

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

MARISTELA ALVES ALCÂNTARA

CHIA (*SALVIA HISPANICA* L.): POTENCIAL ANTIOXIDANTE,
NUTRICIONAL E FUNCIONAL

JOÃO PESSOA - PB

2016

Maristela Alves Alcântara

Chia (*Salvia hispanica* L.): potencial antioxidante, nutricional e
funcional

João Pessoa - PB

2016

Maristela Alves Alcântara

Chia (*Salvia hispanica* L.): potencial antioxidante, nutricional e
funcional

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Centro de Tecnologia, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro
Co-Orientador: Prof^o. Dr. Antonio Gouveia de Souza

João Pessoa - PB
2016

A347c Alcântara, Maristela Alves.
Chia (*Salvia hispanica* L.): potencial antioxidante,
nutricional e funcional / Maristela Alves Alcântara.- João
Pessoa, 2016.
143f. : il.
Orientadora: Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro
Coorientador: Antonio Gouveia de Souza
Tese (Doutorado) - UFPB/CT
1. Tecnologia de alimentos. 2. *Salvia hispanica* L.
3. Propriedades funcionais - ácido α -linolênico. 4. Óleo
microencapsulada.

UFPB/BC

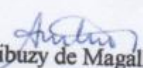
CDU: 664(043)

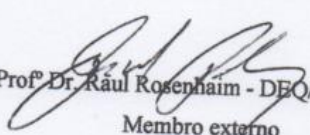
MARISTELA ALVES ALCÂNTARA

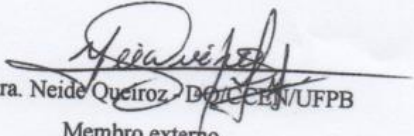
Chia (*Salvia hispanica* L.): potencial antioxidante, nutricional e
funcional

Tese aprovada em 20 de junho de 2016.

BANCA EXAMINADORA


Profª Dra. Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro- DTA/CTDR/UFPB
Coordenadora da Banca Examinadora


Profº Dr. Raul Rosenhaim - DEQ/CT/UFPB
Membro externo


Profª Dra. Neide Queiroz - DEQ/CT/UFPB
Membro externo


Profª Dra. Marta Maria da Conceição - PPGCTA/CT/UFPB
Membro interno


Profª Dra. Rita de Cassia Ramos do Egypto Queiroga - PPGCTA/CT/UFPB
Membro interno

Dedico:

*À minha família, minha mãe Rosineide, meu pai Mário (in memoriam), meu marido Anderson. Sem
você não seria possível alcançar esta vitória.*

*À minha orientadora Angela Tribuzy e coorientador Antônio Gouveia, pela confiança e ensinamentos
para minha formação pessoal e profissional.*

Agradecimentos

A Deus agradeço por tudo! A ele toda honra e toda glória.

Ao meu esposo e coach, Anderson Alcântara, pelo amor, incentivo e compreensão.

A toda minha família, especialmente meu pai que esperava ansiosamente por este momento, mas que Deus o levou e a mim só cabe compreender os propósitos do Senhor, a minha mãe, irmãos e sogra, pelos cuidados e presença constante na minha caminhada.

A Prof.^a Angela, orientadora, amiga e segunda mãe, pela dedicação, pelos ensinamentos, pelo incentivo nos momentos de desânimo, por tornar possível a realização deste trabalho, por tudo. Uma pessoa especial e iluminada.

Ao meu co-orientador, Prof.^o Antônio Gouveia, pela confiança e apoio, por ter recebido a mim e meu esposo como filhos.

Aos meus amigos de trabalho, Isabelle e Bruno, pela amizade, solidariedade, momentos alegres, difíceis, de tensão e de labuta no laboratório, pelas trocas de experiências, e nossas brincadeiras.

Aos amigos de mestrado e doutorado Kauanne, Vânia, Vilma, Edilza pelas sugestões e parcerias de pesquisa.

Aos amigos de iniciação científica Jayme boy, Érica, Ismael e Elizabeth, pela atenção, carinho e pelos bons momentos de convivência.

A Prof.^a Ana Braga, pela orientação e apoio financeiro na realização do trabalho de microencapsulação.

A Embrapa- RJ, em especial as pesquisadoras Renata Tonon, Ana Iraíde, Melícia Cíntia e aos técnicos Sérgio Macedo “Filé”, Mariana Mattos e Luís Fernando, pelas contribuições na realização do trabalho de microencapsulação.

A Hildinha, pelo acolhimento, atenção e guia turística no Rio de Janeiro.

Ao casal Raul & Evaneide pela alegria de tê-los como amigos, pelos cafés, por todas as contribuições e, sobretudo pelos bons momentos de convivência.

Aos amigos do Iacom Iago, Dona Jô, Rebeca, Joana, Grazi, Marco Aurélio, Marcos Pequeno, Suame, Ielena, Pedro, Tiago, Raquel, João, Arnáira, Laís, Suellen, Denise, Juliana, Gracy, Luzia, Cleibson, Clediana, Ana Flávia, Alex, Ana Rita, Hebert, pelo agradável convívio.

Aos professores e técnicos que fazem parte do PPGCTA e do LACOM, em especial as Prof.^{as} Marta Suely, Rita de Cássia, Marta Maria, Nataly Albuquerque, Ieda García, Carlos Alberto e aos técnicos Evaneide e Lúcia pelas contribuições diversas.

A Capes pela bolsa concedida.

MUITO OBRIGADA!

“Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei”

Salmo 91

RESUMO

Os alimentos funcionais são destaque para a promoção de efeitos benéficos a saúde. Entre eles, a semente de chia (*Salvia hispanica* L.) é uma fonte natural de ácidos graxos poli-insaturados, com altos teores de ácido α -linolênico, além de outros componentes nutricionais importantes, tais como vitaminas, minerais e antioxidantes. Considerando o interesse crescente do uso de chia na dieta humana pelos benefícios a saúde relatados na literatura, o presente trabalho determinou as características físico-químicas do óleo e a composição de nutrientes de sementes de chia cultivadas no Brasil, investigou os componentes fenólicos presentes na semente, bem como desenvolveu uma microcápsula contendo óleo de chia. Uma revisão foi elaborada abordando os principais componentes: lipídios, proteínas, fibras e compostos fenólicos, com ênfase aos benefícios das propriedades funcionais da semente de chia sobre a saúde humana e na elaboração de produtos alimentares. A caracterização das sementes de chia cultivadas no Brasil revelou quantidades consideráveis de proteína (25,03 g/100g), lipídios (34,41 g/100g) e fibras (36,50 g/100g), além de quantidades elevadas de aminoácidos essenciais e minerais nutricionalmente importantes como cálcio, potássio, zinco e selênio. O perfil de ácidos graxos do óleo revelou um elevado grau de insaturação, composto pelos ácidos oleico, linoleico e, predominantemente, pelo ácido α -linolênico (65,61 g/100g). O óleo apresentou um elevado teor de tocoferóis (586,78 μ g/g), com o isômero γ -tocoferol representando mais de 90% de todos os isômeros e compostos fenólicos como miricetina, quercetina, campferol e ácido sináptico. O potencial antioxidante das sementes desengorduradas foi determinado a partir de um delineamento estatístico de mistura, modelo *simplex lattice*, de modo a produzir o extrato seco com maior conteúdo de fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante, aplicando os ensaios de captura do radical livre DPPH[•] e poder redutor do ferro (FRAP), assim como, identificando e quantificando por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) os ácidos fenólicos e flavonoides. A polaridade dos solventes e suas misturas influenciaram fortemente a extração, onde misturas de solventes moderadamente polares como acetona-água e etanol-água foram altamente eficientes. O perfil fenólico dos extratos mostrou que os ácidos sináptico, cafeico, salicílico, protocatequímico, hidroxibenzoico, gentísico e os flavonoides, miricetina, quercetina e campferol são os compostos majoritários responsáveis pela elevada atividade antioxidante. A adição de compostos antioxidantes, presentes naturalmente nas sementes de chia, e a combinação destes como α -tocoferol e miricetina, proporcionou estabilidade oxidativa ao óleo de chia quando avaliado por método acelerado. Como forma de proteção para o óleo de chia foi avaliada a técnica de *spray-dry*, assim como a influência no emprego de homogeneizadores do tipo rotor-estator e ultrassom, na formação das emulsões e propriedades das microcápsulas. A utilização da tecnologia de microencapsulação apresentou resultados de porcentagem de óleo encapsulado (28,76%) e eficiência de encapsulação (96%), similarmente à micropartículas comerciais, e mostrou-se eficiente em conservar o perfil de ácidos graxos da matriz oleaginosa e elevou o tempo de estabilidade do óleo in natura de 0,6 horas para 8,2 horas o óleo microencapsulado, sobretudo quando utilizado o ultrassom. As informações nutricionais relatadas neste estudo ilustram os possíveis benefícios que a semente de chia pode promover à saúde humana, além de mostrar o potencial uso em aplicações industriais.

Palavras-chave: *Salvia hispanica* L.; propriedades_nutricionais; propriedades_funcionais ácido α -linolênico; óleo_microencapsulado.

ABSTRACT

Functional foods are highlighted for promoting beneficial effects on human health. Among them, chia seed (*Salvia hispanica* L.) is a natural source of polyunsaturated fatty acids, with high levels of α -linolenic acid, and other important nutritional components, such as vitamins, minerals and antioxidants. Considering the growing interest in the use of chia in human diet and its many benefits reported in the literature, this study determined the physicochemical characteristics and nutritional properties of chia seed grown in southern Brazil. It also investigated the phenolic compounds present in the seed and developed a microcapsule containing chia oil. A review was prepared addressing the main components: lipids, proteins, fibers and phenolic compounds, emphasizing the benefits of the functional properties of chia seed on human health and in the preparation of food products. The characterization of chia seeds grown in Brazil revealed considerable amounts of protein (25,03 g /100 g), lipids (34,41 g /100 g) and fibers (36,50 g/100 g), as well high amounts of essential amino acids and nutritionally important minerals, such as calcium, potassium, zinc and selenium. The fatty acid profile of chia oil revealed a high degree of unsaturation, consisting of oleic, linoleic and, predominantly, α -linolenic acids (65,61 g/100 g). The chia oil showed a high tocopherol content (586,78 mg/g), with γ -tocopherol isomer representing more than 90% of all isomers and phenolic compounds such as myricetin, quercetin, and kaempferol and gallic acid. The efficiency of the extraction of phenolic compounds from seeds of chia was determined utilizing the statistical tool of mixture planning, simplex-lattice design. The solvents used were acetone, ethanol and water, and the responses analyzed were total phenolic content (TPC), antioxidant activity by the capture of the free radical DPPH $\cdot$ and ferric reduction ability (FRAP). The polarity of the solvents and their mixture strongly influenced the extraction, in which moderately polar mixtures such as acetone-water and ethanol-water were highly efficient to extract the antioxidant phenolic compounds. The phenolic profile of the extracts showed that gallic, caffeic, salicylic, protocatechuic, hydroxybenzoic and gentisic acids, as well flavonoids, myricetin, quercetin and kaempferol are the major compounds responsible for high antioxidant activity. The addition of antioxidants naturally present in the seeds of chia and a combination with α -tocopherol and myricetin gave oxidative stability to the chia oil when evaluated by the accelerated method. The spray-dry technique was evaluated as a way to protect the chia oil, as well the influence of the use of rotor-stator type homogenizers and ultrasound on the formation of emulsions and on the properties of the microcapsules. Application of the microencapsulation technology presented encapsulated oil results percentage (28,76%) and encapsulation efficiency (96%) similarly to commercial microparticles. Also, it was efficient in preserving the fatty acid profile of the oleaginous matrix and increased the time of the oxidative stability of the oil *in natura* (0,6 hours) to 8,2 hours of microencapsulated oil, especially when ultrasound was used. Nutritional information reported in this study illustrates the potential benefits that chia seed can promote on human health, and shows the potential use in industrial applications.

Key words: *Salvia hispanica* L.; nutritional_properties; functional_properties; α -linolenic acid; microencapsulated_oil.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
ALA	Ácido linolênico
ANOVA	Análise de variância
AOAC	<i>Official Methods of Analysis</i>
AOCS	<i>American Oil Chemists' Society</i>
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
BSA	Albumina de soro bovino
EC₅₀	Concentração eficiente para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH•
CFT	Conteúdo de fenólicos totais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DE	Dextrose equivalente
DPPH•	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Termogravimetria Derivada
D₃₂	Diâmetro Médio de Sauter
D₄₃	Diâmetro Médio de Brouckere
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
EAG	Equivalente de ácido gálico
EPA	Environmental Protection Agency

FAT	Fibra alimentar total
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
GA	Goma Arábica
GC-MS	Cromatografia à Gás acoplada ao Espectrômetro de Massa
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente
K_{232nm}	Coeficiente de extinção específica a 232 nm
K_{270nm}	Coeficiente de extinção específica a 270 nm
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
MD	Maltodextrina
ORAC	<i>Oxygen radical absorbance capacity</i>
PDI	Índice de polidispersidade
PI	Período de Indução
PITC	Aminoácidos livres com fenil isotiocianato
PTC-aa	Derivativos feniltiocarbamil-aminoácidos
PUFA	Ácidos graxos polinsaturados
SFA	Ácidos graxos saturados
TBHQ	<i>tert</i> -butil hidroquinona
TE	Equivalente ao trolox
TG	Análise Termogravimétrica
TPTZ	2, 4, 6 – Tri (2-piridil) – 1,3,5 - triazina
TROLOX	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico

VA	Valor de acidez
VI	Valor de iodo
VP	Valor de peróxido
VS	Valor de saponificação
WHO	<i>World Health Organization</i>
WPI	Proteína isolada do leite
ω-3	Ômega 3

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVO GERAL	15
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2 MATERIAIS E MÉTODOS	16
2.1 MATERIAIS	17
2.1.1 Sementes	17
2.1.2 Materiais de parede	17
2.1.3 Reagentes	17
2.2 MÉTODOS	18
2.2.1 Caracterização da semente de chia	18
2.2.1.1 Composição centesimal e fibra alimentar	18
2.2.1.2 Fração proteica e perfil de aminoácidos	18
2.2.1.3 Minerais	19
2.2.2 Extração e caracterização do óleo de chia	19
2.2.2.1 Extração	19
2.2.2.2 Caracterização físico-química	19
2.2.2.3 Perfil de ácidos graxos	20
2.2.2.4 Atividade antioxidante	20
2.2.2.5 Perfil de tocoferóis e compostos fenólicos	21
2.2.2.6 Estudo da estabilidade termo-oxidativa do óleo de chia	22
2.2.2.6.1 Período de indução	23
2.2.2.6.2 Análise térmica	23
2.2.3 Produção e caracterização das microcápsulas	23
2.2.3.1 Preparo da emulsão do óleo de chia em água	23
2.2.3.2 Tamanho de gotas da emulsão	24
2.2.3.3 Estabilidade da emulsão	24
2.2.3.4 Preparo das microcápsulas no spray dryer	25

