

EFEITO DO TAMANHO DA PARTÍCULA NA BIODISPONIBILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DURANTE A DIGESTÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE CHIA (*Salvia Hispanica*)

Renata A. Labanca

Departamento de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

E-mail: renata@bromatologiaufmg.com.br

Marie Alminger

Departamento de Biologia e Engenharia Biológica
Ciência Alimentar e Nutricional, Chalmers
University of Technology, Gotemburgo, Suécia

Palavras Chave: Tamanho da partícula

Digestão *In Vitro*; Chia (*Salvia Hispanica*);

bioacessibilidade; ômega-3; Compostos fenólicos.

RESUMO: As sementes de Chia possuem alto teor de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), fibra alimentar e compostos fenólicos considerados como promotores da saúde. Propriedades estruturais, como a integridade botânica e o tamanho das partículas, podem afetar a estabilidade, a capacidade de extração e a disponibilidade de compostos bioativos para absorção no trato gastrointestinal. O objetivo do estudo foi comparar a liberação e estimar a bioacessibilidade de PUFAs e compostos fenólicos durante a digestão *in vitro* de sementes de chia com diferentes tamanhos de partícula. A capacidade de extração de compostos fenólicos e PUFAs foi maior em farinha de chia com menor tamanho de partícula do que em amostras com maior tamanho de partícula e sementes inteiras de chia. No entanto, as sementes de chia

que foram incluídas no estudo servem como uma fonte mais rica de compostos ômega-3 e fenólicos do que as culturas de cereais tradicionais.

s

ABSTRACT: Chia seeds have a high content of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), dietary fiber, and phenolic compounds considered to have health-promoting effects. Structural properties such as botanical integrity and particle size can affect the stability, extractability, and the availability of bioactive compounds for uptake in the gastrointestinal tract. The aim of the study was to compare the release and estimate the bioaccessibility of PUFAs and phenolic compounds during *in vitro* digestion of chia seeds with different particle size. The extractability of phenolic compounds and PUFAs was higher in chia flour with smaller particle size than in samples with larger particle size and whole chia seeds. Nevertheless, chia seeds that were included in the study serve as a richer source of omega-3 and phenolic compounds than traditional cereal crops.

INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos mostraram que uma dieta balanceada, rica em frutas, vegetais e grãos, pode desempenhar um papel crucial na prevenção de doenças crônicas,

como doenças cardíacas, câncer, diabetes e doença de Alzheimer. Sugere-se que os efeitos preventivos estejam ligados à presença de fitoquímicos e fibra alimentar, e uma hipótese é que alguns fitoquímicos podem combater o estresse oxidativo no corpo ajudando a manter o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. Um desequilíbrio causado pela superprodução de oxidantes pode induzir estresse oxidativo, resultando em grandes danos às biomoléculas, tais como lipídios, DNA e proteínas (Fraga et al., 1991; Wagner et al., 1992; Willet, 1994; Willet, 1995; Temple, 2000; Vauzour, 2010).

Frutas, vegetais e cereais integrais são uma fonte rica de diferentes compostos bioativos e nos últimos anos tem havido um aumento de pesquisas para identificar compostos específicos ou elementos com potenciais efeitos na saúde. De acordo com alguns estudos, o consumo de compostos bioativos presentes nos alimentos parece ter uma associação positiva com o aumento da expressão gênica de enzimas hepáticas antioxidantes, o que resulta em uma melhora na capacidade antioxidante como um todo (Kroon & Williamson, 1999; Melo & War, 2002, Yeh & Yen, 2006; Martinello et al., 2006; Ishimoto, 2008; Matsumoto et al., 2009; Vicente, 2009).

