z 309), ácido caftárico (m/z 311), ácido fertárico (m/z

325) e ácido tianshico (m/z 329) foram detectados apenas antes do processo de digestão *in vitro*, em ambas as amostras. O único composto fenólico em comum entre as amostras que permaneceu após a digestão *in vitro* foi Vacciheïn A (m/z 377). Diferentemente, os ácidos málico (m/z 113), cítrico (m/z 191) e quínico (m/z 191) foram identificados somente após a digestão *in vitro*. Esses três ácidos orgânicos, normalmente, são encontrados em frutos como cranberry (FONG *et al.*, 2021) e mirtilo (ZHANG *et al.*, 2020). Yildirim *et al.* (2020) relatam que esses ácidos em conjunto apresentam atividade anti-hemorroidária. Mesmo que nas frações bioacessíveis tenham sido identificados menos compostos, o consumo de ora-pro-nóbis deve ser estimulado, principalmente em combinação com vegetais convencionais que, em conjunto, vão contribuir para uma dieta balanceada e nutritiva.

Comportamento semelhante também foi observado para as amostras sépala da vinagreira (Hs) e vinagreira-roxa (Ha) (Malvaceae). O derivado de metil galato (m/z 325) foi detectado nas duas amostras não digeridas. E os compostos ácido cafeico (m/z 179) e dimetiléster de ácido de hibisco (m/z 217) apenas nas frações bioacessíveis. Já o ácido hidroxicítrico (m/z 189) foi identificado nas amostras e nas respectivas frações bioacessíveis, assim como observado por Sáyago-Ayerdi *et al.* (2021). O ácido hidroxicítrico, um derivado do ácido cítrico, é conhecido por suprimir o ganho de peso corporal e a síntese de gordura em animais e humanos (TOMAR *et al.*, 2019). Além disso, este composto vem sendo associado a inibição de pedra nos rins por meio da regulação da cristalização e da redução da lipoxicidade induzida por hiperoxalato (ZHANG *et al.*, 2023). Esses dados indicam que o consumo sépala da vinagreira (Hs) e vinagreira-roxa (Ha) podem ser associados a efeitos benéficos à saúde.

Esses resultados indicam uma semelhança em relação aos compostos bioativos, presentes em espécies vegetais da mesma família botânica, após processo de digestão gastrointestinal *in vitro*. Cosme *et al.* (2020) descreveram que, normalmente, os compostos fenólicos poliméricos são degradados em ácidos fenólicos, os flavonóis são decompostos em ácidos hidroxifenilacéticos, as flavonas e flavanonas são decompostas em ácidos hidroxifenilpropiônicos e as proantocianidinas são degradadas em ácidos fenólicos de menor peso molecular.

Resumidamente, para que ocorra a absorção dos compostos fenólicos durante a digestão gastrointestinal, esses passam por um processo de hidrólise que pode ocorrer em função do ambiente ácido do estômago, do ambiente levemente alcalino (pH de aproximadamente 8) do intestino delgado, pela ação das enzimas do sistema

digestivo ou pela microbiota intestinal (KONG; SINGH, 2010; THAKUR *et al.*, 2020). Este processo está diretamente ligado à clivagem e liberação de agliconas da matriz alimentar como resultado da atividade das enzimas digestivas (TENG; CHEN, 2019). Essas condições são capazes de promover diversas alterações na estrutura dessas moléculas, como metilação, dimerização, hidroxilação e glicosilação, bem como formação de derivados fenólicos pela degradação parcial da estrutura molecular (WOJTUNIK-KULESZA *et al.*, 2020; VAZ *et al.*, 2022). No entanto, essa transformação também depende da estrutura química do composto e do tipo de alimento ingerido (COSME *et al.*, 2020). De forma geral, destaca-se a importância da divulgação do uso das PANC, baseada em suas características químicas e nos diversos efeitos benéficos à saúde que os compostos presentes nas mesmas vêm sendo associados, além disso, essas plantas apresentam grande potencial para a produção sustentável e a segurança alimentar.

4. Conclusão

Os resultados apresentados para a capacidade antioxidante das amostras indicam perspectivas promissoras quanto ao consumo das PANC estudadas, uma vez que apresentam teores de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante relevante comparando-se a alguns vegetais convencionais.

Quanto aos dados relacionados à digestão gastrointestinal *in vitro*, conclui-se que o perfil químico da fração bioacessível de todas as amostras difere do perfil químico apresentado pelas amostras antes do processo de digestão *in vitro*, tanto no modo positivo quanto no modo negativo. Além disso, semelhanças no comportamento dos compostos presentes em espécies da mesma família botânica, foram observadas.

A técnica de espectrometria de massas no modo de ionização ambiente por *paper spray* demonstrou-se eficiente na avaliação do perfil químico das amostras e de suas respectivas frações bioacessíveis. Ressalta-se que até o presente momento não foram encontrados estudos na literatura que tenham utilizado a mesma técnica para traçar o perfil químico das PANC aqui estudadas após o processo de digestão gastrointestinal *in vitro*.

No entanto, ressalta-se a necessidade de mais estudos que busquem conhecer sobre as quebras dos constituintes dos alimentos durante a digestão, pois a

possível eficácia dos metabólitos vegetais na saúde é determinada principalmente com base na disponibilidade desses compostos.

5. Referência bibliográfica

ABIDI, J. *et al.* Use of ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry system as valuable tool for an untargeted metabolomic profiling of *Rumex tunetanus* flowers and stems and contribution to the antioxidant activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 162, p. 66–81, 2018.

ABU-REIDAH, I. M. *et al.* Comprehensive metabolite profiling of *Arum palaestinum* (Araceae) leaves by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Research International**, v. 70, p. 74–86. 2015.

ABU-REIDAH, I. M. *et al.* Untargeted metabolite profiling and phytochemical analysis of *Micromeria fruticosa* L. (Lamiaceae) leaves. **Food Chemistry**, v. 279, p. 128–143, 2019.

AGHAKHANI, F.; KHARAZIAN, N.; GOOINI, Z. L. Flavonoid constituents of *phlomis* (Lamiaceae) species using liquid chromatography mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 2, p. 180–195, 2017.

ALMINGER, M. *et al.* In vitro models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n.4, p. 413–436, 2014.

AL-YOUSEF, H. M. *et al.* UPLC-ESI-MS/MS profile and antioxidant, cytotoxic, antidiabetic, and antiobesity activities of the aqueous extracts of three different hibiscus species. **Journal of Chemistry**, v. 2020, p. 6749176, 2020.

AMMAR, S. *et al.* Untargeted metabolite profiling and phytochemical analysis based on RP-HPLC-DAD-QTOF-MS and MS/MS for discovering new bioactive compounds in *Rumex algeriensis* flowers and stems. **Phytochemical Analysis**, v. 31, n. 5, p. 616–635, 2020.

BABAEI, H. *et al.* Antioxidant and vasorelaxant activities of flavonoids from *Amygdalus lycioides* var. *horrida*. **Turkish Journal of Biology**, v. 32, n. 3, p. 203–208, 2008.

BABU, S.; JAYARAMAN, S. An update on β -sitosterol: A potential herbal nutraceutical for diabetic management. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 131, p. 110702, 2020.

BARBOSA, A. da S. *et al.* Elucidation of the betalainic chromoalkaloid profile of *Pilosocereus catingicola* (Gürke) Byles & Rowley subsp. *salvadorensis* (Werderm.) Zappi (Cactaceae) from Paraíba, Brazil. **African Journal of Agricultural Research**, v.12, n. 14, p. 1236–1243, 2017.

- BARRIO, G. R. *et al.* Chemical composition of the edible flowers, pansy (*Viola wittrockiana*) and snapdragon (*Antirrhinum majus*) as new sources of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 252, p.373–380, 2018.
- BAZYLKO, A. *et al.* Comparison of antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activity and chemical composition of aqueous and hydroethanolic extracts of the herb of *Tropaeolum majus* L. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 88–94, 2013.
- BERGANTIN, C. *et al.* Bioaccessibility and HPLC-MS/MS chemical characterization of phenolic antioxidants in Red Chicory (*Cichorium intybus*). **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 94–102, 2017.
- BEZERRA, A. S. *et al.* Composição nutricional e atividade antioxidante de plantas alimentícias não convencionais da região sul do Brasil. **Arquivos Brasileiros de Alimentação**, v. 2, n. 3, p. 182–188, 2021.
- BOJIĆ, M. *et al.* Antithrombotic activity of flavonoids and polyphenols rich plant species. **Acta pharmaceutica**, v. 69, n.4, p. 483–495, 2019.
- BRODKORB, A. *et al.* INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, p. 991–1014, 2019.
- CABAÑAS-GARCÍA, E. *et al.* Phytochemical profiling of *Coryphantha macromeris* (Cactaceae) growing in greenhouse conditions using ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. 705. 2019.
- CELEP, E. *et al.* The bioaccessible phenolic profile and antioxidant potential of *Hypericum perforatum* L. after simulated human digestion. **Industrial Crops and Products**, v. 109, n.1, p. 717–723, 2017.
- CORREIA, V. T. V. *et al.* Efficiency of different solvents in the extraction of bioactive compounds from *Plinia cauliflora* and *Syzygium cumini* fruits as evaluated by Paper Spray Mass Spectrometry. **Molecules**, n. 28, p. 2359, 2023.
- COSME, P. *et al.* Plant phenolics: Bioavailability as a key determinant of their potential health-promoting applications. **Antioxidants**, v. 9, n. 12, p. 1263, 2020.
- COSTA, L. D. *et al.* *Pachira aquatica* (Malvaceae): An unconventional food plant with food, technological, and nutritional potential to be explored. **Food Research International**, v.164, p. 112354, 2023.
- CRUZ, J. M. dos A. *et al.* Thermal Treatment and High-Intensity Ultrasound Processing to Evaluate the Chemical Profile and Antioxidant Activity of Amazon Fig Juices. **Processes**, v. 11, n. 2, p.408, 2023.
- CRUZ, R. C. da, *et al.* Antimicrobial activity and chromatographic analysis of extracts from *Tropaeolum pentaphyllum* Lam. tubers. **Molecules**, v. 21, p. 566, 2016.
- da CUNHA, M. A. *et al.* Urban gardening and neglected and underutilized species in Salvador, Bahia, Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 16, n. 67, p.

1-16, 2020.

de MOURA, S. C. S. R. *et al.*, Release of anthocyanins from the hibiscus extract encapsulated by ionic gelation and application of microparticles in jelly candy. **Food Research International**, v. 121, p. 542–552, 2019.

DESTA, K. T. *et al.* Antioxidant activities and liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry characterization and quantification of the polyphenolic contents of *Rumex nervosus* Vahl leaves and stems. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 8, p. 1433–1441, 2016.

DURÁN-CASTAÑEDA, A. C. *et al.* Bioaccessibility of phenolic compounds in *Psidium guajava* L. varieties and *P. friedrichsthalianum* Nied. after gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v.400, p. 134046, 2023.

EL-HAWARY, S. A. *et al.* (2011). A Profile of Bioactive Compounds of *Rumex vesicarius* L. **Journal of Food Science**, v. 76, n.8, p. C1195–1202.

EL-SHIEKH, R. A. *et al.* *Hibiscus sabdariffa* L.: A potent natural neuroprotective agent for the prevention of streptozotocin-induced Alzheimer's disease in mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.28, p. 110303, 2020.

ERGUN, B. *et al.* Determination of phenolic compounds of *Stachys Rupestris* Montbret et Aucher ex Bentham by LC-MS/MS and its biological activities. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 27, n. 2, p. 1176–1182, 2018.

EZZAT, S. M. *et al.* *In vivo* anti-inflammatory activity and UPLC-MS/MS profiling of the peels and pulps of *Cucumis melo* var. *cantalupensis* and *Cucumis melo* var. *reticulatus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 237, p. 245–254, 2019.

EZZAT, S. M. *et al.* Metabolic profile and hepatoprotective activity of the anthocyanin-rich extract of *Hibiscus sabdariffa* calyces. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, p. 12, 3172–3181, 2017.

FERRARE, K., *et al.* Increase in insulin sensitivity by the association of chicoric acid and chlorogenic acid contained in a natural chicoric acid extract (NCRAE) of chicory (*Cichorium intybus* L.) for an antidiabetic effect. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 215, p. 241-248, 2018.

FERRERES, F. *et al.* *Rumex induratus* leaves: Interesting dietary source of potential bioactive compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 16, p, 5782–5789, 2006.

FONG, S. K. *et al.* A low malic acid trait in cranberry fruit: genetics, molecular mapping, and interaction with a citric acid locus. **Tree Genetics and Genomes**, v. 17, n.4, p. 1–14, 2021.

FUEL, M. *et al.* Antioxidant and antiproliferative potential of ethanolic extracts from *Moringa oleifera*, *Tropaeolum tuberosum* and *Annona cherimola* in colorectal cancer cells. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 143, p. 112248, 2021.

- GARCIA, J. A. A. *et al.* Phytochemical profile and biological activities of “Ora-pro-nobis” leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest. **Food Chemistry**, v. 294, p. 302–308, 2019.
- GARCÍA, Y. M. *et al.* Physicochemical characterization and paper spray mass spectrometry analysis of *Myrciaria Floribunda* (H. West ex Willd.) O. Berg accessions. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7206, 2021.
- GOMES, S. M. *et al.* Biodiversity is overlooked in the diets of different social groups in Brazil. **Scientific reports**, v. 13, p. 9278, 2023.
- GULLON, B. *et al.* Bioaccessibility, changes in the antioxidant potential and colonic fermentation of date pits and apple bagasse flours obtained from co-products during simulated in vitro gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v. 78, p. 169–176, 2015.
- GÜRBÜZ, P. *et al.* Potential anti-Alzheimer effects of selected Lamiaceae plants through polypharmacology on glycogen synthase kinase-3 β , β -secretase, and casein kinase 1 δ . **Industrial Crops and Products**, v. 138, p. 111431, 2019.
- HAQ, F. U. *et al.* A high-throughput method for dereplication and assessment of metabolite distribution in *Salvia* species using LC-MS/MS. **Journal of Advanced Research**, v. 24, p. 79–90, 2020.
- HAQ, F. U. *et al.* Metabolite Profiling and Quantitation of Cucurbitacins in Cucurbitaceae Plants by Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry. **Scientific Reports**, v. 9, p. 15992, 2019.
- HIFNAWY, M. S. *et al.* Study of the hypolipidemic activity of Egyptian *Tropaeolum majus* L. (garden nasturtium) as a promising therapeutic plant for treatment of cardiac diseases. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.5, n. 6, p. 314–322, 2016.
- HIRSCHMANN, G. S.; QUISPE, C.; GONZÁLEZ, B. Phenolic profiling of the South American “baylahuen” tea (*Haplopappus* spp., Asteraceae) by HPLC-DAD-ESI-MS. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 913–928, 2015.
- HOSSAIN, M. B. *et al.* Characterization of phenolic composition in lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 19, p. 10576–10581, 2010.
- IDRIS, O. A.; WINTOLA, O. A.; AFOLAYAN, A. J. Anthelmintic potency of *Rumex crispus* L. extracts against *Caenorhabditis elegans* and non-targeted identification of the bioactive compounds. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 1, p. 541–549, 2022.
- JAKOBEK, L.; MATIĆ, P. Non-covalent dietary fiber – Polyphenol interactions and their influence on polyphenol bioaccessibility. **Trends in Food Science and Technology**, v. 83, p. 235–247, 2019.