2.2.3.5 Teor de umidade das microcápsulas	25
2.2.3.6 Teor de óleo superficial das microcápsulas	25
2.2.3.7 Teor de óleo encapsulado nas microcápsulas	25
2.2.3.8 Eficiência de microencapsulação	26
2.2.3.9 Distribuição do tamanho de partículas	26
2.2.3.10 Valor de peróxido das microcápsulas	26
2.2.3.11 Estabilidade oxidativa	27
2.2.3.12 Perfil de ácidos graxos	27
2.2.3.13 Morfologia das microcápsulas	27
2.2.4 Extração de compostos fenólicos a partir da farinha desengordurada	28
2.2.4.1 Obtenção da farinha desengordurada de chia para extração dos compostos fenólicos	28
2.2.4.2 Obtenção dos extratos fenólicos	28
2.2.4.3 Teor de fenólicos totais	28
2.2.4.4 Atividade antioxidante pelo sequestro do radical livre DPPH	28
2.2.4.5 Atividade antioxidante pelo poder redutor do ferro FRAP	29
2.2.4.6 Perfil dos compostos fenólicos	29
2.2.5 Análises estatísticas	29
3 RESULTADOS	30
3.1 ARTIGO I: Chia (<i>Salvia hispanica</i> L.): Functional properties - a short review	31
3.2 ARTIGO II: Caracterização química, nutricional e estudo da estabilidade termo-oxidativa do óleo e sementes de chia (<i>Salvia hispânica</i> L.) brasileira	59
3.3 ARTIGO III: Optimization of the extraction of phenolic compounds from seeds of Brazilian chia using mixture design	89
3.4 ARTIGO IV: Influência do método de homogeneização da emulsão na estabilidade de óleo de chia (<i>Salvia hispanica</i> L.) microencapsulado por spray drying	108
4 CONCLUSÃO	135
REFERÊNCIAS	136

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos funcionais têm recebido uma grande atenção nos últimos anos como componentes de estilo de vida saudável, pois promovem benefícios fisiológicos e/ou reduzem o risco de doenças crônicas. Os vegetais, como as frutas, legumes e grãos fornecem ao organismo fontes de vitaminas, minerais, fibras e fitoquímicos que são responsáveis pelo bom funcionamento do organismo e a manutenção da saúde (PACHECO; SGARBIERI, 2001).

A semente de chia (*Salvia hispanica* L.), nativa do sul do México e norte da Guatemala (COATES; AYERZA, 1996), é considerada um alimento funcional, por ser excelente fonte de óleo, fibra alimentar, proteínas e outros componentes importantes, tais como vitaminas, minerais e antioxidantes (AYERZA; COATES, 2004; CAPITANI; SPOTORNO; NOLASCO; TOMÁS, 2012; MARINELI et al., 2014), necessários para uma dieta saudável. Devido ao seu alto teor de ácidos graxos poli-insaturados, especialmente o ácido α -linolênico (~60%) justifica-se o seu potencial nutricional, uma vez que o óleo de chia é único, pois contém a maior concentração natural de ácido graxo ômega-3 (AYERZA, 1995; COATES; AYERZA, 1996). Ressalta-se ainda, que a semente de chia não possui glúten, permitindo o uso em pacientes celíacos (IXTAINA, 2010).

Vários efeitos biológicos são conferidos as sementes de chia, na prevenção e tratamento de algumas doenças, como: alergias, angina, melhoria de desempenho atlético, câncer, doença cardíacas, distúrbios endócrinos/hormonais, hiperlipidemia, hipertensão, acidente vascular cerebral, vasodilatação e algumas evidências sugerem possível efeito anticoagulante, antioxidante e antivirais (ULBRICHT et al., 2009).

A presença de glicosídeos de quercetina e campferol em sementes de chia mexicana (REYES-CAUDILLO; TECANTE; VALDIVIA-LÓPEZ, 2008), além da composição de ácido clorogênico, quercetina, miricetina e ácido elenólico, em extratos de sementes de chia, confirmam ser fonte de fenólicos antioxidantes (MARINELI et al., 2014).

Estes estudos têm impulsionado o uso da chia na dieta humana, assim como tem incentivado a indústria na produção de alimentos enriquecidos com esta semente e/ou seus constituintes. Atualmente, há uma crescente demanda por antioxidantes naturais como os compostos fenólicos, extraídos de diversas fontes vegetais, devido às suas aplicações medicinais e na indústria de alimentos, como agentes antimicrobianos, antioxidantes e estabilizantes de alimentos. Sobretudo, as técnicas de extração desses compostos, tipo de solventes, natureza química da amostra e condições utilizadas (REZAIE et al., 2015).

Devido aos componentes funcionais, a semente de chia oferece um enorme potencial na indústria de alimentos, favorecendo sua incorporação em produtos de panificação, laticínios, entre outros, bem como na elaboração de filmes comestíveis. Porém, o elevado grau de insaturação torna-a muito suscetível à oxidação, a qual conduz à formação de sabores e odores desagradáveis, promovendo a formação de radicais livres, com efeitos fisiológicos negativos sobre o organismo, além de comprometer a vida de prateleira do alimento (AHN et al., 2008).

A microencapsulação representa uma alternativa de proteção contra a oxidação lipídica, uma vez que a matriz polimérica do material de parede forma uma barreira e limita o transporte de oxigênio e, consequentemente, as reações de oxidação, assim, as partículas contendo o óleo encapsulado se tornam produtos mais estáveis, que podem ser usados na suplementação de vários alimentos tornando-os assim mais ricos nutricionalmente e com possíveis funcionalidades (GÖKMEN et al., 2011).

Contudo, a composição das sementes de chia depende muito do local e das condições climáticas de produção, principalmente quanto ao teor de insaturações e de proteínas (AYERZA; COATES, 2011). Verifica-se um desenvolvimento melhor da planta em regiões tropicais e subtropicais (AYERZA; COATES, 2004), todavia podem também ser cultivadas em clima mais ameno.

Considerando o interesse crescente no uso de chia na dieta pelos benefícios relatados, assim como, a necessidade de resguardar o ácido α -linolênico contra a oxidação lipídica e identificar o potencial antioxidante das sementes e óleo de chia produzidas no Brasil, o presente estudo compilou os dados desta semente na forma de uma revisão bibliográfica, assim como, objetivou investigar as características físico-químicas e nutricionais da semente de chia nacional, desenvolver microcápsulas com óleo de chia e identificar a interação do solvente mais eficiente na extração dos compostos fenólicos.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial nutricional e antioxidante de sementes e óleo de chia e desenvolver microcápsulas que resguardecem o composto ácido α -linolênico presente no óleo.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar físico-quimicamente e nutricionalmente as sementes e o óleo de chia brasileira;
- Avaliar métodos de homogeneização de emulsões de óleo de chia em água;
- Obter micropartículas em *spray dryer*;
- Caracterizar as microcápsulas desenvolvidas;
- Obter extratos a partir de sementes desengorduradas provenientes do resíduo (bioproduto) do processo de extração do óleo, utilizando planejamento de mistura de solventes;
- Avaliar o teor de fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos obtidos e do óleo de chia;
- Identificar e quantificar os compostos fenólicos em CLAE dos extratos e do óleo de chia;
- Avaliar a estabilidade termo-oxidativa do óleo de chia aditivado com compostos antioxidantes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos e ensaios foram realizados no Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM) e Laboratório de Análise Química de Alimentos (LAQA), ambos na Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Agroindústria de Alimentos do Rio de Janeiro. O Fluxograma (Figura 1), apresenta as etapas das análises realizadas neste estudo.

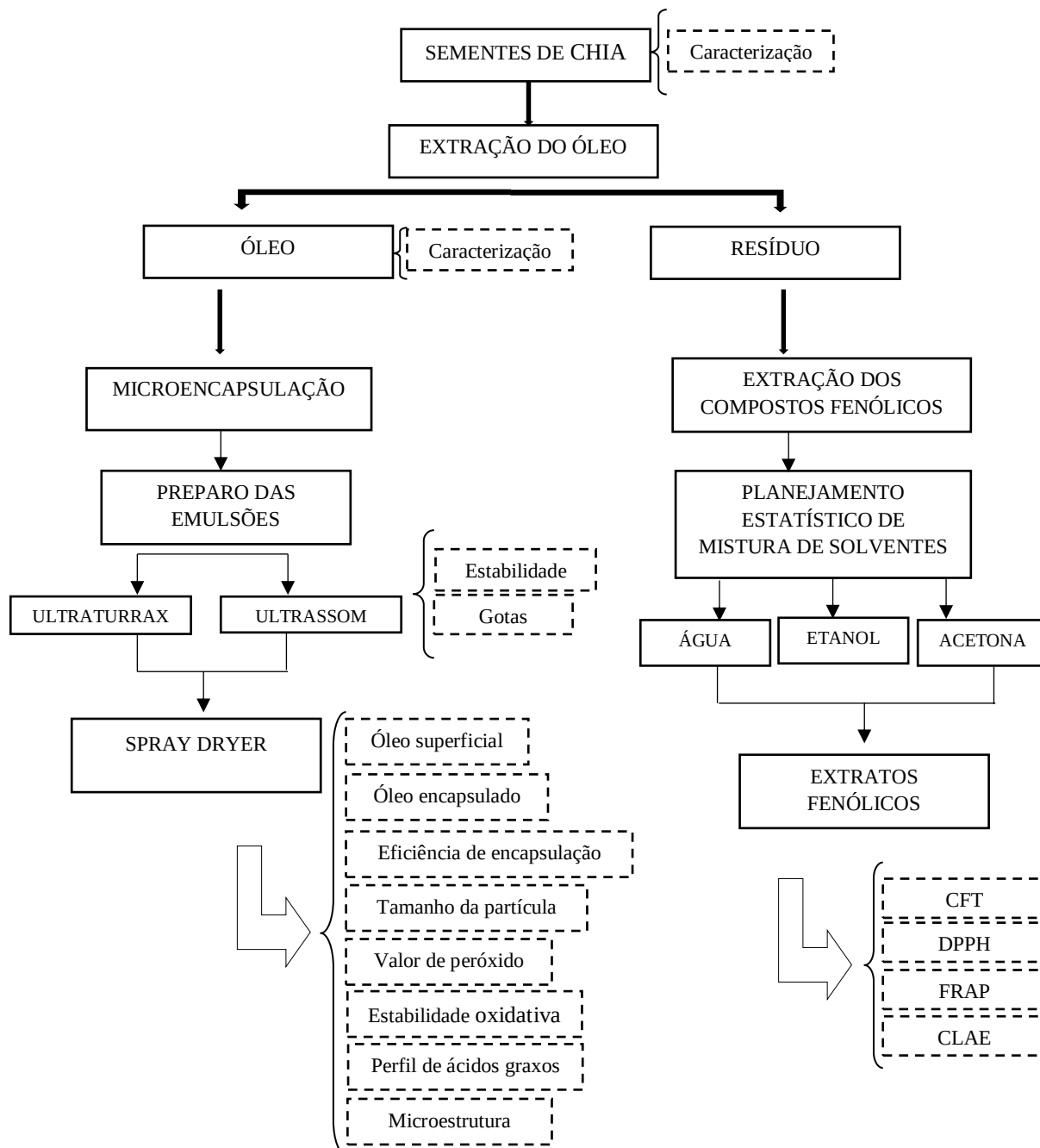


Figura 1 - Fluxograma das etapas de execução deste trabalho.

2.1 MATERIAIS

2.1.1 Sementes

As sementes de chia (*Salvia hispanica* L.) produzidas na região sul do Brasil, no município de Entre-Ijuís-RS foram adquiridas da Giroil Agroindústria Ltda. Segundo o produtor, as sementes foram colhidas bem secas, passando apenas por processo de limpeza com posterior embalagem a vácuo.

2.1.2 Materiais de parede

Whey Protein Isolate (WPI) (Protein Whey 95 Low Lactose) foi obtido a partir da Nestlé Product Technology Centre (Konolfingen, Suíça). As maltodextrinas (MD) Maltogill 10DE e 20DE foram cedidas pela Cargill (São Paulo, Brasil) e a Goma Arábica (GA) foi adquirida da Food Pymes (São Paulo, Brasil).

2.1.3 Reagentes

Os padrões de ácido gálico, TPTZ (9,2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triazina), DPPH^{*} (2,2 difenil-1-picril-hidrazila), TROLOX (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8 tetrametilcromano), ácidos fenólicos: protocatequímico, hidroxibenzoico, salicílico, siríngico, gentísico, vanílico, elágico, p-coumarico, sináptico, trans-cinâmico, cafeico e ferúlico e flavonoides: rutina, miricetina, quercetina, naringina, campferol, catequina, hesperetina, crisina foram obtidos da Sigma-Aldrich (Sigma Co., USA). O reagente Folin-Ciocalteu foi adquirido da Merck. Os reagentes cloreto de ferro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), acetato de sódio trihidratado, carbonato de sódio, cloreto de ferro (II) tetrahidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), sulfato de ferro (III) pentahidratado ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) foram adquiridos da Vetec Química Fina Ltda. Os solventes n-hexano, acetona, etanol, isopropanol, clorofórmio ambos de grau analítico, foram obtidos da FMAIA. Metanol, hexano, isopropanol e acetonitrila grau CLAE da J.T. Baker (Phillipsburg, USA).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Caracterização da semente de chia

2.2.1.1 Composição centesimal e fibra alimentar

Umidade, proteínas e cinzas foram determinados pelo método oficial de análises, normatizado pela AOAC (2000). Os lipídios foram determinados pelo método descrito por BLIGH e DYER (1959). O teor de carboidratos total foi obtido por diferença entre 100 e a soma de cinzas, lipídios, proteínas e umidade.

Fibra alimentar total (FAT) foi determinada pelo método enzimático-gravimétrico da AOAC (2000).