Pode-se afirmar que enquanto o consumo de alimentos ricos em compostos bioativos tem sido apontado como um fator de proteção para doenças, o consumo de suplementos por si só ainda enfrenta problemas quanto à dosagem e efetividade. Esta é a razão pela qual tem havido um crescente interesse em comer alimentos ricos em antioxidantes naturais. A principal explicação para a diferença entre essas fontes é o efeito sinérgico do antioxidante e outros compostos bioativos presentes nos alimentos. Pode haver outros fatores que ainda não foram elucidados que dão poder à ação antioxidante (Hyson, 2002; Trombino, 2004).

É importante notar que a atividade antioxidante de um composto bioativo de uma fonte natural é influenciada por vários fatores: o país ou região em que a planta cresceu, a forma em que a amostra foi satisfeita para análise, seja em pó, extrair ou como uma fração isolada e finalmente o solvente e a técnica de extração que tem sido utilizada (Melo & War, 2002).

Atualmente, as sementes de Chia têm sido recomendadas devido ao alto teor de proteínas, lipídios, antioxidantes e fibras alimentares. Sementes de chia tem um alto conteúdo de ácidos graxos insaturados, dos quais quase 60% são ácidos graxos ômega-3. Além disso, contêm antioxidantes naturais, como fenólicos, ácido clorogênico, ácido cafeico, licopeno, betacaroteno, alfa-caroteno, luteína, quercetina e kaempferol, que protegem os ácidos graxos poliinsaturados de sofrerem auto-oxidação rápida (Bushway et al., 1981; Ayerza, 1995; Coates & Ayerza, 1996; Ayerza & Coates, 2001; Reyes-Caudillo et al., 2008).

Um estudo recente relatou que pacientes que consumiram sementes de chia apresentaram uma redução significativa no peso, no índice de massa corporal e na circunferência da cintura. O consumo de sementes de chia leva a um aumento na proporção de ácidos graxos n-3 na dieta, o que pode levar a benefícios para a saúde da população em geral. Embora chia ainda não seja um alimento bem conhecido, sua

produção global tem aumentado nos últimos anos devido às suas propriedades de saúde e crescente popularidade (Muñoz et al., 2012).

Em 2009, as sementes de Chia foram aprovadas como alimento novo pelo Parlamento Europeu e pelo Conselho Europeu, uma vez que não há evidência de efeitos adversos ou alergias causadas pelo seu consumo. Embora existam alguns estudos sobre essas sementes de chia e seus benefícios, é importante realizar mais estudos sobre sua atividade antioxidante e as características de sua oi (EFSA, 2005, Commission EU, 2009).

Embora os estudos nutricionais humanos ainda estejam sendo considerados o “padrão ouro” para investigar o destino de diferentes compostos no trato digestivo, modelos *in vitro* que simulam a digestão gastrointestinal são amplamente empregados em muitos campos das ciências alimentícias e nutricionais (Figura 1). Modelos *in vitro* apresentam certa limitação, uma vez que nem todas as condições fisiológicas podem ser simuladas, porém, as vantagens são que são relativamente baratas, rápidas e podem dar resultados reprodutíveis, permitindo a triagem de um grande número de amostras de alimentos; além disso, não possuem as considerações éticas associadas aos métodos *in vivo*. Métodos *in vitro* que simulam processos digestivos gástricos e do intestino delgado, mostraram ser ferramentas válidas para a avaliação inicial da biodisponibilidade relativa de compostos bioativos. A bioacessibilidade das principais fontes alimentares avaliadas usando um modelo modificado de digestão *in vitro* mostrou estar bem correlacionada com valores de bioacessibilidade derivados do homem (Fernández-García, Carvajal-Lérida, Pérez-Gálvez, 2009).