JIMÉNEZ-ASPEE, F. *et al.* Antioxidant activity and characterization of constituents in copao fruits (*Eulychnia acida* Phil., Cactaceae) by HPLC-DAD-MS/MSn. **Food Research International**, v. 62, p. 286–298, 2014.

JOUBERT, E. *et al.* Effect of Pre-drying treatments and storage on color and phenolic composition of green honeybush (*Cyclopia subternata*) herbal tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 338–344, 2010.

KIM, H.W. *et al.* Study on phenolic compounds in lettuce samples cultivated from Korea using UPLC-DAD-QToF/MS. **The Korean Journal of Food and Nutrition**, v. 32, n. 6, p. 717–729, 2019.

KINUPP, V. F.; DE BARROS, I. B. I. Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28 n. 4, p. 846–857, 2008.

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. **Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**. 1. Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2014.

KOIKE, A. *et al.* Irradiation as a novel approach to improve quality of *Tropaeolum majus* L. flowers: Benefits in phenolic profiles and antioxidant activity. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 30, p. 138–144, 2015.

KONG, F.; SINGH, R. P. A. Human Gastric Simulator (HGS) to study food digestion in human stomach. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 9, p. 627–635, 2010.

LAM, K. Y. *et al.* A Review on Medicinal Properties of Orientin. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2016, p. 4104595, 2016.

LEAL, M. L.; ALVES, R. P.; HANAZAKI, N. Knowledge, use, and disuse of unconventional food plants. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 14, n.6, p. 1-9, 2018.

LEE, J.; SCAGEL, C. F. Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 650–656, 2009.

LEO, M. *et al.* Profiling the chemical content of *Opuntia ficus-indica* flowers by HPLC-PDA-ESI-MS and GC/EIMS analyses. **Phytochemistry Letters**, v. 3, n. 1, p. 48–52, 2010.

LIAO, S. G. *et al.* UPLC-PDA-ESI-MS/MS analysis of compounds extracted by cardiac h9c2 cell from *Polygonum orientale*. **Phytochemical Analysis**, v. 24, n. 1, p. 25–35, 2012.

LIBERAL, Â. *et al.* Chemical features and bioactivities of *Lactuca* 1546i154S154nsis L., an unconventional food plant from Brazilian cerrado. **Agriculture**, v. 11, n. 8, 734, 2021.

MA, J. *et al.* A segmental monitoring strategy based on variable wavelength detection for quality control of three Polygonaceae herbs. **Journal of Pharmaceutical and**

Biomedical Analysis, v. 62, p. 155–161, 2012.

MA, S. *et al.* Characterization and authentication of *Acori Tatarinowii* Rhizoma and its adulterants by UPLC-Orbitrap-MS/MS chromatographic fingerprints, elements profiles and chemometric methods. **Microchemical Journal**, v. 144, p. 285–295, 2019.

MAJDOUB, Y. O. E. *et al.* The digestibility of hibiscus sabdariffa L. Polyphenols using an in vitro human digestion model and evaluation of their antimicrobial activity. **Nutrients**, v. 13, n. 7, p. 2360, 2021.

MALEK, S. N. A. *et al.* Cytotoxic components of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) leaves. **Molecules**, p. 14, n. 5, p. 1713–1724, 2009.

MARIUTTI, L. R. B. *et al.* The use of alternative food sources to improve health and guarantee access and food intake. **Food Research International**, v. 149, p. 110709, 2021.

MATA, A. *et al.* Contribution to the characterization of *Opuntia* spp. Juices by LC-DAD-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 210, p. 558–565, 2016.

MÉNDEZ, D. *et al.* Chemical Fingerprinting and Antimicrobial Evaluation of the Methanolic Extract of the Leaves of the Endemic Cuban Plant *Coccoloba cowellii*. **Chemistry Proceeding**, v. 3, n. 1, p. 124, 2020.

MILIÃO, G. L. *et al.* Unconventional food plants: Nutritional aspects and perspectives for industrial applications. **Future Foods**, v. 5, p. 100124, 2022.

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

MINIGHIN, E. C. *et al.* Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the mineral content, phenolic compounds, and antioxidant capacity of commercial pulps of purple and white açai (*Euterpe oleracea* Mart.), **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n.5, p. 1740-1752, 2020.

MOREIRA, C. P. S. **Produtos Naturais Bioativos de Baccharis platypoda DC.** (Asteraceae). Fundação Oswaldo Cruz, 2014.

MOSQUERA, N. *et al.* Identification of New Betalains in Separated Betacyanin and Betaxanthin Fractions from Ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas) by HPLC-DAD-ESI-MS. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 75, n. 3, p. 434–440, 2020.

MOURA, I. O. *et al.* Chemical Characterization, Antioxidant Activity and Cytotoxicity of the Unconventional Food Plants: Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) Leaf, Major Gomes (*Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn.) and Caruru (*Amaranthus deflexus* L.) **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, p. 2407-2431, 2021.

NASCIMENTO, L. E. S., *et al.* Phytochemical profile of different anatomical parts of jambu (*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen): A comparison between hydroponic and conventional cultivation using PCA and cluster analysis. **Food Chemistry**, v. 332, p.

127393, 2020.

NEVES, B. V. *et al.* Improvement of Bioactive Compound Levels, Antioxidant Activity, and Bioaccessibility of Carotenoids from *Pereskia 156culeate* after Different Cooking Techniques. **ACS Food Science and Technology**, v. 1, n.7, p. 1285–1293, 2021.

PACHECO, M. T. *et al.* Determination by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ of phenolic compounds in Andean tubers grown in Ecuador. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 84, p. 103258, 2019.

PALAFIX-CARLOS, H.; AYALA-ZAVALA, J. F.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. **Journal of Food Science**, v.76, n.1, p. 6–15, 2011.

PARAÍSO, C. M. *et al.* Ultrasound assisted extraction of hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) bioactive compounds for application as potential functional ingredient. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n.10, p. 4667–4677, 2019.

PENG, C. H. *et al.* Hibiscus *sabdariffa* polyphenolic extract inhibits hyperglycemia, hyperlipidemia, and glycation-oxidative stress while improving insulin resistance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 18, p. 9901–9909, 2011.

PETER, S. R. *et al.* The application of HPLC ESI MS in the investigation of the flavonoids and flavonoid glycosides of a Caribbean Lamiaceae plant with potential for bioaccumulation. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 50, n. 11, p. 819–826, 2015.

PONNULAKSHMI, R. *et al.* In silico and in vivo analysis to identify the antidiabetic activity of beta sitosterol in adipose tissue of high fat diet and sucrose induced type-2 diabetic experimental rats. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 29, n. 4, p. 276–290, 2019.

RAMOS, A.L.C.C. *et al.* Evaluation of the total phenolic content, antioxidative capacity, and chemical fingerprint of *Annona crassiflora* Mart. bioaccessible molecules. **Food Research International**, v.165, p. 112514, 2023.

RIGUEIRA, G. D. J. *et al.* Atividade antioxidante e teor de fenólicos em couve-manteiga (*Brassica oleracea* l. var. *acephala*) submetida a diferentes sistemas de cultivo e métodos de preparo. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 37, n. 2, p. 3-12, 2016.

RODRÍGUEZ-MEDINA, I. C. *et al.* Direct characterization of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* using HPLC with diode array detection coupled to ESI and ion trap MS. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 20, p. 3441–3448, 2009.

RONCHETI, E. F. S. (2018). **Efeito da radiação solar e da suplementação de luz led na biossíntese de compostos bioativos em flores de capuchinha (*Tropaeolum majus* L.)**. Universidade Federal de Viçosa, 2018.

RUFINO, M. S. M., *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.

SALEM, M. A. *et al.* Optimization of an extraction solvent for angiotensin-converting enzyme inhibitors from *Hibiscus sabdariffa* L. based on its UPLC-MS/MS metabolic profiling. **Molecules**, v. 25, n. 10, p. 2307, 2020.

SANTOS, B. O. *et al.* Development and chemical characterization of pequi pericarp flour (*Caryocar brasiliense* Camb.) and effect of in vitro digestibility on the bioaccessibility of phenolic compounds. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 33, n.9, p. 1058-1068, 2022.

SARKAR, B.; KUMAR, M.; MUKHOPADHYAY, K. **A rapid method for detection and characterization of anthocyanins from Hibiscus, Ocimum and Syzygium species and evaluation of their antioxidant potential.** In: MUKHOPADHYAY, K., SACHAN, A., KUMAR, M. (eds) Applications of Biotechnology for Sustainable Development. Springer, Singapore. p. 129–137, 2017.

SAVIC, S. *et al.* Identification and photostability of N-alkylamides from *Acmella oleracea* extract. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 195, p. 113819, 2021.

SÁYAGO-AYERDI, S. G. *et al.* Bioconversion of polyphenols and organic acids by gut microbiota of predigested *Hibiscus sabdariffa* L. calyces and *Agave* (*A. tequilana* Weber) fructans assessed in a dynamic in vitro model (TIM-2) of the human colon. **Food Research International**, v. 143, p. 110301, 2021.

SERRA MOURA, H. F. *et al.* Evaluation of multielement/proximate composition and bioactive phenolics contents of unconventional edible plants from Brazil using multivariate analysis techniques. **Food Chemistry**, v. 363, n. 1, p. 129995, 2021.

SEUKEP, A. J. *et al.* *In vitro* antibacterial and antiproliferative potential of *Echinops lanceolatus* mattf. (Asteraceae) and identification of potential bioactive compounds. **Pharmaceuticals**, p. 13, n. 4, p. 59, 2020.

SHAKERI, A. *et al.* LC-ESI/LTQOrbitrap/MS/MS and GC-MS profiling of *Stachys parviflora* L. and evaluation of its biological activities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 168, p. 209–216, 2019.

SHAZLY, M. A. M. *et al.* LC-MS/MS profiling, antibiofilm, antimicrobial and bacterial growth kinetic studies of *Pluchea dioscoridis* extracts. **Acta Chromatographica**, v. 34, n. 3, p. 338–350, 2022.

SHUKURLU, E.; GÖGER, F. Investigation of chemical components from the aerial parts of *Lactuca serriola* L. by liquid chromatography – mass spectrometric method. **Plant & Fungal Research**, v. 4, n. 2, p.50–55, 2021.

SILVA, L. F. L. *et al.* Nutritional evaluation of non-conventional vegetables in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p.1775–1787, 2018.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of

total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p.152–178, 1999.

SOUZA, A. H. *et al.* Influence of harvest time on the chemical profile of *Pereskia aculeata* Mill. using Paper Spray Mass Spectrometry. **Molecules**, v. 27, p. 4276, 2022.

SOUZA, T. C. L. *et al.* Study of the bioactive potential of seven neglected and underutilized leaves consumed in Brazil. **Food Chemistry**, v. 364, p. 130350, 2021.

STEIN, R. *et al.* Chymase inhibition: A key factor in the anti-inflammatory activity of ethanolic extracts and spilanthol isolated from *Acmella oleracea*. **Journal of Ethnopharmacology**, 270, 113610, 2021.

STORCK, C. R. *et al.* Folhas, talos, cascas e sementes de vegetais: composição nutricional, aproveitamento na alimentação e análise sensorial de preparações. **Ciência Rural**, v. 43, n. 3, p. 537–543, 2013.

SUT, S. *et al.* Comparison of biostimulant treatments in *Acmella oleracea* cultivation for alkylamides production. **Plants**, v. 9, n.7, p. 818, 2020.

SVENSON, J. *et al.* Betalains in red and yellow varieties of the andean tuber crop ulluco (*Ullucus tuberosus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7730-7737, 2008.

TARDUGNO, R. *et al.* Polyphenolic profile of *Cichorium intybus* L. endemic varieties from the Veneto region of Italy. **Food Chemistry**, v. 266, p. 175–182, 2018.

TENA, N.; MARTÍN, J.; ASUERO, A. G. State of the art of anthocyanins: antioxidant activity, sources, bioavailability, and therapeutic effect in human health. **Antioxidants**, v. 9, n. 5, p. 451, 2020.

TENG, H.; CHEN, L. Polyphenols and bioavailability: an update. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 13, p. 2040-2051, 2019.

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

TIVERON, A. P. *et al.* Antioxidant activity of Brazilian vegetables and its relation with phenolic composition. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 7, p. 8943-8957, 2012.

TOMAR, M. *et al.* A clinical and computational study on anti-obesity effects of hydroxycitric acid. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 9, n. 32, p. 18578–18588, 2019.

TORRES, T. M. S. *et al.* Neuroprotective potential of extracts from leaves of *ora-pro-nobis* (*Pereskia aculeata*) recovered by clean compressed fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 179, p. 105390, 2022.

VAZ, A. A. *et al.* Physicochemical properties and bioaccessibility of phenolic

compounds of dietary fibre concentrates from vegetable by-products. **Food**, v. 11, n. 17, p. 2578, 2022.

WAHMAN, R. *et al.* Untargeted analysis of lemna minor metabolites: Workflow and prioritization strategy comparing highly confident features between different mass spectrometers. **Metabolites**, v. 11, n. 12, p. 832, 2021.

WANG, X. *et al.* Study on chemical constituents in Polygoni cuspidati folium and its preparation by UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 56, n. 5, p. 425-435, 2018.

WOJTUNIK-KULESZA, K. *et al.* Influence of in vitro digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols a non-systematic review. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1401, 2020.

WU, H.; OLIVEIRA, G.; LILA, M. A. Protein-binding approaches for improving bioaccessibility and bioavailability of anthocyanins. **Comprehensive Review in Food Science and Food Safety**, v. 22, n. 1, p. 333-354, 2023.

YANG, M. *et al.* Phenolic constituents, antioxidant and cytoprotective activities of crude extract and fractions from cultivated artichoke inflorescence. **Industrial Crops and Products**, v. 143, p. 111433, 2020.

YILDIRIM, B. A. *et al.* Antihemorrhoidal activity of organic acids of Capsella bursa-pastoris on croton oil-induced hemorrhoid in rats. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. e13343, 2020.

YOON, E. K. *et al.* Antitcoagulant and antiplatelet activities of scolymoside. **BMB Reports**, v. 48, n. 10, p. 577-582. 2015.

YOUSSEF, F. S. *et al.* Metabolomics-based profiling of Clerodendrum speciosum (Lamiaceae) leaves using LC/ESI/MS-MS and in vivo evaluation of its antioxidant activity using Caenorhabditis elegans model. **Antioxidants**, v. 11, n. 2, p. 330, 2022.

ZHANG, F. *et al.* Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Acorus tatarinowii Schott by HPLC/ESI-QTOF-MS/MS. **Biomedical Chromatography**, v. 29, n. 6, p. 890-901, 2014.

ZHANG, J. *et al.* Evaluation of sugar and organic acid composition and their levels in highbush blueberries from two regions of China. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 19, n. 9, p. 2352–2361, 2020.

ZHANG, Y. *et al.* Hydroxycitric acid inhibits kidney stone through crystallization regulation and reduction of hyperoxalate-induced lipotoxicity. **Journal of Functional Foods**, v. 105, n. 1, p. 105561. 2023.