2.2.1.2 Fração proteica e perfil de aminoácidos

As sementes foram preparadas inicialmente pela separação da mucilagem e desengorduramento segundo o método proposto por VÁZQUEZ-OVANDO; ROSADO-RUBIO; CHEL-GUERRERO; BETANCUR-ANCONA (2010) e em seguida submetidas ao fracionamento proteico baseado em diferenças de solubilidade, de acordo com (OSBORNE, 1924) com ligeiras modificações por BARBA DE LA ROSA; HERRERA-ESTRELLA; UTSUMI; PAREDES-LÓPEZ (1996) e SANDOVAL-OLIVEROS; PAREDES-LÓPEZ (2013). Com este procedimento, foram obtidos albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em soluções salinas), prolaminas (solúveis em soluções alcoólicas) e glutelinas (solúvel em álcali diluído). Todas as frações foram dialisadas, liofilizadas e armazenadas a 4 °C até à sua utilização. As concentrações de proteínas foram estimadas de acordo com o método de BRADFORD (1976) utilizando uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA).

A determinação do perfil de aminoácidos foi realizada de acordo com o método descrito por WHITE; HART; FRY (1986), no qual os aminoácidos foram determinados em amostra previamente hidrolisada em ácido clorídrico bidestilado 6 N, seguida de derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenil isotiocianato (PITC). A separação dos derivativos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (VARIAN, Waters 2690, California, USA) acoplado com coluna de fase reversa C18 (PICO-TAG, 3,9 x 150 mm). As fases móveis empregadas consistiram de um tampão acetato de concentração 0,0011 g/mL e pH 6,4 e, uma solução de acetonitrila a 60%. A injeção da amostra (20 µL) foi efetuada manualmente e a detecção ocorreu a 254 nm. A separação cromatográfica foi realizada a um fluxo constante de 1 ml/min, à temperatura de 35 °C. O tempo de corrida

cromatográfica foi de 21 minutos. A curva de calibração foi construída com nove pontos, traçando-se um gráfico das alturas dos picos obtidos pela injeção de 20 µL da solução de aminoácido preparada numa faixa de 4,17 µg/mL a 90,60 µg/mL. Em cada curva de calibração, o primeiro ponto correspondeu ao limite de quantificação nas condições empregadas, ou seja, a menor quantidade detectável pelo método.

2.2.1.3 Minerais

As amostras foram digeridas em um sistema de digestão por micro-ondas, Berghof, modelo Speedwave four. As sementes trituradas foram pesadas (0,4 g) e colocadas em tubos Teflon para digestão (DAP-60+). Uma mistura de ácido nítrico a 65% (3 mL) e peróxido de hidrogênio a 35% (3 mL) foi cuidadosamente adicionados. Após repouso, os tubos foram adequadamente fechados e introduzidos no micro-ondas. Os gradientes de temperatura, pressão e tempo utilizados foram sugeridos pelo fabricante para sementes oleaginosas. Após esse período, os tubos foram arrefecidos até à temperatura ambiente e as amostras digeridas foram filtradas para análise dos minerais.

Os elementos químicos (Ca, Fe, Mg, P, K, Na, Al, Mn, Cu, Zn, Se, Cr, Co) foram determinados usando um espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente ICP-MS Thermo Scientific, segundo a norma EPA (1998).

2.2.2 Extração e caracterização do óleo de chia

2.2.2.1 Extração

O óleo foi extraído por prensagem a frio (~20 °C) em uma prensa hidráulica adaptada para extração de óleos, fabricada pela Ribeiro, modelo P30T (São Paulo, Brasil) apresentando características de 160 cm de comprimento e êmbolo de 15 cm de diâmetro composto por material de aço inox com uma aplicação máxima de pressão de $1,3 \times 10^7 \text{ N.m}^{-2}$, em seguida foi filtrado a vácuo e armazenado em frascos âmbar sem *headspeace* a 4°C para posterior caracterização e microencapsulamento.

2.2.2.2 Caracterização físico-química

Os parâmetros físicos e químicos do óleo: valor de acidez (VA), valor de peróxido (VP), coeficientes de extinção (K_{232} e K_{270}), valor de saponificação (VS) e valor de iodo (VI), foram determinados de acordo com as práticas recomendadas pela AOCS Ca 5a-40, Cd 8b-90, Ch 5 - 91, Cd 3a-94, Cd 1c-85; respectivamente (AOCS, 1998). A viscosidade cinemática foi

determinada de acordo com a norma ASTM D445 (2015) e a massa específica compensada a 20°C, de acordo com a norma ASTM D4052 (2015). VA foi expresso como percentagem de ácido oleico. VP foi expresso em miliequivalentes de peróxido por kg de óleo (meq peróxido/kg de óleo). VS foi expresso como miligramas de álcali por grama de óleo (mg KOH/g óleo). VI foi expresso em número de centigramas de iodo absorvido por grama da amostra (g I₂/100 g óleo), os coeficientes de extinção (K₂₃₂ e K₂₇₀) foram expressos como extinção específica de um 1% (p/v) de solução de óleo em isoctano utilizando uma célula de quartzo com 1 cm de caminho óptico em um espectrômetro UV-vis Shimadzu, modelo UV-2550, a viscosidade cinemática foi expressa como o tempo de escoamento do óleo através de um caminho percorrido em um viscosímetro capilar de vidro calibrado, sob a ação da força gravitacional (mm²/s) e a massa específica como a quantidade de massa por unidade de volume a uma temperatura específica (kg/m³).

2.2.2.3 Perfil de ácidos graxos

Para a determinação do perfil de ácidos graxos do óleo de chia foi realizado uma esterificação metílica seguindo a metodologia descrita por HARTMAN; LAGO (1973) e a quantificação obtida por curva de calibração com padrões de ésteres metílicos, utilizando um GCMS-QP2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipado com uma coluna Durabound DB-23 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. A temperatura do injetor e do detector foram fixados em 230 °C e temperatura da coluna em 90 °C. O gradiente de eluição na coluna foi de 90 a 150 °C (10 °C/min), 150 a 200 °C (5 °C/min), 200 a 230 °C (3 °C/min) em um tempo total de corrida de 34 minutos. O gás transportador foi He.

2.2.2.4 Atividade antioxidante

Ensaio DPPH: Foram utilizados diferentes volumes de óleo (5 - 200 µL) e trolox (200 ppm como referência externa). O volume foi ajustado a 1 mL pela adição de etanol a uma solução metanólica 0,5 mM de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil radical (DPPH, 250 µL) e Tween 20 (5µL). Os tubos foram armazenados à temperatura ambiente no escuro durante 60 minutos (GORINSTEIN et al., 2003). O controle foi preparado como acima, sem amostra de óleo. A absorbância foi monitorada a 515 nm e a atividade sequestradora de radicais foi expressa como EC₅₀). O valor EC₅₀ indica o volume (µL) de óleo necessário para eliminar 50% do radical livre DPPH. O potencial antioxidante é inversamente proporcional ao valor de EC₅₀.

Ensaio descoloramento do β-caroteno: A atividade antioxidante no sistema β-caroteno/ácido linoleico foi avaliada através do método proposto por JAYAPRAKASHA;

JAGANMOHAN RAO (2000) com algumas modificações (CONDELLI et al., 2015). Uma solução de β -caroteno (0,2 mg de β -caroteno dissolvido em 0,2 mL de clorofórmio), ácido linoleico (20 mg) e Tween 20 (200 mg) foram misturados. O clorofórmio foi removido utilizando um evaporador rotativo a 50 °C. Foi adicionada água destilada (50 mL). Quatro mililitros da emulsão foram transferidos em vários tubos contendo 0,2 mL de óleo ou etanol como controle. Trolox (200 ppm) foi utilizado como referência externa. Os tubos foram colocados a 50 °C durante 120 minutos. A absorbância foi medida a 470 nm. Os resultados foram expressos como percentagem de inibição do descoramento do β -caroteno (% Inibição) e calculada como se segue:

$$\% \text{ Inibição} = \left(1 - \frac{A_s(t=0) - A_s(t=120)}{A_c(t=0) - A_c(t=120)} \right) \times 100$$

Onde $A_s(t=0)$ e $A_c(t=0)$ são as absorbâncias medidas no tempo zero de incubação para a amostra e o controle, respectivamente, e $A_s(t=120)$ e $A_c(t=120)$ são as absorbâncias medidas após 120 minutos de incubação para a amostra e o controle, respectivamente.

3.2.2.5 Perfil de tocoferóis e compostos fenólicos

O perfil de tocoferóis foi obtido a partir do método proposto por KHATTAB & ZEITOUN (2013) com algumas modificações. 2 g de óleo foram submetidos a extração duas vezes com 10 ml de metanol, seguido de outras duas extrações com 10 ml da mistura metanol: iso-propanol (1:1 v/v) utilizando uma centrífuga a 5000 rpm durante 10 min (4 °C) para separação de fases. As camadas orgânicas superiores das quatro extrações foram combinadas, secas sob N_2 , redissolvida em 5 ml da mistura metanol: iso-propanol, filtrada através de um filtro de seringa de 0,45 μ m e submetida à análise por CLAE. A análise de tocoferóis foi realizada em um cromatógrafo líquido de alto desempenho (CLAE) Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com um injetor automático Rheodyne 7125i e um detector UV/VIS. As colunas utilizadas foram uma coluna Shimadzu LC-18 (25 cm x 4,6 mm, 5 μ m, da Supelco, Bellefonte, PA) e uma pré-coluna C-18 ODS Shimadzu. A amostra foi eluída em um sistema isocrático, fluxo de 1 mL/min, utilizando como fase móvel metanol:água acidificada 0,17 mol/L de ácido acético glacial (99:1 v/v). A temperatura da coluna foi mantida em 25 °C e o volume de injeção foi 20 μ L. Os picos foram adquiridos a 294 nm e os dados foram analisados utilizando o software LabSolutions (Shimadzu) por comparação com os tempos de retenção dos padrões de tocoferóis α , δ e γ utilizados na preparação das curvas de calibração.

O perfil de compostos fenólicos foi determinado a partir do método proposto por GÓMEZ-CARAVACA; CERRETANI; BENDINI; SEGURA-CARRETERO; FERNANDEZ-GUTIERREZ (2006), com algumas modificações. 30 g de óleo de chia foram homogeneizados com 30 mL de hexano, e em seguida percorrido em um cartuxo SPE (LC-18, 2g, Superclean), pré-condicionado com 10 mL de metanol e 10 mL de hexano. Após uma lavagem com hexano (15 mL) para eliminar a fração não-polar do óleo, a amostra foi eluída com metanol (40 mL). O extrato metanólico foi seco sob N₂, e o resíduo redissolvido em 1 mL de metanol, filtrada através de um filtro de seringa de 0,45 µm e submetida à análise por CLAE. A análise dos compostos fenólicos foi realizada no cromatógrafo e coluna descritos acima. A amostra foi eluída em um sistema gradiente que consiste em solvente A (2% de ácido acético, v/v) e o solvente B (acetonitrilo: metanol, 2: 1, v/v), utilizada como a fase móvel, com um caudal de 1 mL / min. A temperatura da coluna foi mantida a 25 ° C e o volume de injeção foi de 20 µL. O sistema de gradiente iniciou-se a partir de 90% de A a 0 min, a 80% de A em 10 min, 70% de A em 15 min, 60% de A em 25 min, 50% de A em 30-40 min, 75% de A em 42 minutos, e 90% de A em 44 min. Os picos dos compostos fenólicos foram monitorizados a 280 nm. O software (Shimadzu) LabSolutions foi usado para controlar o sistema de LC-UV e de processamento de dados.

2.2.2.6 Estudo da estabilidade termo-oxidativa do óleo de chia

O estudo da estabilidade oxidativa do óleo de chia foi realizado pelo efeito dos antioxidantes α -tocoferol e miricetina. Foi aplicado um delineamento experimental de mistura de dois componentes (Tabela 1) com o objetivo de verificar um possível efeito sinérgico. Foi utilizado como referência o antioxidante sintético TBHQ e como controle foi utilizado uma amostra de óleo sem antioxidante. O somatório das proporções dos componentes foi fixado em 200 mg/kg.

O modelo elementar para uma mistura de dois componentes é o modelo linear, porém, foi aplicado um modelo quadrático hipotético, de modo a avaliar a interação entre os componentes da mistura.

O preparo das misturas foi realizado pesando-se inicialmente os antioxidantes e em seguida o óleo. A mistura foi agitada durante 10 minutos de modo a homogeneizar e não promover aquecimento do óleo, posteriormente foram armazenadas a 4 °C durante uma noite.

Tabela 1 - Delineamento experimental utilizado para o estudo da estabilidade oxidativa do óleo de chia

Ensaio	Componentes da mistura	
	α -tocoferol	Miricetina
1	1,00 (200 mg/kg)	0,00 (0 mg/kg)
2	0,00 (0 mg/kg)	1,00 (200 mg/kg)
3	0,75 (150 mg/kg)	0,25 (50 mg/kg)
4	0,25 (50 mg/kg)	0,75 (150 mg/kg)
5	0,50 (50 mg/kg)	0,50 (50 mg/kg)
6	0,50 (50 mg/kg)	0,50 (50 mg/kg)

2.2.2.6.1 Período de indução

O equipamento Rancimat foi usado para estimar a estabilidade do óleo de chia. É um teste acelerado e expressa o resultado em período de indução (PI), definido como o intervalo de tempo correspondente ao ponto de inflexão da curva de condutividade *versus* tempo. Determinou-se a 110 °C e 10 L de ar/h utilizando aparelho Rancimat 873 (Metrohm, Herisau, Suíça). 2 g de amostra foram pesados em cada tubo de reação. As análises foram realizadas em duplicata.

2.2.2.6.2 Análise térmica

As curvas termogravimétricas (TG/DTG) das amostras foram obtidas em um analisador térmico simultâneo da Shimadzu modelo DTG-60H. Os testes não-isotérmicos foram realizados utilizando amostras de aproximadamente 10 mg em um cadinho de alumina com atmosfera de oxigênio, fluxo de 50 mL/min, em uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, variando de 25-800 °C.

2.2.3 Produção e caracterização das microcápsulas

2.2.3.1 Preparo da emulsão do óleo de chia em água

Uma formulação foi definida e preparada para encapsular o óleo de chia com diferentes materiais de parede. O teor de sólidos totais foi fixado em 30% p/v e o teor de óleo de chia em 30% p/p em relação aos sólidos totais. As emulsões foram formuladas com 40% MD10, 40%

MD20, 15% WPI e 5% GA do material de parede e obtidas por homogeneizadores rotor-estator ultraturrax (IKA T18, Wilmington, USA) e/ou ultrassom (Hielscher UIP 1000hd, Alemanha) em tempos variados, de modo avaliar os efeitos dos métodos e tempo de homogeneização sobre a microencapsulação de óleo de chia.