Vários exemplos da intervenção biotecnológica para aumentar os níveis endógenos de fitonutrientes em várias plantas de cultivo são destacados. Uma tecnologia que influenciará grandemente o futuro dos alimentos funcionais é a biotecnologia (Hasler, 2005). Um exemplo recente de culturas derivadas da biotecnologia, que têm um tremendo potencial para melhorar a saúde de milhões de pessoas em todo o mundo, inclui a soja geneticamente modificada, rica em isoflavonas. Esses grãos são geneticamente modificados para fornecer níveis aprimorados de isoflavonas que, por sua vez, podem ajudar a prevenir o câncer e, por outros, a serem cancerígenos e desreguladores endócrinos. No futuro, outros alimentos reforçados com outras substâncias nutritivas ou não nutritivas podem até mesmo ajudar a prevenir doenças crônicas, como doenças cardíacas, osteoporose ou câncer. A aceitação da biotecnologia pelos consumidores é importante para que o potencial dessa poderosa metodologia seja realizado.

O objetivo do estudo foi avaliar o impacto da moagem na bioacessibilidade de compostos fenólicos e ácidos graxos durante a digestão *in vitro* de farinhas de sementes de chia, três tamanhos diferentes de partículas. Como a moagem pode induzir oxidação lipídica, a formação de produtos de oxidação lipídica durante o armazenamento de sementes de chia moídas a diferentes temperaturas também foi medida.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação da Amostra

Sementes de chia e farinha estabilizada (três lotes diferentes, 200 g cada) foram obtidas da Jasmine S.A. Brasil. Para cada tratamento, três amostras foram produzidas separadamente, produzindo três lotes independentes. As amostras foram mantidas em sacos plásticos selados em geladeira até a análise. Após o término de cada tratamento, alíquotas das amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a determinação do teor total e estimativa da biodisponibilidade *in vitro*. Todas as outras análises foram realizadas em amostras no dia da preparação.

Tamanho de Partícula

A moagem em batelada foi realizada com 50 g de sementes de chia por 5, 30 e 60 s usando um moinho de café (150 W, Model 4041, Braun, México). Após cada etapa de moagem, o tamanho de partícula de cada amostra foi determinado usando peneiras com malha de tela padrão (1,60, 1,25, 0,73 e 0,50 mm) empilhadas uma na outra com a menor tela de malha na parte inferior e a maior na parte superior. Para cada passo de moagem, a amostra foi colocada no topo da tela e a pilha foi agitada mecanicamente durante 60 s utilizando um agitador de peneira vibratório vertical Fritsch motorizado (modelo Analysett-3, Idar-Oberstein, Alemanha). A tela que reteve as partículas foi removida e pesada, e a massa dos incrementos de tela individuais foi convertida em frações de massa da amostra total (Tabela 1).

Tratamento	Tempo	Tamanho Mesh (mm)			
		1.60-1.25	1.25-0.73	0.73-0.50	< 0.50
S.C. T. Medio	30	0	0	60%	40%
F.C. - Inteira	-	0.5%	99.5%	0	0
F.C. – T. grande	5	0	60%	20%	20%
F.C.– T. Medio	30	0	0	60%	40%
F.C.- T. pequeno	60	0	0	40%	60%
F. Farinha	-	0	70%	20%	10%

Tabela 1: Tamanho das partículas de cada amostra

DIGESTÃO IN VITRO GASTROINTESTINAL

Uma versão modificada do método de digestão padronizado descrito por Minekus et al. (2014) foi usado para a digestão gastrointestinal simulada de sementes de chia moídas. O método é estático e inclui simulação da fase oral, gástrica e do intestino delgado; os fluidos com enzimas e eletrólitos usados nas diferentes etapas .

Fase oral: Sementes de chia inteiras e moídas (3g) foram misturadas com 10 ml de SSF (Simulated Salivary Fluid) em um recipiente de plástico. Após 20 min, uma amostra (1 g) foi removida para análise de umidade e a amostra da etapa oral foi dividida em três partes e novamente pesadas em tubos de plástico com tampa de rosca de 50 mL. As amostras foram misturadas com 5 mL de solução salivar de SSF com adição de alfa-amilase e incubadas por 2 min a 37 ° C em uma placa de agitação rotativa (250 rpm) (pH 7,0).