CAPÍTULO IV – TRABALHO EXPERIMENTAL

Validação de método para análise de fenilalanina em Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC)

Validação de método para análise de fenilalanina em Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC)

Resumo: A restrição dietética de alimentos com alto teor de proteína é a principal estratégia de tratamento da fenilcetonúria, doença considerada um erro inato do metabolismo associado à fenilalanina (Phe). A alimentação destes pacientes é monótona, uma vez que é constituída na maioria das vezes, de alguns tipos de frutas e vegetais, associado ao uso de fórmulas isentas de Phe. Considerando que o Brasil é um dos países de maior biodiversidade do mundo, estudos que explorem esse potencial, com a indicação de novas opções de alimentos vegetais, como as Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC), que possam ser introduzidos regularmente na dieta de pacientes com fenilcetonúria torna-se interessante. No presente estudo, foi validado um método cromatográfico para quantificação de Phe nas PANC estudadas no presente trabalho, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE/UV). O método validado apresentou-se seletivo para o aminoácido Phe, com linearidade na faixa de 1 a 10 nmol/mL, não indicando efeito de matriz, e com recuperação, repetibilidade e precisão comprovada. Os limites de detecção e quantificação, foram de 0,0011 mg/100 g e 0,0035 mg/100 g respectivamente. Desta forma, o método validado foi utilizado para quantificar o teor de Phe em 15 amostras de PANC, sendo elas almeirão-de-árvore, azedinha, bertalha, capiçoba, capuchinha flor e folha, chuchu-de-vento, jambu, ora-pro-nóbis com espinho, ora-pro-nóbis sem espinho, peixinho, taioba folha e talo, vinagreira (sépala) e vinagreira-roxa. O teor de Phe variou de 20,28 a 235,58 mg/100 g para as amostras talo de taioba e vinagreira-roxa respectivamente. Foi observado que, os vegetais folhosos apresentaram maior teor de Phe, quando comparados com o talo da taioba (20,28 mg/100 g), com o fruto de chuchu-de-vento (32,67 mg/100 g), com a sépala da vinagreira (38,21 mg/100 g) e com a flor da capuchinha (116,24 mg/100 g). Esses dados podem elevar potencialmente à inclusão desses vegetais a dieta de fenilcetonúricos. A inclusão desses vegetais ao tratamento poderá auxiliar na diversidade alimentar e na ingestão de nutrientes, deixando-o menos monótona e mais palatável.

Palavras-chave: Alimentos vegetais. CLAE/UV. Fenilcetonúria.

1. Introdução

A restrição dietética do aminoácido essencial fenilalanina (Phe), é uma das principais estratégias de tratamento, de uma doença rara, com incidência global de 1 a cada 23.930 nascimentos, conhecida como fenilcetonúria (HILLERT *et al.*, 2020; EVANS *et al.*, 2022, GAO *et al.*, 2023).

A fenilcetonúria é provocada por um erro inato autossômico recessivo do metabolismo do aminoácido Phe, causado por variantes no gene que codifica a fenilalanina hidroxilase (PHA) (YILDIZ; SIVRI, 2019; GAO *et al.*, 2023), que normalmente é responsável por converter a fenilalanina (Phe) em tirosina (Try) (MACDONALD *et al.*, 2020). A deficiência desta enzima leva ao acúmulo de Phe no sangue e no cérebro, promovendo danos neurológicos graves e irreversíveis (EVANS *et al.*, 2020).

A fenilcetonúria é diagnosticada no nascimento com a adoção quase que universal da triagem neonatal (GAO *et al.*, 2023). No Brasil, ocorre por meio do “teste do pezinho”, que é oferecido gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e deve ser obrigatoriamente realizado em todo o território nacional (ANVISA, 2012).

Ao diagnosticar a doença o tratamento deve ser iniciado imediatamente. E além da restrição dietética de alimentos com alto teor proteico como, por exemplo, leite, carnes, ovos, nozes, cereais e gelatina, é associado ao tratamento o uso de fórmulas alimentares livres de Phe, o que deixa a dieta restrita, monótona e pouco palatável (BASSANINI *et al.*, 2019; MACDONALD *et al.*, 2020).

A fim de ampliar a oferta de produtos alimentícios *in natura* e industrializados com baixo teor de proteína passíveis de serem consumidos pelos pacientes com fenilcetonúria e para servir como guia de referência para profissionais da saúde, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) desenvolveu um painel *online* com teores de Phe (mg/100 g). Com relação aos alimentos *in natura*, para o desenvolvimento do painel, consideraram-se os alimentos pertencentes às classes de frutas e hortaliças que apresentassem teores proteicos iguais ou inferiores a 5%, totalizando, assim, apenas 74 alimentos *in natura*. O método utilizado para elaboração da tabela foi o de estimativa, onde foi considerado que 4% do teor de proteína totais presente no vegetal correspondem ao teor de Phe (ANVISA, 2023).

Diante do número limitado de alimentos *in natura* com teor de Phe quantificado pela ANVISA e considerando que o Brasil é um dos países de maior

biodiversidade do mundo, ressalta-se a importância de estudos que explorem esse potencial, com a indicação de novas opções de alimentos vegetais, como as Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC), que possam ser introduzidos regularmente a dieta de indivíduos com fenilcetonúria.

As PANC são plantas que possuem uma ou mais partes comestíveis, mas não estão disponíveis no circuito global de comercialização (KINUPP; LORENZI, 2014). Estudos indicam que em alguns casos, esses vegetais podem apresentar potencial nutricional semelhante ou até mesmo superior a alguns convencionais (KINUPP; BARROS, 2008; KINUPP; LORENZI, 2014; SILVA *et al.*, 2018; DA CUNHA *et al.*, 2020), potencializando a utilização dessas plantas, de modo a diversificar a dieta dos fenilcetonúricos.

No entanto, para que essas plantas possam vir a fazer parte da dieta dos fenilcetonúricos é essencial que informações confiáveis sobre o teor de Phe estejam acessíveis. Para isso, se faz necessário o uso de técnicas analíticas capazes de determinar o teor de Phe de forma precisa e exata. Uma forma de assegurar esses parâmetros é a utilização e aplicação de métodos validados.

Vários métodos analíticos foram desenvolvidos para determinação de aminoácidos nas últimas décadas (BUI *et al.*, 2023), entretanto a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a diferentes detectores como ultravioleta, fluorescência, fotodiodo e espectrometria de massa, é a técnica mais implementada (DAÍ *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2020; BUI *et al.*, 2023).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi validar um método cromatográfico para quantificação de Phe em matriz vegetal, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE/UV), para posterior quantificação de Phe em quinze amostras de PANC, possibilitando a verificação de alternativas vegetais para implementação em dietas para indivíduos com fenilcetonúria.

2. Material e métodos

2.1 Produtos químicos e reagentes

Os aminoácidos individuais (ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), alanina (Ala), arginina (Arg), cistina (Ci), fenilalanina (Phe), glicina (Gly), histidina

(His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), prolina (Pro), serina (Ser), tirosina (Tyr), treonina (Thr) e valina (Val), assim como o derivatizante fenilisotiocianato (PITC) e o ácido fosfórico (solução 50 %), foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Já o padrão de aminoácidos (*Amino Acid Standard H*) foi obtido da Thermo Fischer Scientific. A acetonitrila e o metanol grau HPLC foram da marca JTBaker. O ácido acético glacial, hidrogeno fosfato dissódico anidro (Na_2HPO_4) e o fenol foram adquiridos da Merck. O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) dissódico da Química Moderna. O hidróxido de sódio da Vetec e o acetado de sódio trihidratado da Biograde. A trietilamina foi adquirida da Êxodo Científica e o ácido clorídrico 37 % da Neon. A água ultrapura foi obtida do purificador de água Milli-Q marca Millipore, modelo Milli-Q Academic.

2.2 Obtenção e preparo das amostras

No período da manhã e de acordo com seu o ciclo de produção foram coletada as seguintes amostras: folhas de almeirão-de-árvore, azedinha, bertalha, capiçoba, capuchinha, jambu, peixinho, ora-pro-nóbis com espinhos, ora-pro-nóbis sem espinhos, taioba e vinagreira-roxa; fruto do chuchu-de-vento; sépala da vinagreira; flor da capuchinha e talo da taioba. A coleta procedeu no Banco de Hortaliças Não Convencionais do Campo Experimental Santa Rita da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) (Latitude 19°27'15.80"S e Longitude 44° 9'24.37"W), em Prudente Morais, Minas Gerais, Brasil, foram coletadas durante os meses de novembro de 2020 a outubro de 2021

As amostras foram herborizadas e a exsicata de cada amostra registrada e depositada no Herbário PAMG da EPAMIG. A presente pesquisa também foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número AC4BDD3.

As amostras coletadas foram secas em estufa com circulação de ar forçada (Biopar S480AD) a 35°C por 48 horas, trituradas em liquidificador (ARNO, Modelo L.S) até a obtenção de um pó fino e homogêneo (tamis 35 mesh) e armazenadas ao abrigo da luz até o momento da análise.

2.3 Classificação das amostras

Com base nos dados de composição centesimal (apresentado no capítulo II), as amostras foram agrupadas seguindo um sistema organizacional de matriz alimentar, dividido em nove setores, baseados nos teores de proteína, gordura e carboidrato proposto pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1993). De acordo com as premissas desse sistema, um método analítico validado para uma ou duas amostras de um mesmo setor deve fornecer resultados precisos para todos os alimentos pertencentes ao mesmo setor (AOAC, 1993). A Tabela 1 apresenta o agrupamento das amostras.

Tabela 1 - Agrupamento das amostras de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC), de acordo com o Triângulo de Composição de Alimentos da AOAC

| Nome popular | Nome científico | Grupo |
|----------------------------|--|-------|
| Almeirão-de-árvore | <i>Lactuca canadensis</i> L. | 7 |
| Azedinha | <i>Rumex acetosa</i> L. | 7 |
| Bertalha | <i>Basella alba</i> L. | 9 |
| Capiçoba | <i>Erechtites valerianifolius</i> (Link ex Spreng.) DC | 7 |
| Capuchinha (Flor e Folha) | <i>Tropaeolum majus</i> L. | 7 e 7 |
| Chuchu-de-vento | <i>Cyclanthera pedata</i> (L.) Schrad | 5 |
| Jambu | <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen | 7 |
| Ora-pro-nóbis com espinhos | <i>Pereskia aculeata</i> Mill. | 9 |
| Ora-pro-nóbis sem espinhos | <i>Pereskia aculeata</i> Mill. | 9 |
| Peixinho | <i>Stachys byzantina</i> K. Koch | 7 |
| Taioba (Folha e Talo) | <i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott | 8 e 5 |
| Vinagreira | <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. | 5 |
| Vinagreira-roxa | <i>Hibiscus acetosella</i> Welw. ex Hiem | 7 |

2.4 Soluções de trabalho e padrões para validação de métodos

2.4.1 Solução de ácido clorídrico 6 M com fenol

Em um balão volumétrico de 1.000 mL foi adicionado 502 mL de água ultrapura e $3,00 \pm 0,01$ g de fenol, completando o volume com ácido clorídrico 37 %. A solução foi estocada em freezer a -30°C até o momento da hidrólise das amostras.

2.4.2 Solução de acetato de sódio trihidratado 0,20 M

Dissolveu-se em água ultrapura $27,20 \pm 0,1$ g de acetato de sódio, transferiu-se para um balão volumétrico de 1.000 mL completando o volume com água ultrapura. Posteriormente a solução foi filtrada em membrana de filtração $0,45 \mu\text{M}$.

2.4.3 Solução ressecante

Adicionou-se em um balão volumétrico de 100 mL, 40 mL da solução de acetato de sódio trihidratado 0,20 M e 20 mL de trietilamina. Posteriormente o balão foi avolumando com metanol grau HPLC e a solução armazenada em temperatura ambiente. Esta solução foi utilizada na etapa de derivatização.

2.4.4 Solução derivatizante sem fenilisotiocianato (PITC)

Em um frasco de 100 mL foi adicionado 70 mL de metanol grau HPLC, 10 mL de água ultrapura e 10 mL de trietilamina. A solução foi homogeneizada e estocada a uma temperatura inferior a 10°C até o momento da derivatização.

2.4.5 Solução derivatizante com fenilisotiocianato (PITC)

Esta solução deve ser usada imediatamente após seu preparo. Desta forma, foi adicionado em um microtubo de 2 mL o volume de solução derivatizante sem PITC e o derivatizante PITC de acordo com o volume demandado. Respeitando sempre a proporção de 90 % da solução derivatizante sem PITC e 10 % do derivatizante PITC. A Tabela 2 exemplifica a forma de preparo desta solução.

Tabela 2 - Diluição para solução derivatizante com derivatizante fenilisotiocianato (PITC)

| Número de amostra | Solução derivatizante sem PITC (μL) | Derivatizante PITC (μL) | Volume total de solução (μL) |
|-------------------|--|--------------------------------------|---|
| 06 | 252 | 28 | 280 |
| 08 | 297 | 33 | 330 |
| 10 | 360 | 40 | 400 |

PITC- fenilisotiocianato

2.4.6 Solução de ácido fosfórico a 10 % (v/v)

Em um balão volumétrico de 200 mL transferiu-se 160 mL de água ultrapura, posteriormente completou-se o volume com solução de ácido fosfórico 50 %. A solução foi filtrada em membrana de filtração de 0,45 μ M e armazenada em temperatura ambiente.

2.4.7 Solução diluente

Com auxílio do ultrassom (5 min) (Ultronique, modelo Q3.0/40A) e água ultrapura dissolveu-se $0,3762 \pm 0,0003$ g de hidrogeno fosfato dissódico anidro em um béquer de 10 mL. Posteriormente, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e o volume completado com água ultrapura. A solução foi transferida para um béquer de 1000 mL contendo barra magnética e sobre agitação o pH da solução foi ajustado até 7,40 com o uso da solução de ácido fosfórico 10 %. Após foi adicionado à solução 5 mL de acetonitrila grau HPLC para posterior filtração (0,45 μ M) e estocagem a uma temperatura inferior a 10°C até o momento da derivatização.

2.4.8 Solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)

Em um balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se $0,2 \pm 0,0003$ g de EDTA, completando o volume com água ultrapura. Posteriormente a solução foi filtrada em membrana de filtração 0,45 μ M e armazenada em temperatura ambiente.

2.4.9 Solução de ácido acético 1 M

Foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL, com auxílio de uma proveta 5,75 mL de ácido acético glacial. O volume foi ajustado com água ultrapura e a solução armazenada em temperatura ambiente.

2.4.10 Solução de hidróxido de sódio 0,5 M

Dissolveu-se em água ultrapura $10,00 \pm 0,01$ g de hidróxido de sódio, transferiu-se para um balão volumétrico de 500 mL completando o volume com água ultrapura. A solução foi armazenada em temperatura ambiente.

2.4.11 Solução tampão de acetato de sódio trihidratado (Fase A)

Foi pesado $9,8518 \pm 0,0005$ g de acetato de sódio trihidratado em um béquer, dissolvido em água ultrapura e transferido para balão volumétrico de 2.000 mL. A seguir foi adicionado 800 μ L de solução de EDTA e o volume completado com água ultrapura. Esta solução foi transferida para um béquer de 2000 mL contendo barra magnética e sobre agitação o pH foi ajustado com exatidão para 6,60 com auxílio das soluções de hidróxido de sódio (0,5 M) e solução de ácido acético (1 M). Posteriormente a solução foi filtrada em membrana de filtração 0,45 μ m e armazenada em temperatura inferior a 10°C até o momento da análise.