As condições operacionais do aparelho ultrassônico foram: probe ultrassônico com 18 mm de diâmetro, 20 kHz de frequência e potência de 260 W, béquer encamisado com capacidade de 250 mL e resfriado a 10 °C. A altura do probe do ultrassom em contato com as emulsões foi padronizado em 40 mm. O Ultraturrax foi operado a uma rotação de 15000 rpm e tomado o cuidado para que houvesse a formação de um vortex em torno da haste do equipamento que fosse capaz de arrastar todo o sobrenadante, formado pela fase oleosa promovendo o cisalhamento da fase dispersa. Todas as amostras foram padronizadas em alíquotas de 200 mL.

2.2.3.2 Tamanho de gotas da emulsão

A distribuição de tamanho e diâmetro médio de gota das emulsões foram determinados por dispersão de luz usando difração a laser MICROTRAC S3500 (Microtrac Inc., Montgomery Ville, USA). A análise foi conduzida imediatamente após a preparação em duplicata e em três ciclos, utilizando água destilada como dispersante/fluido carreador (índice de refração de 1,33). Para a partícula foi adotado o índice de refração de 1,50. O diâmetro médio foi calculado com base no diâmetro médio de uma superfície de uma esfera de mesma área (D32) e o índice de polidispersidade (PDI) baseado na distribuição de partes de volume, utilizando os parâmetros característicos D10, D50 e D90 que são diâmetros de volume equivalentes a 10%, 50% e 90% do volume cumulativo, respectivamente, determinado de acordo com a Eq. (1) (JINAPONG; SUPHANTHARIKA; JAMNONG, 2008):

$$PDI = \frac{D_{90}-D_{10}}{D_{50}} \quad (1)$$

2.2.3.3 Estabilidade da emulsão

Imediatamente após o processo de emulsificação, alíquotas de 10mL de cada uma das emulsões foram transferidas para provetas idênticas com capacidade de 25 mL, seladas e armazenadas a 25 °C. O volume da fase oleosa foi monitorado 1 e 24 h após o preparo das emulsões. A estabilidade (não separação de fases) foi expressa qualitativamente em sim ou não.

2.2.3.4 Preparo das microcápsulas no spray dryer

As emulsões foram secas num atomizador Lab Plant SD-05 (Huddersfield, England), com bico de atomização de 0,55 mm de diâmetro, sob uma pressão de pulverização de 2,5 bar. A temperatura do ar de entrada foi ajustada para 160 ± 2 °C e a de saída foi mantida a 60 ± 5 °C a uma taxa de alimentação de 7 mL/min.

2.2.3.5 Teor de umidade das microcápsulas

O teor de umidade das amostras foi determinado gravimetricamente após secagem a vácuo durante 24 h a 70 °C (AOAC, 2006).

2.2.3.6 Teor de óleo superficial das microcápsulas

O óleo superficial das microcápsulas foi determinado de acordo com BAE; LEE (2008). Em tubos Falcon, contendo 2g de pó, foram adicionados 15 mL de hexano. A mistura foi homogeneizada em agitador tipo vortex por 2 minutos, e em seguida, centrifugada por 15 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi recolhido e o pó restante foi lavado três vezes com 20 mL de hexano. O solvente foi evaporado a 60 °C em estufa de ar circulante e o conteúdo lipídico determinado gravimetricamente.

2.2.3.7 Teor de óleo encapsulado nas microcápsulas

O conteúdo de óleo encapsulado foi quantificado segundo HARDAS et al. (2002). Amostras de 2g de pó foram pesadas em tubos Falcon e adicionados 10 mL de hexano, homogeneizadas em agitador tipo vortex e centrifugadas a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao resíduo foram adicionados 5 mL de água destilada, o que foi seguido de nova agitação em vortex por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 25 mL de uma solução hexano/isopropanol (3:1 v/v), e agitado em vortex por mais 2 minutos, seguido de centrifugação por 15 minutos a 5000 rpm.

A fase orgânica foi cuidadosamente separada com auxílio de pipeta pasteur e transferida para um erlenmeyer previamente tarado. O processo de extração com a solução hexano/isopropanol foi repetido por mais duas vezes e a fase orgânica coletada no mesmo erlenmeyer. A fase orgânica coletada foi evaporada a 60 °C em estufa de ar circulante e o conteúdo lipídico determinado gravimetricamente.

2.2.3.8 Eficiência de microencapsulação

A eficiência de microencapsulação foi determinada pela fração de óleo encapsulado sobre a quantidade total de óleo (Eq. (2)).

$$\text{Eficiência de encapsulação} = \frac{\text{Óleo}_{\text{Encapsulado}}}{\text{Óleo}_{\text{Total}}} \times 100 \quad (2)$$

Onde Óleo total é o somatório do óleo encapsulado e óleo superficial conforme Seção 2.2.3.6 e 2.2.3.7

2.2.3.9 Distribuição do tamanho de partículas

A distribuição de tamanho e diâmetro médio de partícula foi determinado por dispersão da luz usando difração a laser MICROTRAC S3500 (Microtrac Inc., Montgomery Ville, USA). As amostras foram dispersas em 2-propanol (índice de refração 1,38) e o diâmetro médio foi determinado com base no diâmetro médio de uma esfera do mesmo volume e o diâmetro Brouckere (D43).

2.2.3.10 Valor de peróxido das microcápsulas

O valor de peróxido foi determinado de acordo com o método proposto pela International Dairy Federation IDF, com algumas modificações (SEMB, 2012; SHANTHA; DECKER, 1994) e a extração do óleo foi realizada segundo PARTANEN et al., (2008). Uma amostra de 0,5g de pó foi pesada em um tubo de ensaio e suspenso em 5 mL de água. O tubo foi agitado durante 30 minutos para garantir a dissolução do pó. Uma porção de 400 µL foi retirada e agitada com 1,5 mL de uma mistura iso-octano/ isopropanol (2:1) para extração do óleo. Em seguida, as fases foram separadas por centrifugação (5000 rpm por 5 minutos) e a fase superior foi recolhida para a análise. As extrações foram realizadas em triplicata. Uma alíquota de 300 µL do meio de extração foram adicionados a 9,6 mL de uma mistura de clorofórmio/metanol (7:3). Para a formação de cor, foram adicionados 50 µL de uma solução de Fe^{2+} ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 40 mg dissolvidos em 10 mL 3,7% HCl) e 50 µL de tiocianato de amônia 30% (7,5 g dissolvidos em 25 mL de água destilada). A amostra foi agitada, mantida em repouso, no escuro, por 5 minutos e então medida a absorbância a 500 nm. O valor de peróxido foi determinado usando uma curva padrão de Fe^{3+} (1-25 µg).

2.2.3.11 Estabilidade oxidativa

O equipamento Rancimat foi usado para estimar a estabilidade do óleo de chia para a oxidação antes e após a microencapsulação. O Rancimat é um teste acelerado e expressa o resultado em período de indução (PI), definido como o intervalo de tempo correspondente ao ponto de inflexão da curva de condutividade *versus* tempo. Determinou-se a 110 °C e 10 L de ar/h utilizando aparelho Rancimat 873 (Metrohm, Herisau, Suíça). 2 g de amostra foram pesados em cada tubo de reação. O óleo fresco foi usado como controle. As análises foram realizadas em duplicata.

2.2.3.12 Perfil de ácidos graxos

Para a determinação do perfil de ácidos graxos do óleo de chia foi realizado uma e a quantificação obtida por curva de calibração com padrões de ésteres metílicos, utilizando um GCMS-QP2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan)

O perfil de ácidos graxos e o monitoramento do Ácido Linolênico (ALA) do óleo fresco e microencapsulado foi determinado por cromatografia em fase gasosa. Neste caso, o óleo resultante extraído da determinação total de óleo (seção 2.2.3.8) foi usado para a análise de CG após esterificação metílica seguindo a metodologia descrita por HARTMAN & LAGO (1973). Os perfis cromatográficos foram registados e o percentual de ALA foi determinado por normalização de área com um CG acoplado a um detector de Massa num Shimadzu® GCMS-QP2010 (Kyoto, Japan) utilizando uma coluna Durabound DB-23 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm. A temperatura do injetor e do detector foram fixados em 230 °C e temperatura da coluna em 90 °C. O gradiente de eluição na coluna foi de 90 a 150 °C (10 °C/min), 150 a 200 °C (5 °C/min), 200 a 230 °C (3 °C/min) em um tempo total de corrida de 34 minutos. O gás transportador foi He.

2.2.3.13 Morfologia das microcápsulas

A microestrutura das partículas foi observada em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (HITACHI, modelo TM 3000, Japão) acoplado a um EDS (Energy Dispersive Spectrometer for X-ray analysis, Brucker, Madison, USA) para a determinação de microelementos. As amostras analisadas foram colocadas em suportes metálicos (stubs) por adesão em fita dupla face metalizada, sendo então observadas no MEV para a aquisição das imagens.

2.2.4 Extração de compostos fenólicos a partir da farinha desengordurada

2.2.4.1 Obtenção da farinha desengordurada de chia para extração dos compostos fenólicos

O resíduo resultante da extração do óleo foi moído em processador de alimentos (Pratic Blender Cadence, BLD300) e desengordurado com n-hexano em aparelho Soxhlet. A farinha resultante foi armazenada em recipiente escuro, sob refrigeração (2-8 °C), até o momento de sua utilização. Posteriormente foi submetida ao processo de extração dos compostos fenólicos.

2.2.4.2 Obtenção dos extratos fenólicos

Para investigar o efeito de diferentes solventes na extração de compostos fenólicos da farinha de chia, um design simplex-lattice foi utilizado, com acetona, etanol e água. Os extratos fenólicos foram obtidos numa proporção amostra-solvente/mistura de solvente de 1:10 à temperatura ambiente sob agitação mecânica (Incubadora TE-420) por 3 h. Seguidos da centrifugação (5000 x g por 10 min), filtração a vácuo e secagem em estufa com circulação de ar a 40 °C, *overnight* (15 h). O planejamento experimental produziu 14 extratos que foram utilizados para avaliação do potencial antioxidante.

2.2.4.3 Teor de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais dos extratos de semente de chia foi determinado de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (SLINKARD; SINGLETON, 1977) com algumas modificações. Uma alíquota de 150 µL do extrato (5 mg/mL em etanol) foi transferida para um tubo de ensaio contendo 60 µL de Folin-Ciocalteu reagente e 2,61 µL de água destilada. A mistura foi agitada e após 1 min foi adicionado 180 µL de Na₂CO₃ (15%). Após a incubação das soluções durante 2 h à temperatura ambiente, as leituras das absorbâncias das misturas foram medidas a 760 nm. O ácido gálico foi usado na curva padrão (0,001-0,020 mg/mL em etanol) e os resultados foram expressos em termos de ácido gálico equivalente (mg EAG/g extrato).

2.2.4.4 Atividade antioxidante pelo sequestro do radical livre DPPH

A atividade de eliminação de radicais livres dos extratos foi determinada com base no método DPPH (RUFINO et al., 2007), com algumas modificações. Uma alíquota de 30 µL do extrato foi adicionada em 3,0 mL de solução diluída de DPPH em etanol (0,0236 mg/mL), agitada e incubada durante 30 min no escuro, e a absorbância foi medida a 517 nm. A curva

padrão foi realizada com Trolox (100-2000 $\mu\text{mol/L}$ em etanol). Os resultados foram expressos em μmol equivalente Trolox (TE)/g extrato.

2.2.4.5 Atividade antioxidante pelo poder redutor do ferro FRAP

A capacidade antioxidante de redução do ferro foi determinada pelo método FRAP (RUFINO et al., 2006), com adaptações. Sob condições de escuridão, o reagente FRAP foi preparado com tampão acetato 300 mmol/L (pH 3,6), 2,4,6-tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) 10 mmol/L em uma solução de HCl 40 mmol/L e FeCl_3 20 mmol/L. Uma alíquota adequada do extrato foi transferida para um tubo de ensaio e adicionado 0,27 mL de água ultrapura e 2,7 mL do reagente FRAP. A mistura foi agitada e mantida num banho de água durante 30 minutos a 37°C. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, amostras e padrões foram lidos a 595 nm. A curva padrão foi realizada com Trolox (100-2000 $\mu\text{mol/L}$ em etanol). Os resultados foram expressos em μmol equivalente Trolox (ET)/g extrato.

2.2.4.6 Perfil dos compostos fenólicos

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com um injetor automático Rheodyne 7125i e um detector UV/VIS. As colunas utilizadas foram uma coluna Shimadzu LC-18 (25 cm x 4,6 mm, 5 μm particle size, da Supelco, Bellefonte, PA) e uma pré-coluna C-18 ODS Shimadzu. Para a identificação dos compostos fenólicos, as amostras foram eluídas com um sistema gradiente que consiste em solvente A (2% ácido acético, v/v) e solvente B (acetonitrila:metanol, 2:1, v/v), utilizados como fase móvel, com um fluxo de 1 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 25 °C e o volume de injeção foi de 20 μL . O sistema de gradiente iniciou-se a partir de 90% A a 0 min, 80% A em 10 min, 70% A em 15 min, 60% A em 25 min, 50% A em 30–40 min, 75% A em 42 min, e 90% A em 44 min. Os picos dos compostos fenólicos foram monitorizados a 280 nm. O software LabSolutions (Shimadzu) foi usado para controlar o sistema de LC-UV e de processamento de dados.

2.2.5 Análises estatísticas

Para o estudo da influência dos homogeneizadores na elaboração de óleo de chia microencapsulado, os resultados serão expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão, utilizando-se análise de variância (ANOVA), o teste de Tukey para identificar diferenças significativas entre as médias ($p > 0,50$) e a correlação de Pearson ($p\text{-valor} < 0,05$). Os dados serão tratados no Programa Action 2.4 (ACTION, 2016).