Para simular a fase gástrica, as amostras foram misturadas com 5 mL de solução gástrica SGF (Simulated Gastric Fluid) com pepsina adicionada e o pH foi ajustado para pH 3,0 ± 0,1 com 0,1 M NaHCO₃ ou 0,1 M HCl. As amostras foram incubadas a 37 e agitadas numa placa de agitação rotativa (250 rpm). Após 60 min de incubação, o pH foi reduzido para 3,0 com HCl a 1 M e a incubação continuou durante 60 min. Para simular a fase do intestino delgado, as amostras foram misturadas com 5 mL de SIF (Simulated Intestinal Fluid) com adição de extrato biliar e o pH foi ajustado para pH 7,0 ± 0,1 com NaHCO₃ 0,1 M. As amostras foram incubadas a 37 ° C e agitadas numa placa de agitação rotativa (250 rpm) durante 2 horas e depois congeladas a -80 ° C até à extração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição de ácidos graxos foi relativamente estável durante o processo de digestão, ou seja, a porcentagem de ácidos graxos não alterou significativamente, em comparação com o perfil antes do processo de digestão. A biodisponibilidade *in vitro* de ácidos graxos (ω -3) significativamente ($p < 0.05$) aumentou de $45,1 \pm 1,5$ para $53,3 \pm 2,2\%$ dependendo do tamanho de partícula (maior - 5 s de moagem e médio - 30 s de moagem), respectivamente (tabela 2). Uma etapa de moagem adicional não aumentou mais a biodisponibilidades dos compostos fenólicos (por qualquer tratamento) ($p < 0,05$), os resultados foram $3,7 \pm 0,6$; $4,7 \pm 0,2$; $4,3 \pm 0,4$ e $3,7 \pm 0,1$ após uma segunda etapa de trituração com 5, 30, 60 s e farinha, respectivamente.

Os ácidos graxos mais abundantes no óleo das sementes de chia foram: ácido palmítico (C16: 0), ácido esteárico (C18: 0), ácido oleico (C18: 1), ácido linoleico (C18: 2) e ácido linolênico. (C18: 3) (Tabela 2). Amostras não digeridas continham 47,4 - 51,5 mg / kg (p / p) de ômega 3, o que está de acordo com relatos anteriores de 41,7 - 49,2 mg / kg (p / p) e com valores médios em torno de 49 (TAGA et al., 1984; LABANCA et al., 2017).

O teor de ácidos graxos foi relativamente estável durante o processo de digestão. A bioacessibilidade *in vitro* de ácidos graxos (ômega 3) aumentou significativamente ($p < 0,05$) de $41,7 \pm 1,5$ para $48,9 \pm 2,2\%$ para sementes de chia moídas por 5 (CL) e 30 s (CM), respectivamente. Para os outros dois tamanhos de partículas (moído 60 s [CS] e farinha estabilizada [CF]) não foi observada diferença. No entanto, todas as amostras de sementes de chia não apresentaram ômega 3 ou qualquer outro ácido graxo, indicando que não sofreram com o processo de digestão. Esta informação é muito importante, pois muitos consomem a semente sem moer.

Sementes de Chia do Brasil continham $32,1 \pm 0,2$ g óleo / 100 g, com $53,3 \pm 0,6$ g / 100 g de ácido linolênico. O ácido graxo total da farinha de chia foi $32,0 \pm 0,8$ g óleo / 100 g, com $53,7 \pm 0,7$ g / 100 g de ácido linolênico. Para chia e farinha, a porcentagem de ácidos graxos não se alterou significativamente. Os ácidos graxos (ômega-3) constituem 53% do total de ácidos graxos em sementes de chia moídas. O ácido linoléico constitui 20% do total de ácidos graxos. Além disso, o óleo de chia tem a menor quantidade de ácidos graxos saturados nutricionalmente indesejáveis e um nível mais alto de ácidos graxos monoinsaturados desejáveis.