2.4.12 Solução de ácido clorídrico 0,1 M

Em um balão volumétrico de 1.000 mL contendo água ultrapura foi adicionado 8,40 mL de ácido clorídrico 37 %. O volume final foi ajustado com água ultrapura e solução armazenada em temperatura ambiente.

2.4.13 Solução estoque de aminoácidos individuais 2,5 μ mol/mL

Com base na massa molar de cada aminoácido (Asp, Glu, Ala, Arg, Ci, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Tyr, Thr e Val), os padrões de aminoácidos foram pesados com exatidão de forma que todas as soluções ficassem na concentração final de 2,50 μ mol/mL, exceto a solução da cistina (Ci) que teve concentração final de 1,25 μ mol/mL. Desta forma, os padrões de aminoácidos foram dissolvidos individualmente em solução de HCl 0,1 M e transferidos para balões volumétricos de 50 mL. As soluções foram armazenadas a uma temperatura inferior a 10°C até o momento da análise.

2.4.14 Solução intermediária do padrão aminoácidos (Amino Acid Standard H) 250 nmol/mL

O padrão de aminoácidos *Amino Acid Standard H* é composto pelos 17 aminoácidos citados acima e amônia em HCl 0,1 M, na concentração de $2,50 \pm 0,10$ $\mu\text{mol/mL}$, exceto para cistina ($1,25 \pm 0,10$ $\mu\text{mol/mL}$). Para preparar a solução intermediária uma ampola (1 mL) do padrão foi adicionada a um balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com solução de HCl 0,1 M e a solução armazenada em freezer a -30°C até o momento da análise.

2.5 Hidrólise das amostras

As amostras foram pesadas precisamente em um papel manteiga (4 x 4 cm) e transferidas diretamente para o tubo de hidrólise. O peso de cada amostra variou em função do teor de proteína (Capítulo II) de cada amostra, ou seja, quanto maior o teor de proteína, menor foi o peso da amostra e vice-versa (Tabela 3). Desta forma, determinou-se o peso das amostras conforme a equação 1 e 2 (ITAL, 2022).

$$\text{Eq. 1: } Q = 8.100 / \% \text{ Proteína bruta da amostra}$$

$$\text{Eq. 2: } \text{Peso da amostra} = Q / 5.000$$

Tabela 3 – Peso das amostras para hidrólise

| Amostra | Teor de Proteína (g/100g)* | Peso da amostra (g) |
|----------------------------|----------------------------|---------------------|
| Almeirão-de-árvore | 13,58 | 0,1193 |
| Azedinha | 17,76 | 0,0912 |
| Bertalha | 24,19 | 0,0670 |
| Capiçoba | 17,96 | 0,0902 |
| Capuchinha - Flor | 19,27 | 0,0841 |
| Capuchinha - Folha | 21,68 | 0,0747 |
| Chuchu-de-vento | 11,46 | 0,1414 |
| Jambu | 14,17 | 0,1143 |
| Ora-pro-nóbis com espinhos | 28,37 | 0,0571 |
| Ora-pro-nóbis sem espinhos | 20,65 | 0,0785 |
| Peixinho | 14,56 | 0,1113 |
| Taioba - Folha | 22,84 | 0,0709 |
| Taioba - Talo | 5,91 | 0,2741 |
| Vinagreira | 5,55 | 0,2919 |
| Vinagreira-roxa | 14,91 | 0,1087 |

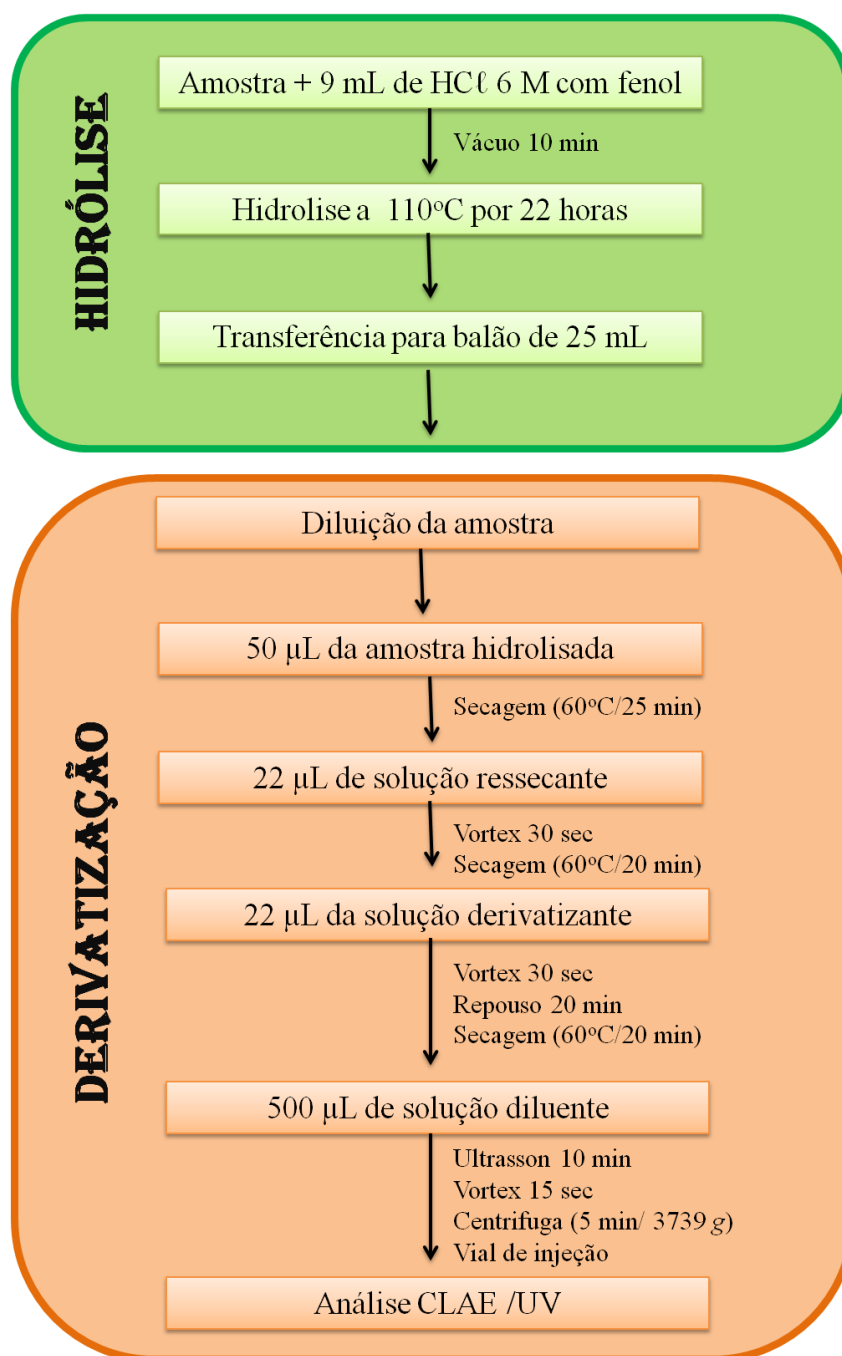
*Teor de proteína em base seca

Após a pesagem das amostras, foi adicionado ao tubo de hidrólise 9 mL da solução HCl 6 M com fenol gelado, para posterior realização do vácuo (10 minutos). Posteriormente, os tubos foram direcionados ao bloco digestor (Quimis, modelo Q327-A242) para realização da hidrólise a 110 ± 5 °C por 22 horas (WHITE; HART; FRY, 1986). Após esse período, o hidrolisado foi transferido quantitativamente para balão volumétrico de 25 mL, que foi avolumado com água ultrapura. Posteriormente realizou-se uma homogeneização vigorosa e aproximadamente, 10 mL das amostras hidrolisadas foram filtradas em membrana de 0,45 μ M e estocadas em freezer a -30°C até o momento da derivatização.

2.6 Protocolo de derivatização para soluções de aminoácidos e amostras

Para realizar a derivatização as amostras e as soluções de padrões de aminoácidos foram diluídas de acordo com cada parâmetro avaliado. Após as diluições uma alíquota de 50 μ L foi adicionada a tubo de ensaio de vidro e seca em evaporadora rotativa a vácuo (Jouan, modelo RC1010) por 25 minutos a 60°C. Em seguida, foram adicionados 22 μ L de solução ressecante ao tubo de ensaio, que foi agitado por 30 segundos em agitador de tubos (IKA, modelo MS2), para posterior secagem (20 min a 60°C). Após secagem, adicionou-se 22 μ L da solução derivatizante com PITC, agitou-se 30 segundos e deixou-se em repouso por 20 minutos. Seguindo de secagem nas mesmas condições de temperatura citadas anteriormente. Posteriormente, diluiu-se o material seco no tubo em 500 μ L de solução diluente, deixando no ultrassom por 10 minutos, para posterior agitação (15 segundos) e centrifugação (Thermo Fisher Scientific, modelo X4R Pro-MD) a 3739 g por 5 minutos. Destaca-se que nesta etapa a amostra e/ou a solução padrão é diluída 10 vezes. O material diluído, então foi transferido para o vial de injeção com auxílio de pipeta de Pasteur de vidro e encaminhado para análise cromatográfica (Figura 1).

Figura 1- Esquema de hidrólise e derivatização das amostras



Fonte: Autor (2023)

2.7 Condições cromatográficas (CLAE/UV)

O aparelho cromatográfico utilizado consiste no sistema Shimadzu CLAE (Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão) com duas bombas LC-10ADvp, um desgaseificador DGU-12AM, um injetor SIL-20A, um forno de coluna CTO-20AC, um

detector ultravioleta SPD-20A e sistema controlador SCL-10Avp, que faz a interface entre o sistema e o *software LC Solution*. O volume de injeção da amostra foi de 50 µL e a separação cromatográfica foi realizada a 50°C em uma coluna de fase reversa C18, AccQ.Tag (3,9 mm × 150 mm, tamanho de partícula de 4 µm) da Waters, com uma pré-coluna Merck de fase estacionária C18 (4 mm × 4 mm, tamanho de partícula 5 µm).

A fase móvel consistiu em tampão de acetato de sódio trihidratado (pH 6,60) (eluente A) e acetonitrila (eluente B), com fluxo de 1 mL/minuto e um tempo total de execução de 40 minutos. Um gradiente com as seguintes proporções (v/v) do solvente B foi aplicado: 0,1 - 1 min a 0 %; 1,2 - 5,2 min a 5 %; 5,6 - 8 min a 10 %; 14,3 - 15 min a 14%; 18 - 19 min a 35%; 28 min - 45 % e 35 - 40 min a 0 % (tempo de equilíbrio). A detecção das amostras derivatizadas foi conduzida a 254 nm em um sistema de detecção UV.

2.8 Parâmetros de validação

Os procedimentos de validação de método para quantificação do aminoácido fenilalanina (Phe) em amostras vegetais, foram realizados no Laboratório de Análise de Microcomponentes (LAM) da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Esse laboratório faz parte do Serviço de Química Especializada que pertence à Divisão de Vigilância Sanitária e Ambiental (DIVISA), ligada ao Instituto Octávio Magalhães (IOM). Este Instituto é o Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais (LACEN-MG), responsável por realizar as atividades referentes à Vigilância Sanitária e Epidemiológica no Estado.

Para realização dos testes de validação foram selecionadas duas amostras pertencentes ao grupo sete, conforme agrupamento apresentado na Tabela 1. Desta forma, a validação foi realizada com as amostras de almeirão-de-árvore e folha da capuchinha, que apresentam o menor e o maior teor de proteína, respectivamente, dentro do grupo sete.

O método analítico foi validado em termos de seletividade, linearidade, efeito matriz, recuperação, repetibilidade, precisão intermediária, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) de acordo com as orientações sobre validação de métodos analíticos do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (INMETRO, 2020). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software Microsoft Excel 2007.

2.8.1 *Seletividade*

Primeiramente, pipetou-se em balão volumétrico de 5 mL trezentos microlitros (300 μ L) de solução estoque de aminoácidos individuais (item 2.4.13), completando o volume com HCl 0,1 M. Posteriormente, foram analisadas individualmente as soluções dos 17 padrões de aminoácidos (Asp, Glu, Ala, Arg, Ci, Phe, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Tyr, Thr), juntamente com o branco de reagente (HCl 0,1 M derivatizado). A seletividade da Phe foi avaliada, por meio, da comparação do tempo de retenção da Phe com os outros 16 aminoácidos. Também foi avaliado o cromatograma do branco de reagente em relação à presença de picos interferentes na região que a Phe elui. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

2.8.2 *Linearidade*

A partir da solução intermediária do padrão *Amino Acid Standard H* (item 2.4.13), foi elaborada a curva de calibração, igualmente espaçada em 10 pontos (1 a 10 nmol/mL). A curva foi preparada em triplicatas independentes e analisada de forma aleatória. A aleatorização dos pontos foi realizada em Excel 2007, com a função igual a “aleatório” e classificação do menor para o maior. O branco de reagente foi preparado para controle da qualidade interna.

Para avaliar os resultados, as áreas correspondentes de cada ponto foram avaliadas como proposto por Souza; Junqueira (2005) e Souza (2007). Foram estimados os parâmetros de regressão pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), e posteriormente, foram construídos os gráficos dos resíduos da regressão, sendo os *outliers* indicados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife. Para avaliar as premissas relativas à análise de regressão foi analisada a normalidade dos dados pelo teste de Ryan & Joiner, a homoscedasticidade pelo teste de Levene modificado, independência dos resíduos da regressão pelo teste de Durbin & Watson, significância da regressão e adequação do ajuste ao modelo linear por ANOVA. Para analisar o ajuste ao modelo linear, por meio da verificação das significâncias da regressão e do desvio da linearidade foram aplicados testes de F.

2.8.3 *Efeito matriz*

Para verificar o efeito matriz, primeiramente as amostras de almeirão-de-árvore e folha da capuchinha e o branco de reagente, foram hidrolisadas conforme procedimento descrito no tópico 2.5. Posteriormente, os extratos hidrolisados das amostras foram diluídos 10 vezes, para isso, foram pipetados 1000 μL de extrato em seus respectivos balões volumétricos de 10 mL e o volume completado com a solução de HCl 0,1 M. Em seguida, foi preparada a curva matriz (10 pontos) com adição da solução intermediária do padrão *Amino Acid Standard H* ao extrato hidrolisado diluído das respectivas amostras. A curva foi preparada em triplicatas independentes e analisada de forma aleatória.

Para avaliar os resultados, as áreas correspondentes de cada ponto foram analisadas da mesma forma como descrito para linearidade (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005; SOUZA, 2007). Já para avaliar a interferência da matriz, a inclinação da curva preparada com solvente (linearidade) e da curva matrizada, foram comparadas pelo teste de t (SOUZA; JUNQUEIRA; GINN, 2005; SOUZA, 2007; SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007; BELO *et al.*, 2017).

2.8.4 Recuperação, repetibilidade e precisão intermediária

Para avaliar os parâmetros de recuperação, repetibilidade e precisão, foram preparadas e injetadas três soluções a partir da solução padrão intermediárias do padrão *Amino Acid Standard H* nas seguintes concentrações: ponto baixo 3 nmol/mL, ponto médio 6 nmol/mL e ponto alto 9 nmol/mL. Para cada ponto de concentração, foram feitas oito replicatas independentes. Também foi preparado o branco de reagente. Para simular condições de precisão intermediária, um segundo analista repetiu todo o procedimento (THOMPSON *et al.*, 2002; SOUZA, 2007).