Para a avaliação da otimização de extração dos compostos fenólicos a partir do planejamento de mistura com diferentes solventes, foi aplicado ANOVA, regressão e superfícies de resposta a partir de modelos ajustados pelo simplex lattice obtidos, utilizando Statistica 7.0 (StatSoft). Para cada resposta, os modelos: linear, quadrático e cúbico foram testados. Adotou-se o modelo mais adequado, com um nível de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos com o desenvolvimento desta pesquisa proporcionaram a elaboração de quatro artigos discriminados a seguir:

Artigo 1: “Chia (*Salvia hispanica* L.): Functional properties - a short review”

Artigo 2: “Caracterização química, nutricional e estudo da estabilidade termo-oxidativa do óleo e sementes de chia (*Salvia hispânica* L.) brasileira”

Artigo 3: “Optimization of the extraction of phenolic compounds from seeds of Brazilian chia using mixture design”

Artigo 4: “Influência do processo de homogeneização na microencapsulação de óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) por spray drying”.

Chia (*Salvia hispanica* L.): Functional properties - a short review

Maristela Alves Alcântara^a; Antonio Gouveia de Souza^a; Nataly Albuquerque dos Santos^{b,c}; Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro^{a,b,c}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, CT, Campus I, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58051-900 João Pessoa, Paraíba, Brazil.

^bDepartamento de Tecnologia de Alimentos, CTDR, Campus I, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58051-900 João Pessoa, Paraíba, Brazil.

^cInstituto UFPB de Desenvolvimento da Paraíba, Campus I, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58051-900 João Pessoa, Paraíba, Brazil.

Abstract

In this article, a review of the functional properties of chia seeds is undertaken. The discussion begins with an overview of their origin, morphology and composition, addressing the results issued for the main components: lipids, proteins, fibers and phenolic compounds. Subsequently, it is covered in fact the current state of knowledge of their functional properties, such as their benefits on human health, possible improvement in the production of meat for human consumption, as well as their use in the preparation of food products.

Keywords: Chia; functional properties; prevention of diseases; antioxidant source.

Contents

1. Introduction
2. Origin, morphology and composition
3. Functional Properties
 - 3.1 Benefits of chia seeds on health
 - 3.1.1 Chia in the prevention of cardiovascular diseases and dyslipidemia
 - 3.1.2 Chia in the prevention of cancer
 - 3.1.3 Chia in weight loss and prevention of obesity
 - 3.1.4 Chia in the protection of oxidative processes
 - 3.1.5 Chia in the prevention and treatment of skin diseases
 - 3.1.6 Chia as an energy supplement
 - 3.2 Benefits of chia seeds on improving meat quality for human consumption

3.3 Benefits of chia seed in the preparation of food products

3.3.1 Chia in bakery products

3.3.2 Chia in the production of edible films

3.3.3 Microencapsulated chia oil in the elaboration of functional foods

4. Conclusions

References

1. Introduction

The seeds of chia (*Salvia hispanica* L.) is an ancient oleaginous used by the Mayans and Aztecs as a food to increase stamina. This seed is a natural source of omega-3 fatty acids, soluble and insoluble fibers and proteins, besides other important nutritional components such as vitamins, minerals and antioxidants.

Due to its functional components, chia offers huge potential for the food industry because, in addition to contributing to human nutrition, reduces the risk of several diseases, such as cardiovascular diseases, inflammatory diseases, diseases of the nervous system, diabetes, among others.

The elaboration of food products with the incorporation of chia seeds is increasingly gaining a place in the market, because of the growing preference of people who try to follow a healthy diet and to benefit from the known properties of the compounds present in chia seed. Currently, there are several applications, as whole seeds, flour or oil, enrichment of bakery products, dairy products, among others.

However, more research on the real properties and benefits of chia seed are necessary, in order to promote their cultivation and technological use.

2. Origin, morphology and composition

Chia (*Salvia hispanica* L.) is an annual herbaceous belonging to the Lamiaceae family, a family in which the plants are often aromatic and they are part of many of the herbs used in cooking as mint, basil, sage, oregano, thyme and rosemary. This plant is native to southern Mexico and northern Guatemala. Its name comes from Nahuatl language, *chian*, which means "oily" and its culture was expanded to all South America (Ayerza & Coates, 2011). Its seeds were an important staple food for Mesoamerican pre-Columbian times, especially being

consumed by the Mayans and Aztecs to increase stamina (Reyes-Caudillo, Tecante, & Valdivia-López, 2008).

Di Sapio, Bueno, Busilacchi, Quiroga, & Severin (2012) established the diagnostic morphological and anatomical characteristics for the leaf, stem, fruit and seeds of chia (*Salvia hispanica* L.). With about 1 meter tall, the plant has simple, opposite leaves, 4-8 cm long and 3-5 cm wide, oval-elliptical blade format, pubescent and acute apex. Because it is a shrubby species, the stem is branched and aromatic, covered with trichomes, as well as the leaves. The flowers are hermaphroditic, purple or white in color, small (3- 4 mm) with petals and part of the flowers are fused, which contributes to a high rate of selfing, being found at the ends of branches. After fertilization, the flowers give rise to fruit, in the form of indehiscent achene, monospermic, oval, soft and shiny, with a grayish black color, with blotches. When immersed in water they yield a gelatinous fluid, due to the presence of mucilage (polysaccharide substance) on the surface. Each fruit carries four quite small seeds, measuring about 2 mm long by 1.5 mm wide, and they are the main way of propagating the species. They are albuminous, with a crosslinked surface displaying a yellow ochre color and occupies the entire volume fruit and consist of three main parts: the seed coat (coating), embryo and endosperm.

Currently, chia seeds are commercially cultivated in Australia, Bolivia, Colombia, Guatemala, Mexico, Peru, Argentina and nowadays Brazil has been gaining ground, especially in the western Parana and northwestern Rio Grande do Sul (Migliavacca, Silva, Vasconcelos, Filho, & Baptistella, 2014).

The chia is intended for human consumption or for animal feed, being found in the market in the form of whole seeds, flour and oil or in commercial applications, including energy drinks, breads, breakfast cereals, cereal bars, pasta and dairy products.

The composition of chia seeds heavily depends on the production location and climate conditions. The plant grows best in tropical and subtropical regions (Ayerza & Coates, 2004), but can also be grown in milder weather. Ayerza (1995) found a strong negative correlation between the temperature of the cultivation area and the unsaturation content, ie the increase in the environment temperature provoked a reduction in the content of polyunsaturated fatty acids. The protein content also tends to decrease as the temperature increases (Ayerza & Coates, 2011).

According to the Official Journal of the European Union (UER, 2013) the nutritional composition of chia seeds can range from 91-96% dry matter, 20-22% proteins, 30-35% lipids, 25-41% carbohydrates, 18-30% crude fiber and 4-6% ash. In addition to the macronutrients, the seeds present considerable micronutrients levels, when compared to other foods (Table 1).

Table 1 - Micronutrientes present in the seeds of chia as compared with other grains.

Nutrientes	Chia	Linseed	Quinoa	Amaranth	Oat	Sunflower
Calcium, mg/100g	631	255	47	159	54	78
Iron, mg/100g	7.72	5.73	4.57	7.61	4.72	5.25
Magnesium, mg/100g	335	392	197	248	177	3255
Phosphorus, mg/100g	860	642	457	557	523	660
Potassium, mg/100g	407	813	563	508	429	645
Zinc, mg/100g	4,58	4,34	3,10	2,87	3,97	5,00
Vitamin C (Ascorbic Acid), mg/100g	1,6	0,6	0	4,2	0	1,4
Vitamin A (Retinol), IU	54	0	14	2	0	50
Vitamin E (α -tocopherol), mg/100g	0,50	0,31	2,44	1,19	0	35,17
Vitamin B3 (Niacine), mg/100g	8,83	3,08	1,52	0,92	0,96	8,34

Source: (USDA, 2015)

The amount of lipids in chia seeds can vary from 30-35% depending on the location, cultivation and environmental conditions (Ayerza & Coates, 2004). Its fatty acid composition mainly includes α -linolenic, linoleic, oleic, palmitic and stearic acids (Ayerza, 1995). The chia oil contains the highest proportion of α -linolenic acid (~ 60%) among all the known plant sources (Ayerza, 1995).

The n-6 / n-3 (omega 6 / omega 3) fatty acids proportion chia oil of 0.29 found by (Ayerza, 2010) is significantly smaller than the one of most vegetable oils such as corn (76.57), rapeseed (2.26), soybean (6.68), sunflower (30.77) and olive oil (17.86) (Tuberoso, Kowalczyk, Sarritzu, & Cabras, 2007). Low n-6 / n-3 ratios have been associated with a reduced risk of cardiovascular disease (Simopoulos, 2004).

According to Ayerza & Coates (2004), chia grain protein content varies from 19% to 23%, depending on the genetics and the environment. This content is higher than other traditional crops such as wheat, corn, rice, oats, barley and amaranth.

Several studies have been performed in the production of isolated proteins, especially from plant sources due to its growing use as ingredients with functional properties that can also improve the nutritional quality of food (Sandoval-Oliveros & Paredes-López, 2013).

Four protein fractions were identified in the seeds of chia, Globulins are the most abundant (54%), followed by albumins (18%), glutelin (7.2%) and prolamins (6.4%) (Orona-Tamayo, Valverde, Nieto-Rendón, & Paredes-López, 2015).

According to a study by Olivos-Lugo, Valdivia-López, & Tecante (2010) the amino acid profile in chia grain allows that it to be a considerable option as protein source, consisting of high levels mainly of arginine, aspartic acid and glutamic acid. According to (USDA, 2015) chia seeds contain the nine essential amino acids (Table 2).

Table 2 - Contents of the amino acids present in chia seeds

Amino acids	g/100g seed
Tryptophan*	0.436
Threonine*	0.709
Isoleucine*	0.801
Leucine*	1.371
Lysine*	0.970
Methionine*	0.588
Cystine	0.407
Phenylalanine*	1.016
Tyrosine	0.563
Valine*	0.950
Arginine	2.143
Histidine*	0.531
Alanine	1.044
Aspartic Acid	1.689
Glutamic Acid	3.500
Glycine	0.943
Proline	0.776
Serine	1.049

*Essential amino acids

Source: (USDA, 2015)

Another point is that grain chia has no gluten, the major protein present in wheat, oats, barley and rye, limiting the intake of these foods on the part of the population with celiac disease. Chia is approved by the Association of Celiacs of Argentina as suitable for use in celiac patients (Ixtaina, 2010).

Currently, research is primarily focused on peptides derived from food protein, because these are known to reveal antioxidant (Sarmadi & Ismail, 2010) and antihypertensive properties (Martínez-Maqueda, Miralles, Recio, & Hernández-Ledesma, 2012). (Orona-Tamayo et al., 2015) studied the inhibitory activity of protein fractions of chia (*Salvia hispanica* L.) against angiotensin converting enzyme I and the antioxidant capacity. This study has shown that chia may be considered a seed with antioxidant potential and as an antihypertensive, important factors for frequent incorporation of chia in the human diet.

The grain chia displays a low content of simple **carbohydrates** and a high amount of complex carbohydrates represented mostly by dietary **fibers** (Olivos-Lugo et al., 2010). Studies have shown a wide variation in the concentration of dietary fibers in chia grain, the levels range from 30% of its total weight, of these, only an average of 3-6% represents soluble fibers, consisting mainly of pulp. The rest is insoluble and is mostly of non-starchy polysaccharides such as cellulose and lignin (Alfredo, Gabriel, Luis, & David, 2009).

The American Dietetic Association recommends a fiber intake for adults of 25-30 g / day with an insoluble / soluble fiber ratio of 3/1 (Borderías, Sánchez-Alonso, & Pérez-Mateos, 2005).

The main physiological effect of fiber is the capacity to swell when it absorbs water, which occurs due to the presence of carbohydrates with free polar groups, interaction with hydrophilic bonds or retention within the matrix (López, Ros, Rincón, Periago, María Jesús Martínez, & Ortuño, 1997). These lead to gel formation and a consequential increase in stool volume, which causes more frequent bowel peristalsis. This in turn facilitates transit of stool transit and intestinal distension, and thus helps to reduce the likelihood of constipation and intestinal tract disorders (Oliveira, Reyes, Sgarbieri, Areas, & Ramalho, 1991).

The fibers also exhibit technological properties which enable their use in food formulation, resulting in modification and improvement of texture during production and storage (Capitani, Spotorno, Nolasco, & Tomás, 2012). Among the technological features, are highlighted the link with fat, gel formation, chelating and texturing actions (Esposito et al., 2005).

The soluble fraction of the fiber contributes to the stabilization of food structure (dispersions, emulsions, etc.) by means of gel formation or thickening of the continuous phase. Moreover, the insoluble fraction increases the firmness of the products and provides a high capacity of fat absorption (Oreopoulou & Tzia, 2007).

As a soluble fiber component, mucilage located on cell structures in the first three seed coat layers and upon complete hydration filaments can be widely applied in food products, since

in that it is a hydrocolloid, has various functions such as ability to retain water, gelling properties, syneresis control, emulsion stabilization, etc.(Phillips & Williams, 2009).

The chia grain has a considerable amount of **phenolic compounds**, which may be present in free form or bound to sugars in glycosidic linkages, and were shown to possess **antioxidant** activity. The antioxidant properties of phenolic compounds are attributed to their ability to scavenge free radicals and to chelate metal ions involved in its production (Fernandez-Panchon, Villano, Troncoso, & Garcia-Parrilla, 2008; Ignat, Volf, & Popa, 2011).

Phenolic compounds are considered as secondary metabolites that are synthesized by plants during normal development (Harborne, 1993) and in response to stress conditions such as infection, injury, UV radiation, among others (Beckman, 2000; Nicholson & Hammerschmidt, 1992). Epidemiological, clinical and in vitro studies show multiple biological effects related to such compounds, such as: antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and anticarcinogenic activities (Daglia, 2012; Manach, Mazur, & Scalbert, 2005; Nagori, Singh, Dewangan, Verma, & Tripathi, 2010; Yang, Landau, Huang, & Newmark, 2001).

Chemically, the phenolic compounds can be defined as substances that possess an aromatic ring bearing one or more hydroxyl groups, including functional derivatives thereof (Naczki & Shahidi, 2004). They are basically divided into several classes, from which the phenolic acids, flavonoids and tannins are considered as the major phenolic compounds in foods (Balasundram, Sundram, & Samman, 2006).

The most important phenolic compounds present in chia seed include chlorogenic and caffeic acids and the flavonoids myricetin, quercetin and kaempferol (Ayerza & Coates, 2001).