	16:00 (%)	18:00 (%)	18:01 (%)	18:02 (%)	18:03 (%)	SAT (%)	PUFA (%)	Ω -6/ Ω -3 (ratio)
Antes da digestão	7,55 ^a	3,42 ^a	6,51 ^a	18,47 ^a	47,25 ^a	11,3 ^a	88,7 ^a	0,39 ^a
F.C. - Inteira	ND	ND	ND	ND	ND	—	—	—
F.C. – T. Grande	6,23 ^b	3,13 ^b	5,96 ^b	16,36 ^b	45,46 ^b	9,7 ^a	90,3 ^a	0,36 ^b
F.C.– T. Médio	7,04 ^a	3,38 ^a	8,19 ^b	20,66 ^c	53,29 ^c	10,8 ^a	89,2 ^a	0,39 ^a
F.C.- T. Pequeno	7,38 ^a	3,7 ^a	8,02 ^b	20,55 ^c	52,91 ^c	11,5 ^a	88,5 ^a	0,39 ^a
F. Farinha	7,83 ^a	3,44 ^a	7,17 ^a	20,65 ^c	53,63 ^c	11,7 ^a	88,3 ^a	0,39 ^a

Tabela 2: Valores médios da composição de ácidos graxos de sementes de chia em tamanhos de partículas diferentes antes e depois da digestão in vitro

Medias (de três repetições) em uma coluna dentro de um grupo com letras diferentes mostram diferença significativa na composição de ácidos graxos ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Tukey. ND = não detectado.

CONCLUSÃO

Os estudos indicam que a biodisponibilidade de ácidos graxos ω -3 e compostos fenólicos em sementes de chia é aumentada pela trituração de sementes. O melhor resultado foi obtido por com tamanho de partícula $< 0,73$ mm. No entanto, precauções precisam ser tomadas, por exemplo, a inativação da temperatura das enzimas nas sementes toda antes de moagem para evitar perdas durante o armazenamento e tratamento.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial a Marie Alminger da Chalmers University, na Suécia, quem começou esta investigação no trabalho científico e a Renata Labanca, que trabalhou no projeto e o trouxe para a UFMG. Agradecimento a CAPES, que apoiou este trabalho com sua bolsa de estudos

REFERÊNCIAS

AYERZA, R. **Oil content and fatty acid composition of Chia (*Salvia hispanica* L.) from five northwestern locations in Argentina.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v.72, p.1079–1081, 1995.

AYERZA, R. COATES, W. **Omega-3 enriched eggs: The influence of dietary α -linolenic fatty acid source on egg production and composition.** Canadian Journal Of Animal Science. Arizona, Tuscon 2001.

BUSHWAY, A. A., BELYA, P. R., & BUSHWAY, R. J. **Chia seed as a source of oil, polysaccharide, and protein.** Journal of Food Science, v.46, p.1349–1356, 1981.

COATES, W., & AYERZA (H), R. **Production potential of chia in north-western Argentina.** Industrial Crop Production, 5, p.229 e 233, 1996.

COMMISSION EU. **Commission Decision of 13 October 2009 authorizing the placing on the market of Chia seed (*Salvia hispanica*) as novel food ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council** (OJ L 294, 11.11.2009, p. 14).

EFSA (European Food Safety Authority), 2005. **Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the safety of Chia (*Salvia hispanica* L.) seed and ground whole Chia seed as a novel food ingredient intended for use in bread** (Request N° EFSA-Q-2005-059) (adopted on 5 October 2005). *The EFSA Journal* 278: 1-12.

FERNÁNDEZ-GARCÍA E., CARVAJAL-LÉRIDA I., PÉREZ-GÁLVEZ A. In vitro ioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutr Res* 2009; 29: 751-60.