Em relação aos resultados de recuperação, esses foram analisados quanto à presença de *outliers* pelo teste de Grubbs. Para cada nível de recuperação estudado, foram calculadas simultaneamente as estatísticas de Grubbs para um *outlier* (G_1), dois *outliers* vicinais (G_2) e dois *outliers* polares (G_3) (BURKE, 2001; SOUZA; JUNQUEIRA; GINN, 2005; SOUZA, 2007; SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007). Ao identificar ao menos um *outlier* pelas estatísticas citadas, o teste de Grubbs foi aplicado novamente, até que novos *outliers* não fossem identificados ou até que atingisse o nível máximo de exclusão, ou seja, 22 % dos dados originais (HORWITZ, 1995).

Para avaliar a inexatidão, utilizou-se a média de recuperação apresentada pelas replicatas de cada ponto estudado (baixo, médio, alto), após diagnóstico de *outliers*. O critério de aceitação utilizado foi de 80 a 110 % (INMETRO, 2020).

Para determinar a precisão sob condições de repetibilidade e precisão intermediária primeiramente os dados passaram pelos testes das premissas para análise de variância (ANOVA), avaliando a normalidade dos resíduos pelo teste de Ryan-Joiner, homoscedasticidade dos resíduos pelo teste de Levene modificado. Para posteriormente avaliar a estimativa do desvio padrão relativo (SOUZA; JUNQUEIRA; GINN, 2005; SOUZA, 2007; SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007).

2.8.5 Limite de detecção e quantificação

Para determinar o limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método proposto, primeiramente, foram estimado os limites do equipamento, a partir da curva analítica aplicando as Equações 3 e 4. Posteriormente, utilizando o procedimento de preparo de amostra, considerando a massa de amostra injetada (Equação 5 e 6).

$$\text{Equação 3: } LD = 3,3 s / b$$

$$\text{Equação 4: } LQ = 10 s / b$$

Onde: s = Desvio padrão da resposta do branco (obtido pelo desvio padrão do menor nível da curva analítica)

b = inclinação (coeficiente angular) da curva analítica

$$\text{Equação 5: } LD = 100 \times LD \text{ do equipamento} / \text{ massa injetada da amostra}$$

$$\text{Equação 6: } LQ = 100 \times LQ \text{ do equipamento} / \text{ massa injetada da amostra}$$

2.9 Quantificação de fenilalanina nas amostras

A quantificação do teor de Phe nas amostras de PANC foi realizada após o procedimento de validação. As amostras foram pesadas em triplicatas conforme apresentado na Tabela 3 e em seguida hidrolisadas com solução de HCl 6 M com fenol

a 110°C por 22 horas (item 2.5). Antes de iniciar o processo de derivatização, as amostras hidrolisadas foram diluídas quatro vezes. Para isso, em um microtubo foram pipetados 250 µL da amostra hidrolisada e 750 µL de HCl 0,1 M. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas, derivatizadas (item 2.6) e encaminhadas para análise cromatográfica (item 2.7). Como forma de controle, três pontos da curva de calibração nas seguintes concentrações 1 nmol/mL, 5 nmol/mL e 10 nmol/mL, foram preparados e analisados.

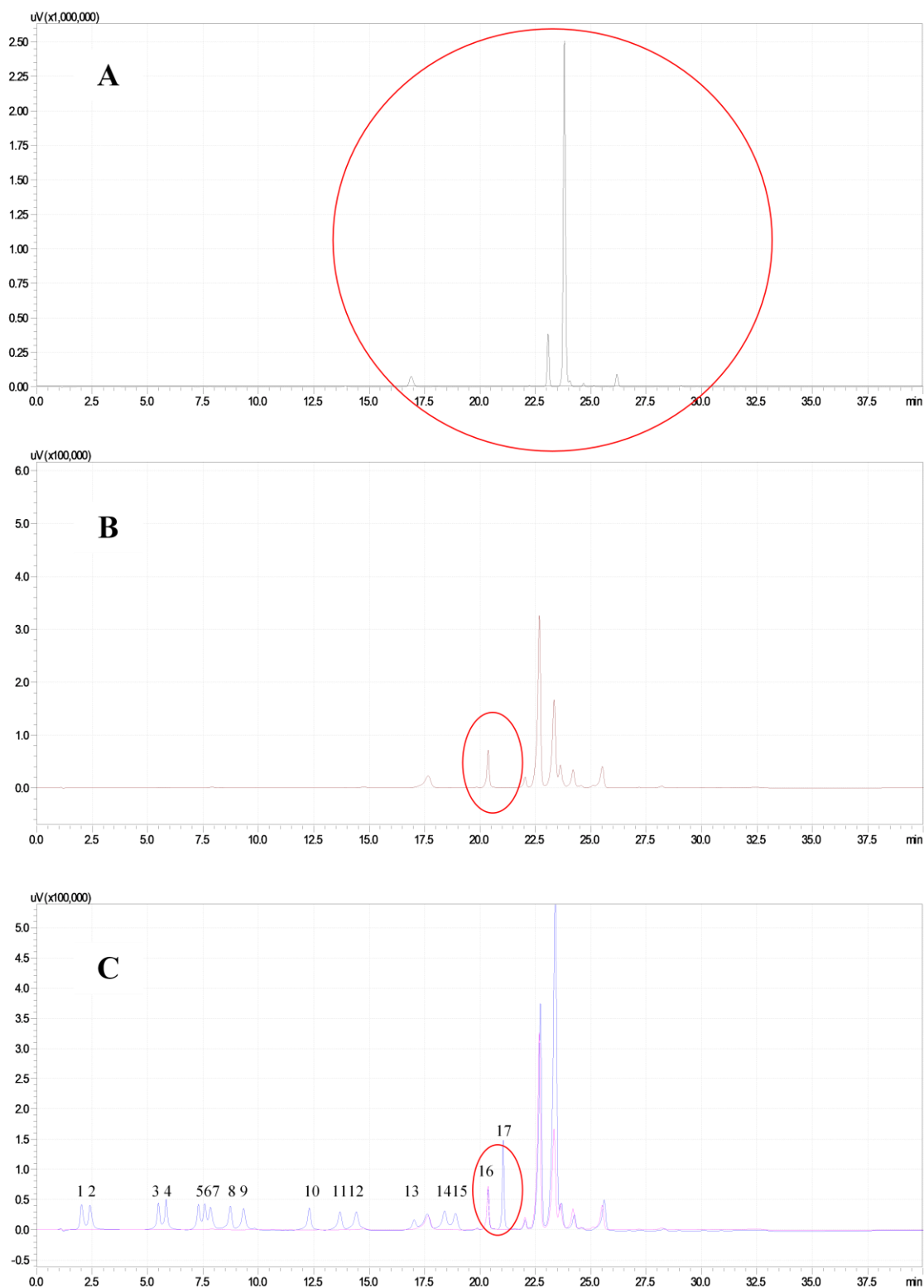
Os dados foram plotados em Excel 2007 e o teor de Phe determinado, por meio da equação da reta obtida na curva de calibração. Os resultados foram expressos em mg/100 g em base seca e úmida, sendo apresentados como média ± desvio padrão. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey a 5% de significância por meio do programa estatístico Minitab Statistical Software 21.

3. Resultados e discussão

3.1 Validação do método

3.1.1 Seletividade

A resolução cromatográfica satisfatória dos 17 aminoácidos foi alcançada usando o gradiente de eluição proposta neste estudo. A seletividade do método foi assegurada, pela comparação do tempo de retenção da Phe com os demais aminoácidos por meio, da avaliação de possíveis interferentes do branco de reagente (Figura 2). O tempo de retenção da Phe foi de 20,368 minutos, não sendo observado nenhum outro aminoácido ou pico de interferente. Desta forma, o método proposto permite a identificação seletiva do aminoácido Phe.

Figura 2 – Cromatogramas de separação de aminoácidos usando CLAE/UV

Legenda: Figura A - Amostra branco de reagente com destaque aos picos dos compostos do agente de derivatização. Figura B – Pico de fenilalanina em destaque. Figura C - Cromatograma representando a seletividade quanto à fenilalanina. 1- ácido aspártico, 2- ácido glutâmico, 3- serina, 4- glicina, 5- histidina, 6- treonina, 7- alanina, 8- arginina, 9- prolina, 10- tirosina, 11- valina, 12- metionina, 13- cistina, 14- isoleucina, 15- leucina, 16- fenilalanina, 17- lisina.

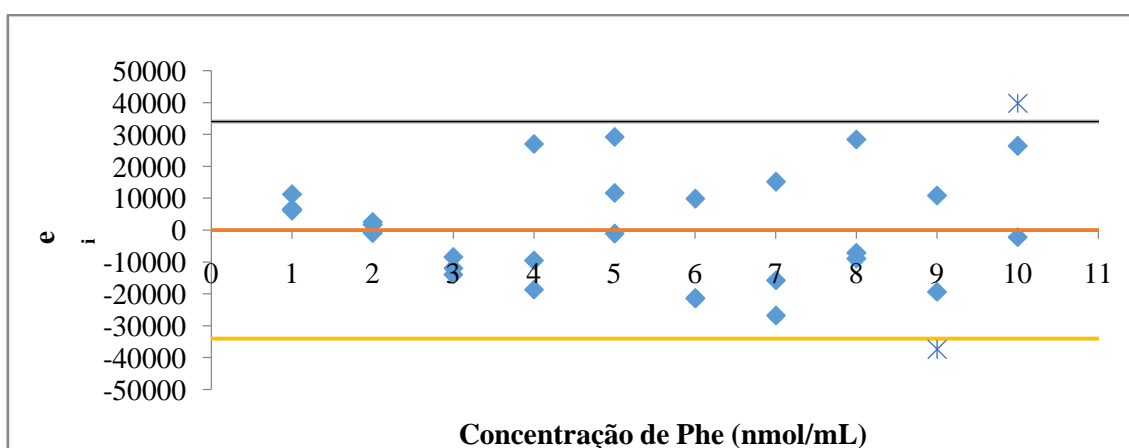
Fonte: Dados da pesquisa / Autor (2023)

3.1.2 Linearidade

Neste estudo a linearidade foi avaliada por meio da curva de calibração preparada com soluções do padrão *Amino Acid Standard H*. A curva de calibração foi construída usando a razão entre as áreas dos picos e a concentração do analito. A linearidade foi observada na faixa de 1 a 10 nmol/mL.

O modelo de regressão foi construído pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) e as premissas avaliadas. A Figura 3 apresenta o gráfico exploratório dos resíduos da regressão, indicando a presença de dois *outliers*, confirmados pelo teste de Jackknife, que indicou um no nível de 9 nmol/mL e o outro a 10 nmol/mL ($J_{ei} > J_{crítico}$).

Figura 3 – Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva de calibração de fenilalanina na faixa de 1 a 10 nmol/mL



Legenda: * = *outliers*; Phe = Fenilalanina; e_i = resíduos da regressão.

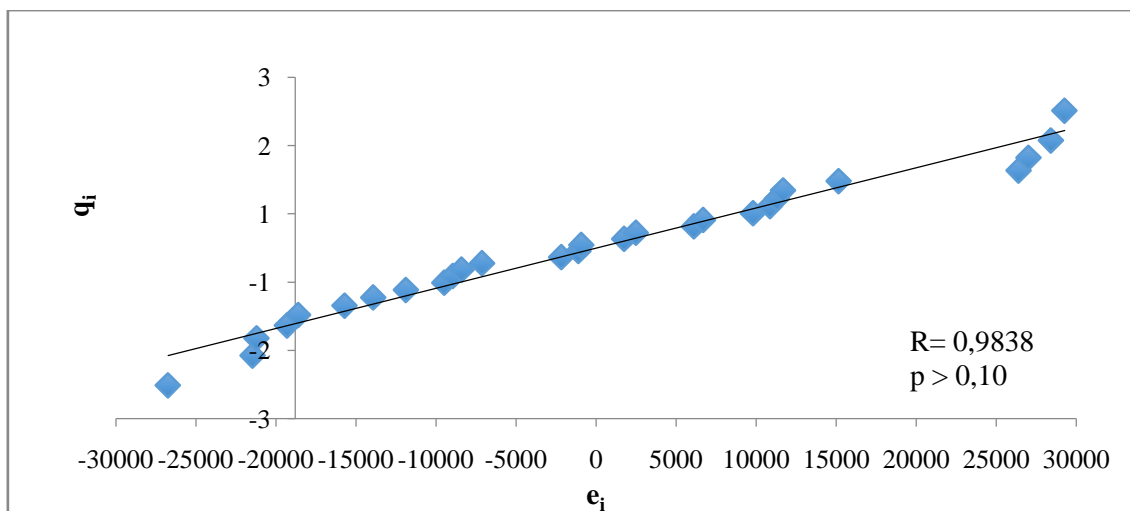
Fonte: Dados da pesquisa / Autor (2023)

Após tratamento dos *outliers*, a normalidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Ryan-Joiner. Como o coeficiente de correlação obtido (0,9838) foi superior ao $R_{crítico}$ (0,9690), conclui-se que os resíduos seguem a distribuição normal ($p > 0,10$). Na Figura 4 é possível observar o gráfico da probabilidade normal referente à curva de calibração.

A estatística de Durbin-Watson calculada foi de 2,217 ($p > 0,10$), indicando que os resíduos do modelo não são autocorrelacionados. Além disso, observou-se a independência dos resíduos (Figura 5). O teste de Levene modificado mostrou que os

resíduos da regressão são homoscedásticos, com valor estimado em 0,190 ($p > 0,05$) (Figura 6).

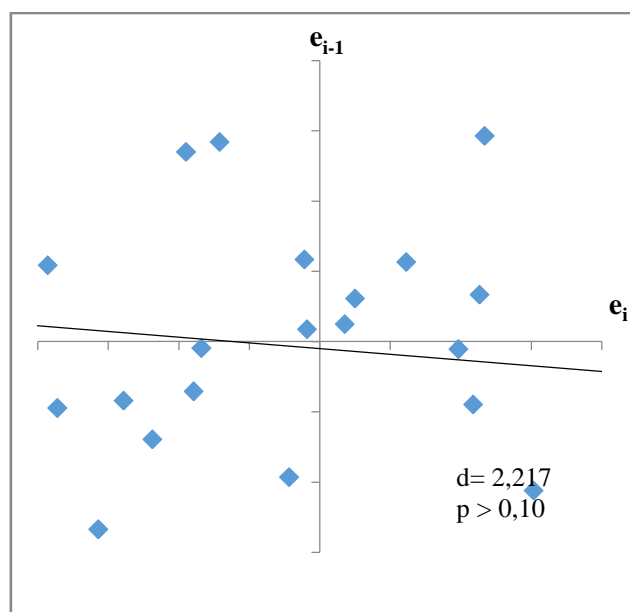
Figura 4 - Gráfico de probabilidade normal da curva de calibração de fenilalanina na faixa de 1 a 10 nmol/mL



Legenda: e_i = resíduos da regressão; q_i = valor normal esperado, R= coeficiente de correlação de Ryan-Joiner; p = significância do desvio da distribuição normal.