Reyes-Caudillo et al. (2008) found that the major phenolic components of crude extracts of Mexican chia seed are kaempferol and quercetin glycosides of quercetin and, moreover, the extracts of the hydrolysates showed significant amounts of the same phenolic compounds in aglycon forms. Recently, Marineli et al. (2014) identified the presence of chlorogenic acid, quercetin, myricetin and decarboxymethyl elenolic acid connected to hydroxytyrosol (3,4-DHPEA-EDA) by sonic-spray ionization mass spectrometry in the positive ion mode ESI (+)-MS and Martínez-Cruz & Paredes-López, (2014) found as the main compounds found in chia by UHPLC the acids rosmarinic, protocatechuic ethyl ester, caffeic and gallic and daidzein.

The phenolic extracts can be applied in food industry, as antimicrobial agents, antioxidants and food stabilizers and several studies related to the phenolic extraction are being conducted. The phenolic compounds can be extracted by different solvents and extraction methods. Solvent extraction is the most common method used to isolate natural antioxidants.

The properties that the solvents play, no doubt, are the key role in the extraction of antioxidant compounds (Rezaie, Farhoosh, Iranshahi, Sharif, & Golmohammadzadeh, 2015).

The measurement of the antioxidant activity of chia seed was accomplished by several methods such scavenging activity of the cation ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), scavenging of the DPPH ((2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical, co-oxidation of β -carotene / linoleic acid (β -CLAMS), in vitro assays of the liposome system peroxidation, iron reducing antioxidant power (FRAP) and oxygen radical absorption capacity of the (ORAC).

The DPPH results in ethanol extracts of chia seeds were reported by Marineli et al. (2014) at $436.61 \pm 9.67 \mu\text{mol TE/g}$ micromol / g and for ABTS by Capitani et al. (2012) and Alfredo et al. (2009) in at 446.4 and 488.8 TEAC $\mu\text{mol/g}$, respectively for the fibrous fraction of the seeds.

The antioxidant activity measured by ORAC system in ethanol extracts showed that chia seeds have high antioxidant capacity both for the hydrophilic fractions, as is already known, as for lipophilic fraction (Marineli et al., 2014).

Sinaloa and Jalisco results on the inhibition of lipid peroxidation in the crude extract of chia seeds suggest that phenols in both extracts have an important activity in the deactivation of singlet oxygen, which could explain the antioxidant potential found in chia seeds (Reyes-Caudillo et al., 2008).

The antioxidant activity of a bioactive compound can be attributed to several mechanisms, including: the prevention of chain initiation, the binding of transition metals catalysts, decomposition of the peroxides, the radical scavenging against oxidative damage of DNA, proteins and lipids (Halliwell, 1994), therefore, the activity determination is performed by various methods.

3. Functional Properties

Functional foods have received great attention in recent years as healthy lifestyle components. The "functional" term is used to refer to a food that is regularly consumed to provide physiological benefits or reduce the risk of chronic diseases added to its essential physiological functions. Important functional foods that need to be consumed on a daily basis are fruits, vegetables and grains; these materials generally provide to the organism a high intake of vitamins, minerals, fibers and phytochemicals (antioxidants and anti-cancer molecules),

which are essential for the proper functioning of the body and the maintenance of health (Pacheco & Sgarbieri, 2001).

In this context, chia seed can be considered a functional food, because it is an excellent source of ω -3 fatty acids, dietary fibers, proteins and other compounds necessary for a healthy diet.

3.1. Chia Benefits on Health

Chia seeds have multiple biological effects that make them useful in the prevention and treatment of some diseases (Table 3). Ulbricht et al. (2009) reported that available human and non-human studies point out that chia displays a possible efficiency to allergies, angina, improvement of athletic performance, cancer, coronary heart disease, heart attack, endocrine / hormonal disorders, hyperlipidemia, hypertension, brain stroke and vasodilation. Some evidences suggest possible anticoagulant, antioxidant and antiviral effects of *Salvia hispanica*.

3.1.1. Chia in preventing cardiovascular disease and dyslipidemia

There are empirical evidence of in vivo studies suggesting a strong inverse relationship between the consumption of whole grains and the risk of diabetes and cardiovascular diseases (Seal, 2006). Many components of the whole grains, including complex carbohydrates, vegetable protein, polyunsaturated fatty acids, especially ω -3, fibers, minerals, antioxidants and their combined effect could be responsible for the reduction of such diseases in which diets containing chia seeds may reduce risk factors for cardiovascular disease.

The cardioprotective effects of chia may be due in part to a variety of actions, including a favorable impact of serum lipid profile and the inhibition of oxidation of low-density lipoprotein, known as LDL cholesterol. Ayerza & Coates (2005) showed a decrease of triacylglyceride (TG) and increases in HDL cholesterol levels in the plasma of rats fed chia oil. In 2007, the same authors carried out a study on 32 male Wistar rats, to determine whether the α -linolenic fatty acid found in chia seeds would positively influence serum lipid parameters. They concluded that the diet with the whole seed significantly reduced the serum levels of triglycerides and increased HDL levels. All diets with the seeds significantly improved fatty acid levels in blood plasma.

Table 3 – Properties and effects on health obtained with the inclusion chia and its derivatives in diets.

Effect on health	Diet Inclusion	Delineation	Results	Reference
Improvement in the cardiovascular risk factors	Oil	Study with 32 male Wistar rats	Reduction of triacylglyceride in blood plasma and increased HDL levels.	Ricardo Ayerza & Coates (2007)
	Seeds	Crossed study with 20 subjects with type 2 diabetes	Reduction in systolic blood pressure (SBP) and reductions in glycated hemoglobin and fibrinogen	Vuksan et al. (2007)
Blood pressure improvements	Seeds	Randomized, double-blind, study controlled in 11 healthy subjects	A reduction in postprandial glycemia was observed with all doses of chia seeds, justifying a decrease in blood pressure	Vuksan et al. (2010)
Protection in vascular function	Oil	Study with hypercholesterolemic rabbits	Protection in the vascular function against deleterious effects of early hypercholesterolemia	Sierra, Roco, Alarcon, & Medina (2015)
Dyslipidemia and insulin resistance	Seeds	Study with Wistar rats for 3 weeks	Beneficial effect on glycidic and lipid homeostasis in an experimental model of dyslipidemia and insulin resistance.	Chicco, D'Alessandro, Hein, Oliva, & Lombardo (2009)

Antitumor effects	Oil	Experimental study in animals	Decreased tumor weight and number of metastases	Espada, Berra, Martinez, Eynard, & Pasqualini (2007)
Weight loss and obesity prevention	Flour	Study in overweight middle-aged men and women with grade I for 12 weeks	Significant reduction in weight and waist circumference	Toscano, Toscano, Tavares, Oliveira, & Silva (2015)
Protection against oxidative processes	Seeds and oil	Experiment with 36 obese Wistar rats	Reduced the <i>in vivo</i> oxidative process as it improved the antioxidant state and reduced the lipid peroxidation	Marineli, Lenquiste, Moraes, & Maróstica (2015)
Prevention and treatment of skin diseases	Oil	5 healthy patients with pruritus and 5 with terminal renal failure / diabetes, also with pruritus underwent a topical formulation containing 4% chia oil applied for 56 days	There was a significant improvement in symptoms without the appearance of adverse effects and improving the epidermal permeability barrier and skin hydration	Jeong, Park, Park, & Kim (2010)
	Cha seed extract	Extract solubilized in a mixture of dimethyl sulfoxide (DMSO) and pentylene glycol (PG)	Inhibiting melanin biosynthesis in Melan-a cells	Diwakar et al. (2014)
Energy supplement	Oil	Crossed study	Although there was no improvement in the performance, part of the carbohydrates may be replaced by omega 3 present in chia oil.	Illian, Casey, & Bishop (2011)

A crossover study conducted by Vuksan et al. (2007) was performed to determine whether the addition of chia, rich in fibers, α -linolenic acid and minerals, is associated with the improvement of cardiovascular risk factors in 20 individuals with type 2 diabetes. The participants were randomly assigned to receive 37 ± 4 g / day of wheat bran or *Salvia* for 12 weeks, while maintaining their conventional diabetes therapy. Compared with the control treatment, *Salvia* reduced systolic blood pressure (SBP) to 6.3 ± 4 mm Hg, high sensitivity C-reactive protein to $40\% \pm 1.6$ mg/l and von Willebrand factor for 21 ± 0.3 %. There was also a reduction in glycated hemoglobin and fibrinogen, and there were no changes in safety parameters, including liver, kidney, hemostatic function, and body weight.

Later Vuksan et al. (2010) evaluated whether whole grains of Salba (*Salvia hispanica* L.) reduce postprandial glycemia in healthy individuals, as a possible explanation for its cardioprotective effects observed in individuals with diabetes. The study utilized a controlled randomized, double-blind design, in which 11 healthy subjects (6 males and 5 females, body mass index of 22.3 ± 2.8 kg/m²kg) received 0, 7, 15 or 24 g of Salba baked on white bread. A dose response reduction in postprandial glycemia was noticed with all three doses of Salba. The decrease in postprandial glycemia provides a possible explanation for the improvements in blood pressure, coagulation and inflammatory markers previously observed after Salba supplementation for 12 weeks in patients with type 2 diabetes.

Poudyal, Panchal, Waanders, Ward, & Brown (2012) assessed whether supplementation of chia seeds attenuate metabolic, cardiovascular and liver signals in rats subjected to a diet rich in fat and carbohydrates for 8 weeks. An improved insulin sensitivity and glucose tolerance were demonstrated, besides reduced visceral adiposity, hepatic steatosis and cardiac and hepatic inflammation. There were no changes in the levels of plasma lipids and blood pressure.

Sierra et al. (2010) demonstrated the effects of dietary supplementation with chia oil in hypercholesterolemic rabbits vascular function. The data show that chia oil can protect the vascular function against deleterious effects of early hypercholesterolemia, moreover, can improve the of vascular endothelium-dependent relaxation and to reduce the vascular contractility induced by the agonist even in the presence of high cholesterol levels .

In order to verify the benefits of ingesting seeds of chia (*Salvia hispanica* L.), rich in α -linolenic acid and fibers, for dyslipidemia and insulin resistance (IR) induced by the intake of a diet rich in sucrose (62.5%), Chicco et al. (2009) divided into two sets their experiments. They were designed: (i) to study the prevention of appearing dyslipidemia and IR in rats fed for 3 weeks on a diet in which chia seeds were the food source of fat; (ii) to analyze the effectiveness of chia seeds to improve or reverse the metabolic changes above described. The

results showed the beneficial effect of chia seeds on the glucose and lipid homeostasis in an experimental model of dyslipidemia and IR.

3.1.2. Chia in preventing cancer

Several experimental studies have shown that the polyunsaturated fatty acids and their metabolites exert antitumor effects, possibly affecting gene expression or molecules of signal transduction involved in the control of cell growth, differentiation, apoptosis, angiogenesis, metastases, immune system and inflammation (Nishimura et al., 2002; Rodríguez-Cruz, Tovar, del Prado, & Torres, 2005).

There is preliminary evidence that chia seed oil can be an effective anticancer agent. In a study conducted by Espada, Berra, Martinez, Eynard, & Pasqualini (2007), the authors investigated the effects of polyunsaturated fatty acids on the growth and the formation of the metastasis of adenocarcinoma of murine mammary gland. For this study were used *Salvia hispanica* and *Carthamus tinctorius*, as sources of ω -3 sources and ω -6 vegetable oil in a commercial diet as control. The diet with *Salvia* decreased the tumor weight and the number of metastases. Apoptosis and T-lymphocytes infiltration were higher, followed by a decrease in mitosis with respect to the other diets. The data of this animal experimental study showed that *Salvia* inhibits growth and metastasis in this tumor model.

3.1.3. Chia in weight loss and prevention of obesity

Epidemiological studies reveal that obesity, in addition to being defined as a disease, is an important risk factor for type 2 diabetes mellitus, blood hypertension, dyslipidemia, myocardial infarction and stroke (Hekimsoy & Oktem, 2003; Pontiroli & Galli, 1998).

The high levels of fibers found in the seeds of chia may be important to weight loss and hence to control obesity. It is well known that dietary fiber can promote weight loss by improving the lipid profile and blood glucose and blood pressure reduction (Babio, Balanza, Basulto, Bulló, & Salas-Salvadó, 2010; Lattimer & Haub, 2010). These fibers may lead to weight loss by delaying gastric emptying and increasing the secretion of intestinal hormones that promote satiety (Anderson et al., 2009).

In 2009, Nieman et al. conducted a randomized, double-blind study that evaluated the efficacy of chia seed versus placebo in weight loss and the relevant risk factors in 90 subjects for 12 weeks. Pre and post-study measurements with mass and body composition, fasting inflammatory blood markers (C-reactive protein, interleukin 6, monocyte chemoattractant

protein-1 and tumor necrosis factor alpha, markers of oxidative stress, blood pressure and serum lipid profile. All these measurements did not differ between the groups.

Many studies seem inadequate to determine the impact of chia on weight loss, some of them in which the properties of chia were tested for blood pressure, lipid profile, or glucose, inflammation and oxidative stress. Body weight or waist circumference were treated as a secondary variable. But a study proposed by Guevara-cruz et al. (2012) showed that chia promoted reduction in waist circumference. In this study, the authors observed a reduction in serum triglycerides and glucose intolerance in patients with metabolic syndrome by a dietary pattern including nopal, chia seed, soybean protein and oat.

Later, Toscano, Toscano, Tavares, Oliveira, & Silva (2015) effectively investigated the supplementation with chia flour (*Salvia hispanica* L.) for 12 weeks on body composition in middle-aged men and women with overweight and class I. In addition, lipid profile and blood glucose were evaluated. The authors concluded that the consumption of chia for 12 weeks produced a significant reduction in weight and waist circumference and improved the lipid profile, depending on the initial values.

3.1.4. Chia in protecting oxidative processes

An investigation conducted by Marineli et al. (2015) was performed to test the hypothesis that chia intake can protect against oxidative stress, glucose tolerance, and complications associated to the excessive consumption of a diet rich in fat and high fructose content. The investigation was conducted in diet-induced obese rats. The system of expression of heat shock proteins (HSP) can be involved in the protective mechanism. The results showed that the used diet induced glucose intolerance, insulin resistance and oxidative stress. The consumption of chia seeds or chia oil did not reduce the weight gain or abdominal fat accumulation, however, chia oil induced the increase the expression of HSP70 and HSP25, which are responsible for protecting against glucose and insulin intolerance induced by a high fat content (Chung et al., 2008).