FRAGA, C. G.; MOTCHNIK, P. A.; SHIGENAGA, M. K.; HELBOCK, H. J.; JACOB, R. A.; AMES, B. N. **Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, p.11003-11006, 1991.

HASLER, C.M., (Ed.). **Regulation of functional foods and nutraceuticals.** 1st. ed. Iowa: Blackwell, 2005. 411p.

HYSON, D. **The health benefits of fruits and vegetables: a scientific overview for health professionals.** Wilmington, DE: Produce for Better Health Foundation, 20p., 2002.

ISHIMOTO EY. **Atividade antioxidante *in vitro* em vinhos e sucos de uva.** São Paulo, 2008. [Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo/USP].

KROON, P.A.; WILLIAMSON, G. **Hydroxycinnamates in plant and food: current and future perspectives.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 79, n. 3, p. 355-361, 1999.

LABANCA, R. A.; SVELANDER, C.; ELIASSON, L.; ARAÚJO, R.L.B.; AHRNÉ, L.; ALMINGER, M. Supercritical carbon dioxide extraction and conventional extraction of chia seed oils: chemical composition and lipid oxidation. *International Journal of Research*, v. 4, n.10, p. 563-572, 2017.

MARTINELLO F, SOARES SM, FRANCO JJ, SANTOS AC, SUGOHARA A, GARCIA SB, CURTI C,UYEMURA AS. **Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L.pulp fruit extract in hypercholesterolemia hamsters.** *Food Chem Toxicol*, 44:810-18, 2006.

MATSUMOTO RLT, BASTOS DHM. **Effects of Mateé Tea (*Ilex paraguariensis*) Ingestion on mRNA Expression of Antioxidant Enzymes, Lipid Peroxidation, and Total Antioxidant Status in Healthy Young Women.** *J Agric Food Chem*;57:1775-80, 2009.

MELO, E.A.; GUERRA; N.B. **Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos.** *Bol. SBCTA*, Campinas, v. 36, n. 1, p. 1-11, jan-jun., 2002.

MINEKUS, M., ALMINGER, M., ALVITO, P., BALLANCE, S., BOHN, T., BOURLIEU, C., ... BRODKORB, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus.

- MUÑOZ, L. A.; COBOS, A.; DIAZ, O.; AGUILERA, J. M. **Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and e hydration.** *Journal of Food Engineering*, v. 108, p. 216 – 224, 2012.
- TAGA, M.S., MILLER, E.E., PRATT, D.E. **Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants.** *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61, 928–931, 1984.
- TEMPLE, N. J. **Antioxidants and disease: More questions than answers.** *Nutr. Res*, 20, p. 449-459, 2000.
- TROMBINO, S. **Acid in isolated membranes and intact cells: synergistic interactions with β -tocopherol β -carotene and ascorbic acid.** *J. Agric. Food Chem.*, v.52, n.8, p.2411-2420, 2004.
- VICENTE S.J.V. **Caracterização antioxidante do café (*Coffea Arabica*, L) e efeitos da sua administração oral em ratos.** São Paulo, 2009. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo/USP].
- VAUZOUR, David; RODRIGUEZ-MATEOS, Ana; CORONA, Giulia; CONCHA-ORUNA, Maria José; SPENCER, Jeremy P.E. **Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action.** *Nutrients*, 2, 1106-1131, 2010.
- WAGNER, J. R.; HU, C.; AMES, B. N. **Endogenous oxidative damage of deoxycytidine in DNA.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, p. 3380-3384, 1992.
- WILLET, W. C. **Diet and Health: what should we eat.** *Science*, 254, 532-537, 1994.
- WILLET, W. C. **Diet, Nutrition, and avoidable cancer.** *Environ. Health Perspect.*, v.103 (suppl 8), p. 165-170, 1995.
- YEH CT, YEN GC. **Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multi-drug resistance-associated to protein 3 mRNA expressions.** *Journal Nut*;136:11-5, 1996.