Fonte: Dados da pesquisa / Autor (2023)

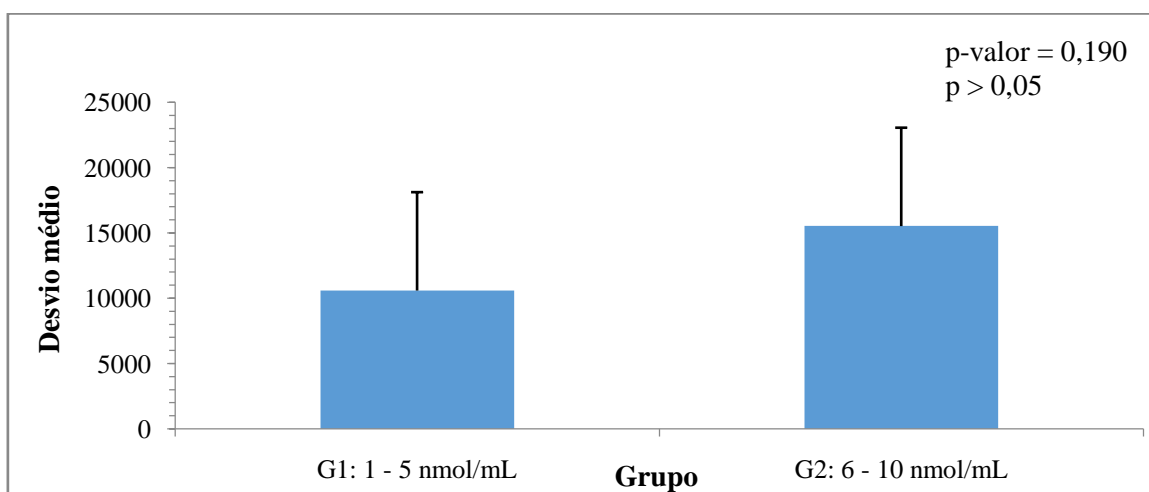
Figura 5 – Gráfico de Durbin-Watson da curva de calibração de fenilalanina na faixa de 1 a 10 nmol/mL



Legenda: e_i = resíduo da regressão; d= estatística de Durbin-Watson; p = significância.

Fonte: Dados da pesquisa / Autor (2023)

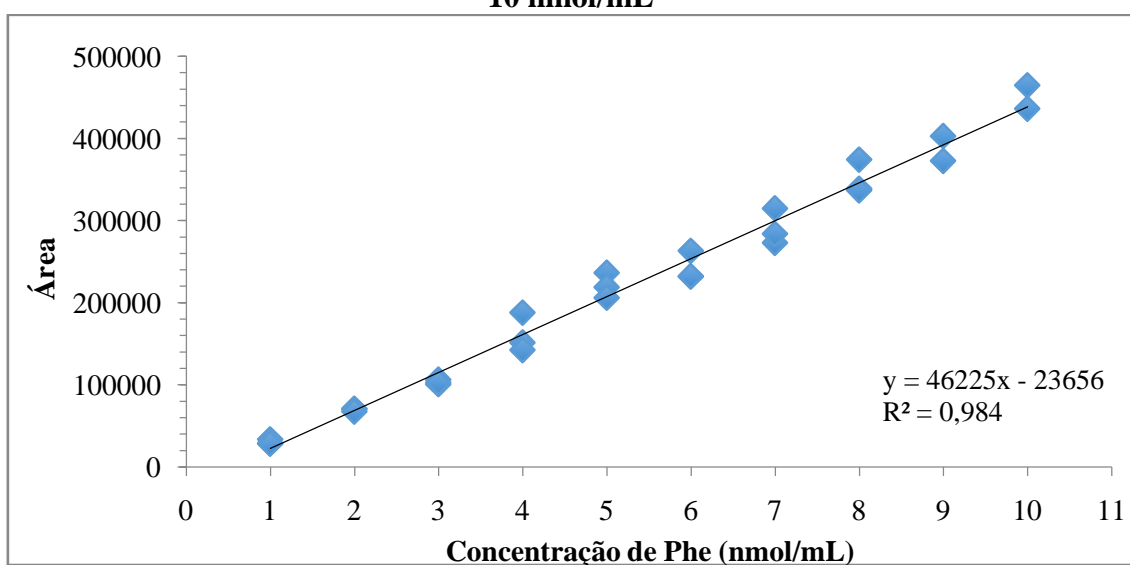
Figura 6 – Representação da homoscedasticidade das variâncias da curva de calibração de fenilalanina na faixa de 1 a 10 nmol/mL



Fonte: Dados da pesquisa / Autor (2023)

Após verificação das premissas MMQO, constatou-se que a regressão apresentou-se significativa ($p < 0,001$), com F de 1660,63 maior que o $F_{\text{crítico}}$ ($4,33 \times 10^{-25}$) enquanto que o desvio da linearidade não foi significativo ($F = 0,945$; $F_{\text{crítico}} = 5,05 \times 10^{-1}$; $p > 0,05$), indicando linearidade na faixa estudada de 1 a 10 nmol/mL. Na Figura 7, está apresentado o gráfico da curva de calibração com a respectiva equação e coeficiente de determinação.

Figura 7- Gráfico da curva de calibração de fenilalanina na faixa de 1 a 10 nmol/mL



Legenda: Phe = Fenilalanina; R^2 = Coeficiente de determinação; y = área; x = concentração

Fonte: Dados da pesquisa / Autor (2023)

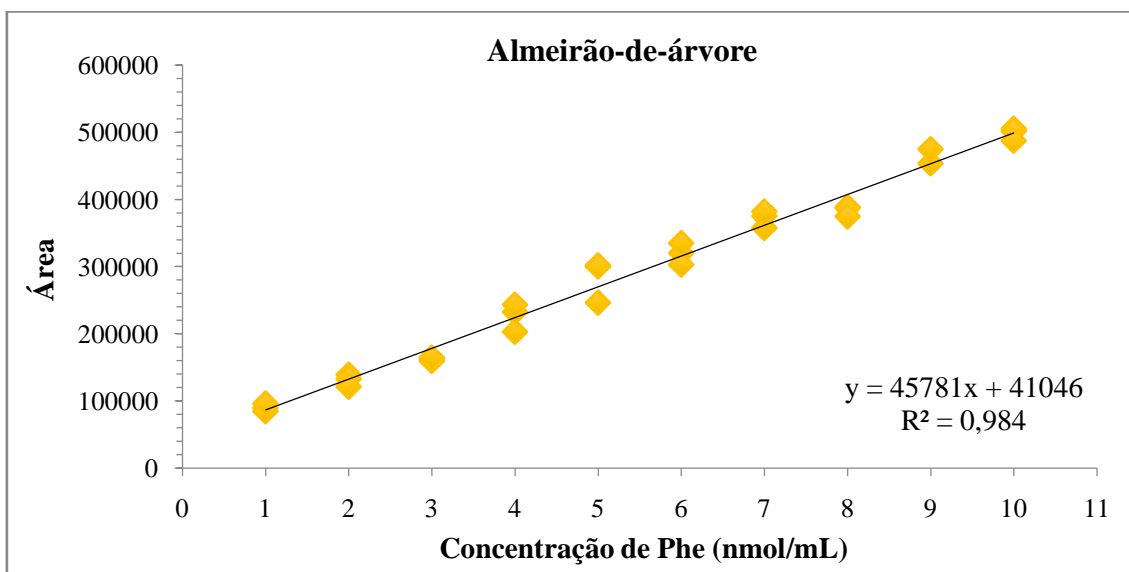
3.1.3 Efeito matriz

Para avaliar a presença de efeito de matriz na faixa linear (1 a 10 nmol/mL), as curvas matrizadas (almeirão-de-árvore e folha da capuchinha) passaram por todos os testes estatísticos realizado para a curva de calibração. Desta forma, pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, foi diagnosticado um *outlier* no nível 9 nmol/mL da curva matrizada de almeirão-de-árvore. Já na curva matrizada da folha de capuchinha, foram identificados três *outliers*, sendo eles nos níveis 8, 9 e 10 nmol/mL respectivamente. Após tratamento dos *outliers* todas as premissas relativas ao MMQO foram confirmadas para as duas curvas (Tabela 4). As curvas matrizadas com suas respectivas equações da reta e coeficiente de determinação obtidos na análise de efeito matriz estão apresentados nas Figuras 8 e 9.

Tabela 4 – Avaliação da linearidade das curvas em matriz na faixa de 1 a 10 nmol/mL

| Estatística | Curva em Matriz Almeirão-de-árvore | Curva em Matriz Folha da Capuchinha | Resultado |
|---|---|--|------------------------------|
| Normalidade dos resíduos – Teste Ryan-Joiner | | | |
| R | 0,9904 | 0,9795 | Os resíduos seguem a normal |
| R _{crítico} | 0,9629 | 0,9607 | |
| p | p > 0,10 | p > 0,10 | |
| Autocorrelação – Teste Durbin-Watson | | | |
| d | 1,765 | 2,110 | Não há autocorrelação |
| p | p > 0,10 | p > 0,10 | |
| Homoscedasticidade – Teste Levene modificado | | | |
| P _{calculado} | 0,588 | 0,5880 | Há homoscedasticidade |
| p | p > 0,05 | p > 0,05 | |
| Regressão | | | |
| F | 1655,91 | 2623,00 | A regressão é significativa |
| F _{crítico} | 9,06 x 10 ⁻²⁶ | 7,73 x 10 ⁻²⁷ | |
| p | p < 0,001 | p < 0,001 | |
| Desvio da linearidade | | | |
| F | 1,908 | 0,815 | Não há desvio da linearidade |
| F _{crítico} | 1,18 x 10 ⁻¹ | 5,99 x 10 ⁻¹ | |
| p | p > 0,05 | p > 0,05 | |

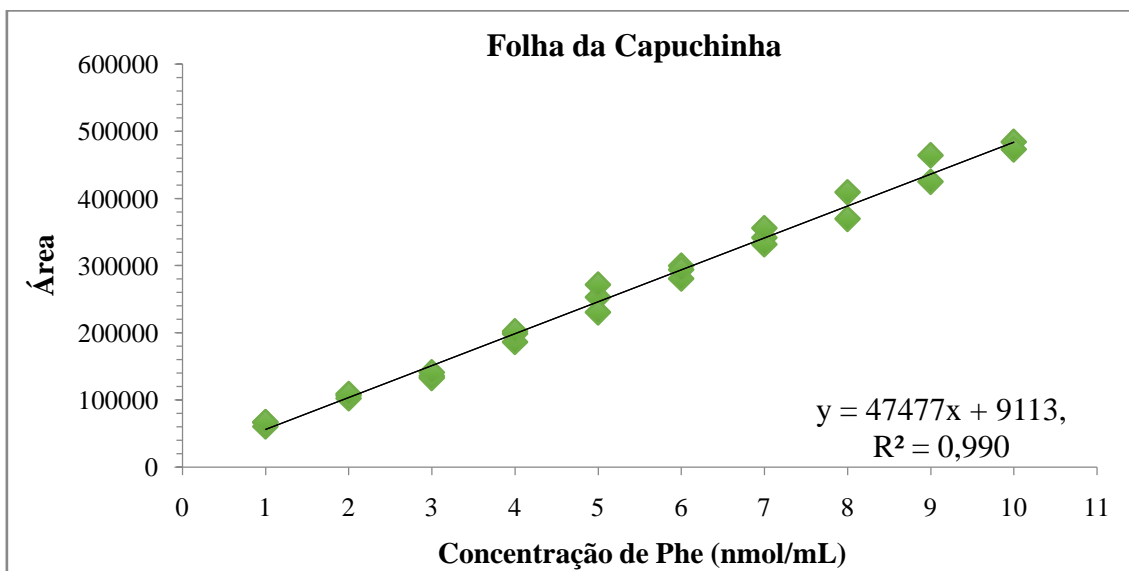
Figura 8 – Gráfico da curva de calibração de fenilalanina em matriz (almeirão-de-árvore) na faixa de 1 a 10 nmol/mL



Legenda: Phe = Fenilalanina; R^2 = Coeficiente de determinação; y= área; x= concentração

Fonte: Dados da pesquisa / Autor (2023)

Figura 9 – Gráfico da curva de calibração de fenilalanina em matriz (folha da capuchinha) na faixa de 1 a 10 nmol/mL



Legenda: Phe = Fenilalanina; R^2 = Coeficiente de determinação; y= área; x= concentração

Fonte: Dados da pesquisa / Autor (2023)

Os resultados apresentados na Tabela 4 permitiram a comparação das inclinações das curvas analíticas (solvente e matriz) pelo teste de t para avaliar o efeito matriz nas duas amostras.

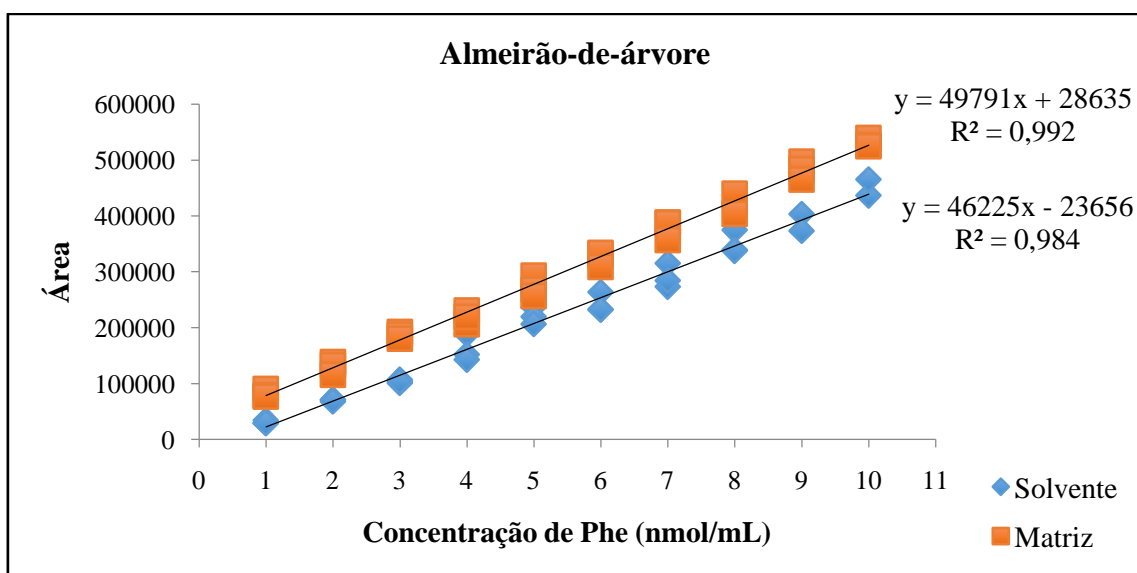
O teste de F indicou a homoscedasticidade das variâncias dos resíduos das curvas de solvente e matriz, com valor de $F_{\text{calculado}}$ e $F_{\text{crítico}}$ de 1,086 e 1,921 respectivamente, para a curva matriz de almeirão-de-árvore e de 1,555 ($F_{\text{calculado}}$) e 1,947 ($F_{\text{crítico}}$) para a curva matriz da folha da capuchinha ($p = 0,001$).