With the purpose of evaluating the antioxidant effects of chia seed and chia oil on liver and plasma in diet-induced obese rats Marineli et al. (2015), conducted an experiment with thirty-six Wistar rats, in which they were divided into six groups (6 animals each): the control group was fed the American Institute of Nutrition (AIN) -93 M; HFF group was fed a high-fat, high fructose diet; groups received diet and chia seed oil in short (6 weeks) and long periods (12 weeks). Liver and plasma antioxidant capacity values were increased in groups of chia seeds and chia oil about 35% and 47%, respectively, compared to the HFF group. The groups

containing chia showed similar antioxidant potential, regardless of the time of treatment. The authors concluded that the diet with chia seed and chia oil reduced in vivo oxidative stress, as improved the antioxidant status and reduced lipid peroxidation in diet-induced obese rats.

3.1.5. Chia the prevention and treatment of skin diseases

The polyunsaturated fatty acids, especially the fatty acids α -linolenic acid and linoleic acid, have been extensively evaluated both for nutritional benefits and for cosmetics. They have been used in the treatment of various skin disorders, such as hyperpigmentation (Ando et al., 1999).

Diwakar et al. (2014) studied the inhibitory effect of a new combination of extracts of seeds of chia (*Salvia hispanica*) and pomegranate fruit (*Punica granatum*) on production of melanin. In this study, the effect of chia seed extract, rich in ω -3 (linolenic acid) and ω -6 (linoleic acid), and its ability to affect melanogenesis were examined. Chia seed extract inhibited the melanin biosynthesis in Melan-a cells, however, linoleic and α -linolenic acids alone does not effectively reduce the melanin content. The investigation of the possible mechanism of action showed that the chia seed extract downregulates the expression of genes involved in melanogenesis (Tyr, Tyrp1 and MC1R), alone and in combination with pomegranate extract. This suggests that inhibition of melanin biosynthesis by the combination of extracts is possibly due to downregulation of melanogenic gene expression.

In order to investigate the possible beneficial effects of topical application of chia oil, a study was performed in Korea by Jeong, Park, Park, & Kim (2010). Five healthy patients with pruritus and five patients with end-stage renal disease ESRD or diabetes, also with pruritus underwent a topical formulation containing 4% chia seed oil applied for a period of 8 weeks. After this period, occurred a significant amelioration of the symptoms without the appearance of adverse effects. The improvement of the epidermal permeability barrier and skin hydration were observed.

3.1.6. Chia as an energy supplement

A crossover study by Illian, Casey, & Bishop (2011) was carried out in Alabama, United States. It aimed to determine if omega 3 chia seed is a viable option to improve sports performance in events lasting more than 90 minutes and allow the athletes to reduce their sugar intake. The six selected athletes had similar performance, with no statistically significant difference when conventionally supplemented with carbohydrates or carbohydrates and omega

3. The conclusion of this study was that, although there was no improvement in the performance, part of the carbohydrates may be replaced by omega 3 from chia.

3.2. Chia seed benefits on improving meat quality for human consumption

Animal food play an important role in the nutritional quality of the meat for human consumption. The energy level, the proportion of protein-lipid-carbohydrate, and the profile of fatty acids in the diet of these animal influence the composition of animal tissues. Various strategies have been tested to improve the nutritional profile of meat to treat major concerns to public health, as the increase of polyunsaturated fatty acids ω -3 and conjugated linoleic acid (CLA) (Urrutia et al., 2015).

Coates & Ayerza (2009) studied the seeds of chia (*Salvia hispanica* L.) as a source of ω -3 fatty acids for pigs in the finishing phase and their effects on fatty acid composition and stability of the meat fat and internal fat, growth performance, and sensory characteristics of the meat. The authors found that addition of 10 to 20% chia seed in the pig diet modified the fatty acid composition of fat in meat, but not the internal fat. The α -linolenic acid content and sensory preference for aroma and flavor of the meat have been increased.

Urrutia et al. (2015) studied the effects of flaxseed or chia seeds in a food supplementation on the development of adipose tissue, fatty acid composition and lipogenic gene expression in lambs. Thirty-one male lambs of Navarra breed (56.5 ± 1.6 days old) were weaned at 16.8 ± 0.3 kg live weight and randomly divided into three dietary groups: a diet control group fed with barley and soybeans (C); C diet with 10.5% linseed (L) and C diet with 10% Chia seed (Chia). The lambs were created collectively in pens (4 weeks) and slaughtered at an average weight of about 26.6 ± 0.2 kg. The results indicated that supplementation of the diet of lambs with any flaxseed flax or chia, both rich in α -linolenic acid (ALA), had no effect on growth parameters, however, there was increase of ALA, the eicosapentaenoic acid (EPA), and total content of ω -3 fatty acid. The authors suggest that changes in fatty acid composition caused the diet with flaxseed and chia seeds are partly mediated by the regulation of several genes involved in lipogenesis and tissue specific regulation.

3.3. Chia seed benefits in the preparation of food products

It is well documented that chia seeds have functional components as antioxidants, proteins, fibers and polyunsaturated fatty acids, what makes their incorporation into food products desired. However, a major challenge for the development of enriched food products

is to adapt the product to the needs of each individual through the consumption of nutritional foods, but remain with pleasant organoleptic characteristics.

3.3.1. Chia in bakery products

A number of reports in the literature show the benefits of chia flour for the preparation of bakery products. Verdú et al. (2015) studied the physicochemical effects of flour from seeds of chia seed (*Salvia hispanica*) in each phase of the baking process and product storage. Wheat flour with three different degrees of substitution (5%, 10% and 15%) by chia flour were tested. The results showed that the addition of chia improved gas retention in the dough of bread and reduced the time required to achieve maximum dough development. A delay in toughness and water loss during storage of the bread was also observed. The authors suggest that the mucilage provided by chia may explain these effects observed due to the influence on water retention capacity and its interactions with gluten proteins along the formation of the gluten matrix process.

Borneo, Aguirre, & León (2010), evaluated how the replacement of eggs or oil in a cake formulation by chia gel (25%, 50% and 75%) would affect the nutritional content, the basic functional properties and sensory characteristics of the product, compared with the control of oil and egg, and observed that the replacement of eggs or oil in the cake formulation per chia gel up to a level of 25% retained the functional and sensory characteristics of the product.

In order to evaluate the potential of chia seed gel as a fat substitute in bakery products, Felisberto et al. (2015) investigated the effects of replacing 25, 50, 75 and 100 g / 100 g of vegetable fat by chia mucilage gel on the technological properties of English cakes. The gel was produced by rehydration with water of lyophilized chia mucilage. The replacement of vegetable fat by gel did not significantly alter the specific volume activity, symmetry, uniformity, moisture and water activity of the cakes. The color parameters, as well as the firmness of the cake crumbs were affected by higher levels of fat replacement. It was concluded that the replacement of up to 25 g / 100 g of fat by the gel is technologically feasible in English cakes, without significant changes in their quality characteristics.

3.3.2. Chia in the production of edible films

The mucilage present in chia seeds, as it has the ability to achieve the control of water and modular texture in a huge variety of foods, can also be used to produce edible films in combination with whey protein concentrate.

Muñoz, Aguilera, Rodriguez-Turienzo, Cobos, & Diaz (2012) studied the microstructural, physical and functional properties of thin films (90-110 μm) made from mixtures of mucilage of *Salvia hispanica* (MC) and whey protein concentrate (WPC). The results showed that the edible films formed with mixtures of MC and WPC in 1: 3 and 1: 4 proportions showed good mechanical properties and low water vapor permeability. Thus it is shown as an excellent carbohydrate to modify and improve the physical properties of edible films that combine the hydrophilic components MC and WPC.

3.3.3. Microencapsulated chia oil in the development of functional foods

Microencapsulated oils rich in essential fatty acids have been increasingly used as ingredients in functional foods (breads, cake mixes, gelatin desserts, pet foods, breakfast cereals, etc.).

Microencapsulated chia oil has been the target of research, once its fatty acid profile, although nutritionally favorable in the preparation of foods and with a high degree of unsaturation, it is very susceptible to oxidation. Oxidation leads to the formation of unpleasant tastes and odors, and consequently to the reduction of product shelf life, besides promoting the generation of free radicals, which may have adverse physiological effects on the body (Ahn et al., 2008). Thus, in order to delay the oxidation process and maintain its stability and nutritional properties, the microencapsulation process has been studied.

The literature reports several studies of drying chia oil by atomization. Rodea-González et al. (2012) studied the encapsulation of the essential oil of chia (*Salvia hispanica* L.) by spray-drying in matrices of whey protein concentrate and polysaccharide. This study reports an approach for obtaining stable emulsions of chia oil in water. Such emulsions, after spray drying provided morphological microcapsules with good encapsulation efficiency. Later, Ixtaina, Julio, Wagner, Nolasco, & Tomás (2015) performed a physical-chemical characterization and verified the stability of chia oil microencapsulated with sodium caseinate and lactose by spray drying. The results show that the microencapsulation process is efficient (> 90%) and allows the achievement of a high degree of core retention (oil). With respect to the oxidative stability, microencapsulation offered protection against oil oxidation during storage, in which where it was possible to obtain for the microencapsulated chia oil a peroxide value <10 meq / kg oil after 100 days storage at 20 ± 2 ° C and 33% relative humidity. Martínez et al. (2015) also studied the oxidative stability of microencapsulated oil of chia (*Salvia hispanica* L.) by spray drying. This study was intended primarily to evaluate the use of maltodextrin in combination with hydroxypropyl methylcellulose as wall materials for the microencapsulation of both nut

oil and chia oil by spray drying and also the effect of rosemary extract on the oxidative stability of the microencapsulated oils in prolonged storage conditions. The results showed that after a storage of 45 days, chia oil microencapsulated with rosemary extract had a lower formation of primary oxidation compounds than the control without additives, emphasizing the protective effect of the antioxidant.

Given the above considerations, microencapsulated chia oil is shown to be alternative of incorporating omega-3 fatty acids in various food matrices and with a high oxidative stability.

4. Conclusion

It is proven that the chia (*Salvia hispanica* L.) is a good source of omega-3 fatty acid, as well as fibers and proteins, and it presents high levels of phenolic compounds with antioxidant activity. These properties make it attractive in the whole world as a functional food with high nutritional impact, but with benefits to human health which are not entirely clear to human health that still need further investigation.

More research to enable better understanding and identification of benefits, especially in the area of human health, seed limitations and potential applications of its components are necessary.

References

- Ahn, J.-H., Kim, Y.-P., Lee, Y.-M., Seo, E.-M., Lee, K.-W., & Kim, H.-S. (2008). Optimization of microencapsulation of seed oil by response surface methodology. *Food Chemistry*, 107(1), 98–105.
- Alfredo, V.-O., Gabriel, R.-R., Luis, C.-G., & David, B.-A. (2009). Physicochemical properties of a fibrous fraction from chia (*Salvia hispanica* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 42(1), 168–173.
- Anderson, J. W., Baird, P., Davis Jr, R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., ... Williams, C. L. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*, 67(4), 188–205.

- Ando, H., Funasaka, Y., Oka, M., Ohashi, a, Furumura, M., Matsunaga, J., ... Ichihashi, M. (1999). Possible involvement of proteolytic degradation of tyrosinase in the regulatory effect of fatty acids on melanogenesis. *J Lipid Res.*, 40(7), 1312–1316.
- Ayerza, R. (1995). Oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.), from five northeastern locations in northwestern Argentina. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72(9), 1079–1081.
- Ayerza, R. (2010). Effects of seed color and growing locations on fatty acid content and composition of two chia (*Salvia hispanica* L.) genotypes. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(10), 1161–1165.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2001). *Chia seeds: New source of omega-3 fatty acids, natural antioxidants and dietetic fiber*. AZ, USA: Southwest Center for Natural Products Research & Commercialization Office of Arid Lands Studies, The University of Arizona.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2004). Composition of chia (*Salvia hispanica*) grown in six tropical and subtropical ecosystems of South America. *Tropical Science*, 44(3), 131–135.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2005). *Chia rediscovering a forgotten crop of the aztecs*. Tucson: University of Arizona.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2005). Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. *Nutrition Research*, 25(11), 995–1003.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2011). Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Industrial Crops and Products*, 34(2), 1366–1371.
- Babio, N., Balanza, R., Basulto, J., Bulló, M., & Salas-Salvadó, J. (2010). Dietary fibre: Influence on body weight, glycemic control and plasma cholesterol profile. *Nutricion Hospitalaria*, 25(3), 327–340.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203.

- Beckman, C. H. (2000). Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(3), 101–110.
- Borderías, a. J., Sánchez-Alonso, I., & Pérez-Mateos, M. (2005). New applications of fibres in foods: Addition to fishery products. *Trends in Food Science and Technology*, 16(10), 458–465.
- Borneo, R., Aguirre, A., & León, A. E. (2010). Chia (*Salvia hispanica* L) Gel Can Be Used as Egg or Oil Replacer in Cake Formulations. *Journal of the American Dietetic Association*, 110(6), 946–949.
- Capitani, M. I., Spotorno, V., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2012). Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT - Food Science and Technology*, 45, 94–102.
- Chicco, A. G., D'Alessandro, M. E., Hein, G. J., Oliva, M. E., & Lombardo, Y. B. (2009). Dietary chia seed (*Salvia hispanica* L.) rich in α -linolenic acid improves adiposity and normalises hypertriacylglycerolaemia and insulin resistance in dyslipaemic rats. *British Journal of Nutrition*, 101(01), 41.
- Chung, J., Nguyen, A., Henstridge, D. C., Holmes, A. G., Chan, M. H. S., Mesa, J. L., ... Febbraio, M. A. (2008). HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(5), 1739–44.
- Coates, W., & Ayerza, R. (2009). Chia (*Salvia hispanica* L.) seed as an n-3 fatty acid source for finishing pigs: Effects on fatty acid composition and fat stability of the meat and internal fat, growth performance, and meat sensory characteristics. *Journal of Animal Science*, 87, 3798–3804.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174–81.
- Di Sapio, O., Bueno, M., Busilacchi, H., Quiroga, M., & Severin, C. (2012). Caracterización Morfoanatómica de Hoja, Tallo, Fruto y Semilla de *Salvia hispanica* L. (*Lamiaceae*).

Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas, 11(3), 249–268.