O teste de t com variâncias combinadas para avaliação dos efeitos de matriz não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) quando as inclinações da curva de solvente e matriz foram comparadas, tanto para a amostra de almeirão-de-árvore quanto para a folha da capuchinha, indicando que não há efeito de matriz (Tabela 5) (INMETRO, 2020). O que também pode ser observado graficamente pelo paralelismo aproximado das duas curvas (solvente e matriz) apresentadas nas Figuras 10 e 11.

Tabela 5 - Comparação entre as inclinações da curva em solvente e em matriz para fenilalanina na faixa de 1 a 10 nmol/mL

| Estatística | Comparação entre as inclinações | | Resultado |
|----------------------|---------------------------------|---------------------|-------------------------|
| | Almeirão-de-árvore | Folha da Capuchinha | |
| t_b | 0,278 | 0,851 | |
| $t_{\text{crítico}}$ | 2,006 | 2,008 | Não há efeito de matriz |
| p | $p > 0,05$ | $p > 0,05$ | |

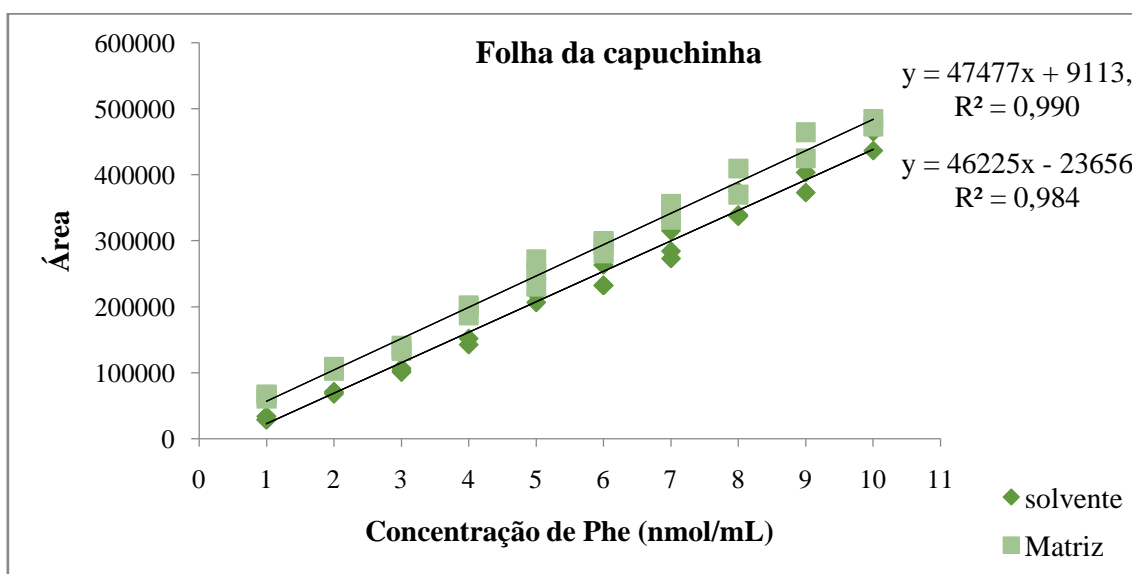
Figura 10 – Gráfico de comparação entre as inclinações da curva em solvente e em matriz (almeirão-de-árvore) para fenilalanina na faixa de 1 a 10 nmol/mL



Legenda: Phe = Fenilalanina; R^2 = Coeficiente de determinação; y = área; x = concentração

Fonte: Dados da pesquisa / Autor (2023)

Figura 11 – Gráfico de comparação entre as inclinações da curva em solvente e em matriz (folha da capuchinha) para fenilalanina na faixa de 1 a 10 nmol/mL



Legenda: Phe = Fenilalanina; R²= Coeficiente de determinação; y= área; x= concentração

Fonte: Dados da pesquisa / Autor (2023)

Como não foi observado efeito de matriz significativo para Phe em nenhuma das duas matrizes testadas, pode-se afirmar que o procedimento de preparação de amostra impactou positivamente na eliminação de interferentes da matriz, indicando que o método de preparo da amostra possa ser aplicado para diversas matrizes vegetais. Como também observado por Ford *et al.* (2023) que utilizaram o mesmo método de preparo de amostra, para analisar 73 alimentos vegetais, entre folhosas e frutas.

Diante do exposto e a não indicação do efeito de matriz, o teor de Phe das amostras de PANC pertencentes aos outros grupos, conforme o agrupamento da AOAC (AOAC, 1993) (Tabela 1), também foi determinado.

3.1.4 Recuperação, Repetibilidade e Precisão Intermediária

O teste de Grubbs não indicou a presença de *outliers* ($p > 0,05$) entre os resultados de recuperação obtidos nas 16 replicatas analisada nos três níveis de concentração avaliados para almeirão-de-árvore. Enquanto, para folha de capuchinha o teste de Grubb diagnosticou um *outliers* no nível 3 nmol/mL e um no nível 9 nmol/mL ($p > 0,05$). Os valores de G_1 , G_2 e G_3 para cada nível analisados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Valore de G_1 , G_2 e G_3 para os níveis de 3, 6 e 9 nmol/mL de fenilalanina, estudados na recuperação e precisão

| Almeirão-de- árvore | Concentração de fenilalanina (nmol/mL) | | | | | |
|------------------------|--|---------|-----------|---------|-----------|---------|
| | 3 | | 6 | | 9 | |
| n | 16 | | 16 | | 16 | |
| G | Calculado | Crítico | Calculado | Crítico | Calculado | Crítico |
| G_{1L} | 1,956 | 2,439 | 1,433 | 2,439 | 1,412 | 2,439 |
| G_{1U} | 1,933 | 2,439 | 1,934 | 2,439 | 2,071 | 2,439 |
| G_2 | 3,889 | 4,234 | 3,367 | 4,234 | 3,484 | 4,234 |
| G_{3L} | 0,324 | 0,599 | 0,207 | 0,599 | 0,203 | 0,599 |
| G_{3U} | 0,551 | 0,599 | 0,456 | 0,599 | 0,428 | 0,599 |

| Folha da Capuchinha | Concentração de fenilalanina (nmol/mL) | | | | | |
|------------------------|--|---------|-----------|---------|-----------|---------|
| | 3 | | 6 | | 9 | |
| n | 15 | | 16 | | 15 | |
| G | Calculado | Crítico | Calculado | Crítico | Calculado | Crítico |
| G_{1L} | 1,634 | 2,409 | 1,658 | 2,439 | 1,706 | 2,409 |
| G_{1U} | 1,669 | 2,409 | 1,702 | 2,439 | 2,124 | 2,409 |
| G_2 | 3,303 | 4,170 | 3,360 | 4,234 | 3,829 | 4,170 |
| G_{3L} | 0,266 | 0,618 | 0,253 | 0,599 | 0,282 | 0,618 |
| G_{3U} | 0,448 | 0,618 | 0,349 | 0,599 | 0,429 | 0,618 |

Ao observar a média de recuperação apresentada na Tabela 7 para os três níveis de estudos (baixo, médio e alto) é possível constatar que o método não é inexato nos níveis estudados, uma vez que todos os níveis atendem ao critério de 80 a 110% de recuperação (INMETRO, 2020).

Tabela 7 – Percentual de recuperação obtidas pelo analista 1 e 2 para os níveis de 3, 6 e 9 nmol/mL de fenilalanina, estudados

| Nível (nmol/mL) | Recuperação (%) | | | |
|---------------------|-----------------|------------|--------|---------------|
| | Analista 1 | Analista 2 | Média | |
| Almeirão-de-árvore | 3 | 109,58 | 109,26 | 109,42 ± 0,23 |
| | 6 | 101,59 | 103,96 | 102,77 ± 1,68 |
| | 9 | 101,93 | 100,69 | 101,31 ± 0,88 |
| Folha da Capuchinha | 3 | 103,95 | 103,43 | 103,69 ± 0,37 |
| | 6 | 103,16 | 102,37 | 102,77 ± 0,56 |
| | 9 | 101,51 | 102,91 | 102,21 ± 0,99 |

A normalidade e a homoscedasticidade dos resíduos da recuperação foram avaliadas respectivamente pelos testes de Ryan-Joiner e Levene modificado. Os resíduos apresentaram distribuição normal ($p > 0,10$) em todos os níveis do estudo, sendo homoscedásticos ($p > 0,05$), permitindo a estimativa dos desvios padrão relativos de repetitividade (DPR_r) e precisão intermediária (DPR_R) por análise de variância (Tabela 8).

Tabela 8 – Verificação das premissas de normalidade e homoscedasticidade dos resíduos para análise de variância

| | Estatística | Concentração (nmol/mL) | | |
|---------------------------|----------------------|------------------------|-------|-------|
| | | 3 | 6 | 9 |
| Normalidade | | | | |
| Almeirão-de-árvore | R | 0,988 | 0,983 | 0,965 |
| | R _{crítico} | 0,942 | 0,942 | 0,942 |
| Folha da Capuchinha | R | 0,963 | 0,988 | 0,984 |
| | R _{crítico} | 0,942 | 0,942 | 0,942 |
| Homoscedasticidade | | | | |
| Almeirão-de-árvore | F _L | 0,963 | 0,699 | 0,660 |
| | F _{crítico} | 4,066 | 4,066 | 4,066 |
| | p | 0,456 | 0,699 | 0,599 |
| Folha da Capuchinha | F _L | 0,053 | 0,353 | 0,188 |
| | F _{crítico} | 4,066 | 4,066 | 4,066 |
| | p | 0,983 | 0,789 | 0,902 |

Os valores DPR_r estimado por análise de variância foram de 22,22%; 11,11% e 7,41% para os níveis de 3, 6 e 9 nmol/mL, respectivamente. E o DPR_R foi respectivamente de 33,33%; 16,67% e 11,11% sinalizando que o método é preciso em todos os níveis estudados.

3.1.5 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção estimado foi de 0,0011 mg/100 g, enquanto que o de quantificação foi de 0,0035 mg/100 g.

3.2 Teor de fenilalanina nas amostras

Conhecer o teor de Phe dos alimentos é essencial para o manejo da dieta de pacientes com fenilcetonúria. Desta forma, o teor de Phe das 15 amostras de PANC foi determinado pelo método cromatográfico validado neste estudo e está apresentado na Tabela 9. Esses resultados podem elevar potencialmente à inclusão desses vegetais na dieta de fenilcetonúricos, melhorando a diversidade alimentar, a ingestão de nutriente e a saciedade dos pacientes.

Os dados de Phe serão discutidos considerando a base úmida, uma vez que, a tabela nacional e as tabelas internacionais de composição de alimentos que apresentam o teor de Phe trazem esses dados em base úmida. No entanto, a fim de comparação os dados em base seca também estão apresentados na Tabela 9.

O teor de Phe variou de 20,28 a 235,58 mg/100 g para as amostras talo de taioba e vinagreira-roxa respectivamente. Em geral, os vegetais folhosos apresentaram maior teor de Phe, quando comparado com o talo da taioba, o fruto de chuchu-de-vento (32,67 mg/100 g), a sépala da vinagreira (38,21 mg/100 g) e a flor da capuchinha (116,24 mg/100 g), corroborando com os achados de Weetch; MacDonald (2006) e Ford *et al.* (2023).

Considerando que o consumo de frutas e vegetais com teor de Phe abaixo de 100 mg/100 g não afeta os níveis plasmáticos de Phe em pacientes com fenilcetonúria (MINIGHIN *et al.*, 2022), 33,33% (n= 5) das amostras do presente estudo podem ser consumidas sem restrição. Essas amostras são: almeirão-de-árvore, bertalha, chuchu-de-vento, talo da taioba e sépala da vinagreira (Tabela 9). Já o consumo das demais amostras de PANC (66,67%, n= 10) dependerá da quantidade tolerada de Phe entre os indivíduos, dependendo da gravidade da fenilcetonúria de cada pessoa, a dosagem e adesão ao tratamento. De todo modo, a inclusão desses vegetais deixará a dieta menos monótona e mais palatável.

Tabela 9- Teor de fenilalanina em Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC)

| Amostra | Matéria Seca | | | Matéria Úmida | | |
|----------------------------|------------------|--------------------------------|-----------------------------------|------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| | Proteína g/100 g | Phe mg/100 g [*] | Estimativa mg/100 g ^{**} | Proteína g/100 g | Phe mg/100 g [*] | Estimativa mg/100 g ^{**} |
| Almeirão-de-árvore | 13,58 | 755,10 ± 22,64 ^{fg} | 543,20 | 1,75 | 97,43 ± 2,92 ^f | 70,00 |
| Azedinha | 17,76 | 1.191,24 ± 27,08 ^b | 710,40 | 1,68 | 112,81 ± 2,56 ^{ef} | 67,20 |
| Bertalha | 24,19 | 779,76 ± 22,69 ^{fg} | 967,60 | 2,29 | 73,97 ± 2,15 ^g | 91,60 |
| Capiçoba | 17,96 | 1.089,63 ± 4,15 ^c | 718,40 | 2,72 | 165,26 ± 0,63 ^{cd} | 108,80 |
| Capuchinha - Flor | 19,27 | 845,99 ± 18,26 ^{ef} | 770,80 | 2,65 | 116,24 ± 2,51 ^e | 106,00 |
| Capuchinha – Folha | 21,68 | 1.296,50 ± 49,78 ^a | 867,20 | 3,87 | 231,56 ± 8,89 ^a | 154,80 |
| Chuchu-de-vento | 11,46 | 683,43 ± 15,04 ^g | 458,40 | 0,55 | 32,67 ± 0,72 ^{hi} | 22,00 |
| Jambu | 14,17 | 927,22 ± 32,86 ^{de} | 566,80 | 2,34 | 153,39 ± 5,44 ^d | 93,60 |
| Ora-pro-nóbis com espinhos | 28,37 | 1.243,05 ± 66,25 ^{ab} | 1.134,80 | 4,48 | 196,44 ± 10,47 ^b | 179,20 |
| Ora-pro-nóbis sem espinhos | 20,65 | 992,30 ± 46,77 ^d | 826,00 | 3,35 | 160,98 ± 7,59 ^{cd} | 134,00 |
| Peixinho | 14,56 | 841,60 ± 13,17 ^{ef} | 582,40 | 3,94 | 227,84 ± 3,57 ^a | 157,60 |
| Taioba – Folha | 22,84 | 1.228,84 ± 48,52 ^{ab} | 913,60 | 3,20 | 172,16 ± 6,80 ^c | 128,00 |
| Taioba – Talo | 5,91 | 322,86 ± 9,60 ^h | 236,40 | 0,37 | 20,28 ± 0,60 ⁱ | 14,80 |
| Vinagreira | 5,55 | 209,32 ± 9,62 ⁱ | 222,00 | 1,01 | 38,21 ± 1,76 ^h | 40,40 |
| Vinagreira-roxa | 14,91 | 790,99 ± 21,72 ^f | 596,40 | 4,44 | 235,58 ± 6,47 ^a | 177,60 |

* Valores expressos na mesma coluna seguidos por letras diferentes indicam diferença estatística ($p \leq 5\%$). Valores médios ± desvio padrão (n=3). Phe = Fenilalanina

** Cálculo de estimativa proposto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Considera-se que 4% do teor total de proteína correspondem ao teor de Phe (ANVISA, 2023).

É possível observar que os teores de Phe das PANC do presente estudo são semelhantes a alguns vegetais convencionais, que normalmente são inseridos na alimentação dos fenilcetonúricos, como a chicória (21,60 mg/100 g), repolho (26,70 mg/100 g), alface (40,90 mg/100 g), couve-flor (90,70 mg/100 g) (WEETCH; MACDONALD, 2006), chuchu (18,00 mg/100 g), acelga (52,00 mg/100 g), brócolis (129 mg/100 g), couve (150,00 mg/100 g) e espinafre (193,00 mg/100 g) (FORD *et al.*, 2023). Esses resultados indicam que a inserção destas PANC pode ser segura, desde que observada à condição de cada paciente.

Outro ponto importante é que os dados sobre o teor de Phe dos alimentos são escassos e às vezes variam entre as tabelas de composição de alimentos (ARAÚJO *et al.*, 2017). Na prática, o método mais comum para calcular o teor de Phe em vegetais é por meio de estimativa, assumindo que 3 a 4% do teor de proteína total correspondem a Phe. Seguindo essa premissa, o Brasil criou sua própria tabela de teores de Phe em frutas e hortaliças, como já relatado anteriormente (ANVISA, 2023).

Apesar de alguns estudos demonstrarem correlações positivas e que o sistema de estimativa produz estimativas corretas e confiáveis (KIM; BOUTIN, 2015; ARAÚJO *et al.*, 2017), ao calcular o teor de Phe das amostras de PANC, assumindo que 4% da proteína total correspondem a Phe (Tabela 9), verifica-se que esses teores são subestimados, uma vez que, os teores quantificados por CLAE/UV são maiores em todas as amostras do que aos estimados. Com exceção da amostra de beralha, em que o teor estimado (91,60 mg/100 g) foi maior do que o quantificado (73,97 mg/100 g). Resultado esse, semelhante ao observado por Ford *et al.* (2023) que também constataram variações no teor quantificado e o estimado em amostras vegetais, onde verificaram a relação aminoácido/proteína de 2 a 5% para frutas e 1 a 9% para outros vegetais.

Para esses autores o método de estimativa é impreciso, pois a contribuição de aminoácidos para o conteúdo total de proteína é inconsistente entre plantas até mesmo entre plantas semelhantes, uma vez que, o padrão de aminoácidos livre e a composição da própria proteína variam em função do estágio de desenvolvimento, grau de maturação, variabilidade genética, condições ambientais e até mesmo o processamento (FORD *et al.*, 2023). Esses dados reafirmam a importância do estudo, desenvolvimento e validação de métodos analíticos que sejam capazes de quantificar com precisão o teor de Phe em alimentos vegetais.

O presente estudo trouxe dados importantes para maior divulgação e utilização das PANC por fenilcetonúricos. Além disso, ressalta-se que o preparo das amostras e o método cromatográfico utilizado no presente estudo são considerados confiáveis para análise

de Phe em matriz vegetal, podendo esse método ser aplicado em outros vegetais a fim de ampliar ainda mais a oferta de produtos a fenilcetonúricos.

4. Conclusão

O método cromatográfico proposto e validado em duas matrizes vegetais demonstrou-se adequado ao propósito de uso. A linearidade foi demonstrada por meio da comprovação das premissas da regressão linear simples na faixa de 1 a 10 nmol/mL para as curvas em solvente e em matriz. Além disso, a seletividade, recuperação, repetibilidade, precisão, limites de detecção e quantificação, foram comprovados.

Este estudo também relatou dados sobre o conteúdo de Phe em amostras de PANC, demonstrando que esses vegetais são adequados para uso na dieta de pacientes com fenilcetonúria, desde que avaliado as especificidades de cada indivíduo. A inclusão desses vegetais a dieta poderá auxiliar na diversificação da dieta deixando-a menos monótona e mais palatável.

O uso de dados precisos sobre o conteúdo de Phe permitirá que os nutricionistas calculem com precisão a sua contribuição dietética e incorpore com segurança esses vegetais nos planos dietéticos dos pacientes. No entanto, ressalta-se a necessidade da ampliação de aplicação do método em um maior número de vegetais. O que permitirá a incorporação sobre o conteúdo de Phe de uma gama mais ampla de alimentos em bancos de dados nacionais que por consequência auxiliará profissionais da saúde e pacientes com fenilcetonúria.

5. Referência bibliográfica

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Fenilalanina em alimentos**. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/alimentos/fenilalanina>>. Acesso em: 09 agosto. 2023.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Informe Técnico N° 49, de 11 de abril de 2012 - Esclarecimentos sobre a Fenilcetonúria**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/fenilalanina-em-alimentos>>. Acesso em: 14 maio. 2019.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists. A Food Matrix Organizational System Applied to Collaborative Studies. **AOAC International**, vol. 17, no. 7, p. 115–120, 1993.

ARAÚJO, A. C. M. F. *et al.* Table of Phenylalanine Content of Foods: Comparative Analysis of Data Compiled in Food Composition Tables. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 34, p 34-87, 2017.

BASSANINI, G. *et al.* Phenylketonuria diet promotes shifts in firmicutes populations. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 101, 2019.

BELO, R.F.C.; PISSINATTI, R; SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. Evaluating Matrix Effects in the Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Food: Can These Interferences Be Neglected for Isotope Dilution?. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 1488-1499, 2017.

BUI, N. K. N.; SELBERG, S.; HERODES, K.; LEITO, I. Coumarin-based derivatization reagent for LC-MS analysis of amino acids. **Talanta**, v. 252, p.123730, 2023.

BURKE S. **Missing values, outliers, robust statistics & non-parametric methods**. LC GC. 2001; 19-24.

DA CUNHA, M. A. *et al.* Urban gardening and neglected and underutilized species in Salvador, Bahia, Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 16, n. 1, p. 67, 2020.

DAI, Z.; WU, Z.; JIA, S.; WU, G. Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthaldialdehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v, 964, p. 116-127, 2014.

EVANS, S. *et al.* Efficacy of a New Low-Protein Multimedia Diet App for PKU. **Nutrients**, v. 14, n. 11, p. 2182, 2022.

EVANS, S. Uniformity of Food Protein Interpretation Amongst Dietitians for Patients with Phenylketonuria (PKU): 2020 UK National Consensus Statements. **Nutrients**, v. 12, n. 8, p. 2205, 2020.

FORD, S. *et al.* Amino Acid Analyses of Plant Foods Used in the Dietary Management of Inherited Amino Acid Disorders. **Nutrients**, v.15, p.2387, 2023.

GAO, L.; SMITH, N. KAUSHIK, D.; MILNER, S.; KONG, R. Validation and application of volumetric absorptive microsampling (VAMS) dried blood method for phenylalanine measurement in patients with phenylketonuria. **Clinical Biochemistry**, v. 116, p. 65-74, 2023.

HILLERT, A. *et al.* The Genetic Landscape and Epidemiology of Phenylketonuria. **The American Journal of Human Genetics**, v. 107, n. 2, p. 234-250, 2020.

HORWITZ W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure and Applied Chemistry**. 1995; 67: 331-43.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008 Revisão 09. Jun. 2020.

ITAL. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Procedimento Operacional Padrão. **Aminoácidos totais por derivatização pré-coluna**. Campinas, SP, 2022.

KIM, J.; BOUTIN, M. New multipliers for estimating the phenylalanine content of foods from the protein content. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 42, p. 117-119, 2015.

KINUPP, V. F.; BARROS, I. B. I. de. Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 846-857, dez. 2008.

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. **Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**. 1. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2014.

MACDONALD, A. *et al.* PKU dietary handbook to accompany PKU guidelines. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 15, n. 171, p. 1-21, 2020.

MINIGHIN, E. C. *et al.* Evaluation of the Consumption of Fruits and Vegetables by Phenylketonurics in the Metabolic Control of Phenylalanine: An Integrative Review. **Journal of Medicinal Food**, v. 25, n. 5, p. 487-494, 2022.

YILDIZ, Y.; SIVRI, H. S. Maternal phenylketonuria in Turkey: outcomes of 71 pregnancies and issues in management. **European Journal of Pediatrics**, v. 178, n. 7, p. 1005-1011, 2019.

SILVA, L. F. L. E. *et al.* Nutritional evaluation of non-conventional vegetables in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p. 1775-1787, 2018.

SOUZA, S.V.C. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2007. 296 p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 25-35, 2005.

SOUZA, S.V.C., JUNQUEIRA, R.G., GINN, R. Analysis of semicarbazide in baby food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) - In-house method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1077, p. 151-158, 2005.

SOUZA, S.V.C., PINTO, C.T.; JUNQUEIRA, R.G. In-house method validation: application in arsenic analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 241-247, 2007.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for singlelaboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 835855, 2002.

XU, W. *et al.* Analytical methods for amino acid determination in organisms. **Amino Acids**, v. 52, p. 1071-1088, 2020.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J.C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986.

WEETCH, E.; MACDONALD, A. The determination of phenylalanine content of foods suitable for phenylketonuria. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 19, p. 229-236, 2006.

Considerações finais

Os resultados apresentados para as 15 amostras de PANC avaliadas no presente estudos são promissores quanto à inserção desses vegetais a dieta de pacientes com fenilcetonúria, de modo a deixá-la menos monótona e mais palatável. Quanto à composição centesimal e o perfil de minerais das amostras observou-se teores representativos de fibras solúveis e dos minerais potássio, cálcio, magnésio e ferro. Em relação à capacidade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais, os dados apresentados são relevantes, uma vez que apresentam teores expressivos comparando-se com alguns vegetais convencionais, ressaltando a importância de uma dieta diversificada. Quanto ao perfil químico, à técnica de espectrometria de massas no modo de ionização ambiente por *paper spray* demonstrou-se eficiente na avaliação do perfil químico das amostras e de suas respectivas frações bioacessíveis, sendo possível identificar compostos de diferentes classes químicas, com destaque a classe dos flavonóides. O método validado para quantificação de fenilalanina demonstrou-se adequado ao propósito de uso, apresentando resultados precisos quanto ao conteúdo de fenilalanina nas amostras de PANC.

Apesar de o presente estudo trazer dados importantes sobre as PANC e sua inclusão na dieta de fenilcetonúricos, ressalta-se a necessidade de mais estudos que possam avaliar os fatores antinutricionais desses vegetais e avaliar a bioacessibilidade dos minerais. Assim como estudos que possam quantificar os compostos químicos identificados no estudo. Destaca-se, a importância de estudos que visem avaliar a biodisponibilidade e atividade biológica de todos os compostos químicos aqui identificados, por meio, de ensaios clínicos. Além disso, ressalta-se a necessidade da ampliação de aplicação do método validado para quantificação de fenilalanina, em um maior número de vegetais, incluindo os presentes no painel da ANVISA, a fim de auxiliar com mais eficiência profissionais da saúde e indivíduos com fenilcetonúria.

APÊNDICE A

A composição centesimal das amostras em base úmida está apresentada na tabela 1.

Tabela 1- Composição centesimal expressa em g/100g de matérias úmida das amostras de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC)

| Amostra | Análise (g/100 g) | | | | | | | |
|--------------------------|-------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|---------------|--------------|
| | Umidade | Cinzas | Lipídios | Proteína | Fibra Total | Fibra Insolúvel | Fibra Solúvel | Carboidrato* |
| Almeirão-de-árvore | 87,10 ± 0,02 | 1,49 ± 0,04 | 0,90 ± 0,06 | 1,75 ± 0,04 | 6,34 ± 0,06 | 5,57 ± 0,04 | 0,77±0,02 | 2,49 ± 0,07 |
| Azedinha | 90,53 ± 0,03 | 1,30 ± 0,02 | 0,20 ± 0,01 | 1,68 ± 0,03 | 4,73 ± 0,03 | 3,69 ± 0,02 | 1,03±0,01 | 1,57 ± 0,04 |
| Bertalha | 90,51 ± 0,02 | 2,00 ± 0,02 | 0,33 ± 0,01 | 2,29 ± 0,01 | 4,22 ± 0,05 | 3,30 ± 0,02 | 0,92±0,03 | 0,64 ± 0,03 |
| Capiçoba | 84,83 ± 0,03 | 1,99 ± 0,04 | 0,39 ± 0,01 | 2,72 ± 0,01 | 5,57 ± 0,06 | 4,52 ± 0,05 | 1,04±0,01 | 4,50 ± 0,04 |
| Capuchinha- Flor | 86,26 ± 0,02 | 1,46 ± 0,04 | 0,34 ± 0,03 | 2,65 ± 0,005 | 5,18 ± 0,02 | 4,47 ± 0,02 | 0,72 ± 0,001 | 4,11 ± 0,05 |
| Capuchinha- Folha | 82,14 ± 0,01 | 2,15 ± 0,03 | 0,95 ± 0,02 | 3,87 ± 0,04 | 6,47 ± 0,06 | 5,25 ± 0,05 | 1,22±0,01 | 4,41 ± 0,02 |
| Chuchu-de-vento- Fruto | 95,22 ± 0,02 | 0,47 ± 0,01 | 0,06 ± 0,004 | 0,55 ± 0,003 | 2,19 ± 0,08 | 1,83 ± 0,03 | 0,37±0,005 | 1,51 ± 0,02 |
| Jambu | 83,46 ± 0,02 | 2,15 ± 0,04 | 0,37 ± 0,02 | 2,34 ± 0,04 | 8,11 ± 0,08 | 7,18 ± 0,06 | 0,93±0,02 | 3,56 ± 0,04 |
| Ora-pro-nóbis c/espínhos | 84,20 ± 0,02 | 2,17 ± 0,03 | 0,43 ± 0,01 | 4,48 ± 0,01 | 8,01 ± 0,04 | 6,95 ± 0,03 | 1,07±0,01 | 0,70 ± 0,02 |
| Ora-pro-nóbis s/espínhos | 83,78 ± 0,03 | 2,66 ± 0,08 | 0,26 ± 0,01 | 3,35 ± 0,03 | 8,79 ± 0,05 | 7,99 ± 0,02 | 0,80±0,03 | 1,16 ± 0,03 |
| Peixinho | 72,93 ± 0,03 | 2,40 ± 0,08 | 0,47 ± 0,01 | 3,94 ± 0,11 | 14,29 ± 0,10 | 13,09 ± 0,06 | 1,24± 0,04 | 5,96 ± 0,03 |
| Taioba- Folha | 85,99 ± 0,02 | 1,71 ± 0,04 | 0,91 ± 0,02 | 3,20 ± 0,03 | 6,62 ± 0,07 | 6,04 ± 0,05 | 0,59±0,02 | 1,57 ± 0,02 |
| Taioba- Talo | 93,72 ± 0,02 | 0,80 ± 0,01 | 0,14 ± 0,005 | 0,37 ± 0,005 | 2,47 ± 0,09 | 2,25 ± 0,03 | 0,22 ± 0,03 | 2,51 ± 0,02 |
| Vinagreira - Sépala | 81,74 ± 0,02 | 1,18 ± 0,05 | 0,12 ± 0,01 | 1,01 ± 0,001 | 9,09 ± 0,07 | 6,67 ± 0,05 | 2,42± 0,02 | 6,86 ± 0,05 |
| Vinagreira-roxa | 70,22 ± 0,02 | 3,27 ± 0,02 | 2,46 ± 0,03 | 4,44 ± 0,06 | 13,30 ± 0,09 | 10,96 ± 0,06 | 2,34±0,03 | 6,32 ± 0,03 |

Valores médios ± desvio padrão (n=3). * Por diferença.