- Diwakar, G., Rana, J., Saito, L., Vredevel, D., Zemaitis, D., & Scholten, J. (2014). Inhibitory effect of a novel combination of *Salvia hispanica* (chia) seed and *Punica granatum* (pomegranate) fruit extracts on melanin production. *Fitoterapia*, 97, 164–171.
- Espada, C. E., Berra, M. a., Martinez, M. J., Eynard, A. R., & Pasqualini, M. E. (2007). Effect of Chia oil (*Salvia Hispanica*) rich in ω -3 fatty acids on the eicosanoid release, apoptosis and T-lymphocyte tumor infiltration in a murine mammary gland adenocarcinoma. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 77(1), 21–28.
- Esposito, F., Arlotti, G., Bonifati, A. M., Napolitano, A., Vitale, D., & Fogliano, V. (2005). Antioxidant activity and dietary fibre in durum wheat bran by-products. *Food Research International*, 38(10), 1167–1173.
- Felisberto, M. H. F., Wahanik, A. L., Gomes-Ruffi, C. R., Clerici, M. T. P. S., Chang, Y. K., & Steel, C. J. (2015). Use of chia (*Salvia hispanica* L.) mucilage gel to reduce fat in pound cakes. *LWT - Food Science and Technology*, 63(2), 1049–1055.
- Fernandez-Panchon, M. S., Villano, D., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. (2008). Antioxidant Activity of Phenolic Compounds: From In Vitro Results to In Vivo Evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(7), 649–671.
- Guevara-cruz, M., Tovar, A. R., Aguilar-salinas, C. a, Medina-vera, I., Gil-zenteno, L., Herna, I., ... Torres, N. (2012). A Dietary Pattern Including Nopal , Chia Seed , Soy Protein , and Oat Reduces Serum Triglycerides and Glucose Intolerance in Patients with Metabolic Syndrome. *The Journal of Nutrition*, 142, 64–69.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*, 52, 253–265.
- Harborne, J. B. (1993). *Introduction to Ecological Biochemistry* (4th ed.). London: Academic Press.

- Hekimsoy, Z., & Oktem, I. K. (2003). Duration of obesity is not a risk factor for type 2 diabetes mellitus, arterial hypertension and hyperlipidemia. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 5(6), 432–437.
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821–1835.
- Illian, T. G., Casey, J. C., & Bishop, P. A. (2011). Omega 3 Chia seed loading as a means of carbohydrate loading. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 25(1), 61–65.
- Ixtaina, V. Y. (2010). *Caracterización de la semilla e el aceite de chía (Salvia hispanica L.) obtenido mediante distintos procesos: aplicación en tecnología de alimentos*. La Plata: Universidad Nacional de La Plata.
- Ixtaina, V. Y., Julio, L. M., Wagner, J. R., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2015). Physicochemical characterization and stability of chia oil microencapsulated with sodium caseinate and lactose by spray-drying. *Powder Technology*, 271, 26–34.
- Jeong, S. K., Park, H. J., Park, B. D., & Kim, I.-H. (2010). Effectiveness of Topical Chia Seed Oil on Pruritus of End-stage Renal Disease (ESRD) Patients and Healthy Volunteers. *Annals of Dermatology*, 22(2), 143.
- Lattimer, J. M., & Haub, M. D. (2010). Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients*, 2(12), 1266–1289.
- López, G., Ros, G., Rincón, F., Periago, María Jesús Martínez, C., & Ortuño, J. (1997). Propiedades funcionales de la fibra dietética. Mecanismos de acción en el tracto gastrointestinal. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 47(3), 203–207.
- Manach, C., Mazur, A., & Scalbert, A. (2005). Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, 16(1), 77–84.
- Marineli, R. D. S., Lenquiste, S. A., Moraes, É. A., & Maróstica, M. R. (2015). Antioxidant potential of dietary chia seed and oil (*Salvia hispanica* L.) in diet-induced obese rats. *Food Research International*, 76, 666–674.

- Marineli, R. D. S., Moraes, É. A., Lenquiste, S. A., Godoy, A. T., Eberlin, M. N., & Maróstica Jr, M. R. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 1–7.
- Marineli, R. D. S., Moura, C. S., Moraes, É. A., Lenquiste, S. A., Barboza Lollo, P. C., Morato, P. N., ... Maróstica, M. R. (2015). Chia (*Salvia hispanica* L.) enhances HSP, PGC-1 α expressions and improves glucose tolerance in diet-induced obese rats. *Nutrition*, 31, 740–748.
- Martínez, M. L., Curti, M. I., Rocchia, P., Llabot, J. M., Penci, M. C., Bodoira, R. M., & Ribotta, P. D. (2015). Oxidative stability of walnut (*Juglans regia* L.) and chia (*Salvia hispanica* L.) oils microencapsulated by spray drying. *Powder Technology*, 270, 271–277.
- Martínez-Cruz, O., & Paredes-López, O. (2014). Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) by ultra high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1346, 43–48.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I., & Hernández-Ledesma, B. (2012). Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Food & Function*, 3(4), 350–361.
- Migliavacca, R. A., Silva, T. R. B. da, Vasconcelos, A. L. S. de, Filho, W. M., & Baptistella, J. L. C. (2014). O cultivo da chia no Brasil: futuro e perspectivas. *Journal of Agronomic Sciences*, 3, 161–179.
- Muñoz, L. a., Aguilera, J. M., Rodriguez-Turienzo, L., Cobos, A., & Diaz, O. (2012). Characterization and microstructure of films made from mucilage of *Salvia hispanica* and whey protein concentrate. *Journal of Food Engineering*, 111(3), 511–518.
- Naczk, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 95–111. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.059>
- Nagori, K., Singh, M. K., Dewangan, D., Verma, V. K., & Tripathi, D. K. (2010). Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. *Journal Of Chromatography*, 2(5), 122–130.
- Nicholson, R. L., & Hammerschmidt, R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 30, 369–389.

- Nieman, D. C., Cayea, E. J., Austin, M. D., Henson, D. a., McAnulty, S. R., & Jin, F. (2009). Chia seed does not promote weight loss or alter disease risk factors in overweight adults. *Nutrition Research*, 29(6), 414–418.
- Nishimura, K., Tsumagari, H., Morioka, A., Yamauchi, Y., Miyashita, K., Lu, S., ... Yokota, K. (2002). Regulation of apoptosis through arachidonate cascade in mammalian cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 102-103(1-6), 239–50.
- Oliveira, S. P., Reyes, F. G. R., Sgarbieri, V. C., Areas, M. A., & Ramalho, A. C. (1991). Nutritional Attributes of a Sweet Corn Fibrous Residue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(4), 740–743.
- Olivos-Lugo, B. L., Valdivia-López, M. Á., & Tecante, A. (2010). Thermal and physicochemical properties and nutritional value of the protein fraction of Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.). *Food Science and Technology International = Ciencia Y Tecnología de Los Alimentos Internacional*, 16(1), 89–96.
- Oreopoulou, V., & Tzia, C. (2007). Utilization of Plant By-Products for the Recovery of Proteins, Dietary Fibers, Antioxidants, and Colorants. In V. Oreopoulou & W. Russ (Eds.), *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry* (pp. 209–232). US: Springer.
- Orona-Tamayo, D., Valverde, M. E., Nieto-Rendón, B., & Paredes-López, O. (2015). Inhibitory activity of chia (*Salvia hispanica* L.) protein fractions against angiotensin I-converting enzyme and antioxidant capacity. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 236–242.
- Pacheco, M. T. B., & Sgarbieri, V. C. (2001). Alimentos funcionais: conceituação e importância na saúde humana. In *Anais do I Simpósio Brasileiro sobre os Benefícios da Soja para a Saúde Humana -Documentos 169*. Londrina, PR: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- Phillips, G. O., & Williams, P. A. (2009). Introduction to Food Hydrocolloids. *Handbook of Hydrocolloids*, 1–22.

- Pontiroli, A. E., & Galli, L. (1998). Duration of obesity is a risk factor for non-insulin-dependent diabetes mellitus, not for arterial hypertension or for hyperlipidaemia. *Acta Diabetologica*, 35, 130–136.
- Poudyal, H., Panchal, S. K., Waanders, J., Ward, L., & Brown, L. (2012). Lipid redistribution by α -linolenic acid-rich chia seed inhibits stearoyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(2), 153–162.
- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., & Valdivia-López, M. A. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107(2), 656–663.
- Rezaie, M., Farhoosh, R., Iranshahi, M., Sharif, A., & Golmohammadzadeh, S. (2015). Ultrasonic-assisted extraction of antioxidative compounds from Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *mutica*) hull using various solvents of different physicochemical properties. *Food Chemistry*, 173, 577–583.
- Rodea-González, D. A., Cruz-Olivares, J., Román-Guerrero, A., Rodríguez-Huezo, M. E., Vernon-Carter, E. J., & Pérez-Alonso, C. (2012). Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. *Journal of Food Engineering*, 111(1), 102–109.
- Rodríguez-Cruz, M., Tovar, A. R., del Prado, M., & Torres, N. (2005). Molecular mechanisms of action and health benefits of polyunsaturated fatty acids. *Revista de Investigación Clínica*, 57(3), 457–472.
- Sandoval-Oliveros, M. R., & Paredes-López, O. (2013). Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(1), 193–201.
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949–1956.
- Seal, C. J. (2006). Whole grains and CVD risk. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 65(1), 24–34.

- Sierra, L., Roco, J., Alarcon, G., Medina, M., Van Nieuwenhove, C., Peral de Bruno, M., & Jerez, S. (2010). Reduction in postprandial glucose excursion and prolongation of satiety: possible explanation of the long-term effects of whole grain Salba (*Salvia Hispanica* L.). *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(4), 436–438.
- Silva, C., Garcia, V. A. S., & Zanette, C. M. (2016). Chia (*Salvia hispanica* L.) oil extraction using different organic solvents : oil yield , fatty acids profile and technological analysis of defatted meal. *Research, Journal International Food*, 23(3), 998–1004.
- Simopoulos, A. P. (2004). Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acid Ratio and Chronic Diseases. *Food Reviews International*, 20(1), 77–90.
- Toscano, L. T., Toscano, L. T., Tavares, R. L., Oliveira, C. S., & Silva, A. S. (2015). Chia induces clinically discrete weight loss and improves lipid profile only in altered previous values. *Nutrición Hospitalaria*, 31(3), 1176–1182.
- Tuberoso, C. I. G., Kowalczyk, A., Sarritzu, E., & Cabras, P. (2007). Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Food Chemistry*, 103(4), 1494–1501.
- UER (Unión Europea). (2013). Autorización de la comercialización de semillas de chía (*Salvia hispanica*) como nuevo ingrediente alimentario con arreglo al Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. Retrieved November 9, 2015, from <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:021:0034:0035:ES:PDF>
- Ulbricht, C., Chao, W., Nummy, K., Rusie, E., Tanguay-Colucci, S., Iannuzzi, C. M., ... Weissner, W. (2009). Chia (*Salvia hispanica*): a systematic review by the natural standard research collaboration. *Reviews on Recent Clinical Trials*, 4(3), 168–174.
- Urrutia, O., Soret, B., Insausti, K., Mendizabal, J. a., Purroy, A., & Arana, A. (2015). The effects of linseed or chia seed dietary supplementation on adipose tissue development, fatty acid composition, and lipogenic gene expression in lambs. *Small Ruminant Research*, 123(2-3), 204–211.

- USDA (United States Department of Agriculture). (2015). National Nutrient Database for Standard Reference Release 28. Retrieved November 9, 2015, from <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search>
- Verdú, S., Vásquez, F., Ivorra, E., Sánchez, A. J., Barat, J. M., & Grau, R. (2015). Physicochemical effects of chia (*Salvia hispanica*) seed flour on each wheat bread-making process phase and product storage. *Journal of Cereal Science*, 65, 67–73.
- Vuksan, V., Jenkins, a L., Dias, a G., Lee, a S., Jovanovski, E., Rogovik, a L., & Hanna, A. (2010). Reduction in postprandial glucose excursion and prolongation of satiety: possible explanation of the long-term effects of whole grain Salba (*Salvia Hispanica* L.). *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(4), 436–438.
- Vuksan, V., Whitham, D., Sievenpiper, J. L., Jenkins, A. L., Rogovik, A. L., Bazinet, R. P., ... Hanna, A. (2007). Supplementation of Conventional Therapy With the Novel Grain Salba (*Salvia hispanica*) L.) Improves Major and Emerging Cardiovascular Risk Factors in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 30(11), 2804–2810.
- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M., & Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 381–406.

Caracterização química, nutricional e estudo da estabilidade termo-oxidativa do óleo e sementes de chia (*Salvia hispanica* L.) brasileira

Maristela Alves Alcântara^a; Isabelle de Lima Brito Polari^a; Bruno Raniere Lins de Albuquerque Meireles^{a,b}; Nataly Albuquerque dos Santos^{c,d}; Marta Suely Madruga^e; Antonio Gouveia de Souza^a; Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro^{a,c,d}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, CT, Campus I, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58051-900 João Pessoa, Paraíba, Brazil.

^b Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, CCTA, Campus Pombal, Universidade Federal de Campina Grande, CEP 58840-000 Pombal, Paraíba, Brazil.

^c Departamento de Tecnologia de Alimentos, CTDR, Campus I, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58051-900 João Pessoa, Paraíba, Brazil.

^d Instituto UFPB de Desenvolvimento da Paraíba, Campus I, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58051-900 João Pessoa, Paraíba, Brazil.

^e Departamento de Engenharia de Alimentos, CT, Campus I, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58051-900 João Pessoa, Paraíba, Brazil.

RESUMO

Os ácidos graxos poli-insaturados como o ômega-3 (ω -3) são nutricionalmente importantes para uma boa saúde e benéficos para os indivíduos que sofrem de doenças cardiovasculares, diabetes e distúrbios de resposta imune. O óleo da semente de chia é composto predominantemente por ácidos graxos insaturados, conferindo-o característica nutricional, mas comprometida pelo elevado grau de instauração, tornando-o muito suscetível à oxidação. O estudo da composição, estabilidade térmica e oxidativa dos óleos são relevantes na determinação de sua qualidade, considerando que essas propriedades podem ser características inerentes das diferentes regiões de cultivo e seu uso estar associado a promoção da saúde humana e incorporação de diversos produtos industriais, o objetivo desta pesquisa foi determinar as características do óleo e a composição de nutrientes de sementes de chia

cultivadas no Brasil. Análise da composição revelou que as sementes de chia continham quantidades consideráveis de proteína (25,03 g/100g), lipídios (34,41 g/100g) e fibras (36,50 g/100g), além de quantidades elevadas de aminoácidos essenciais e minerais nutricionalmente importantes como cálcio, potássio, zinco e selênio. O perfil de ácidos graxos do óleo revelou um elevado grau de insaturação, composto pelos ácidos α -linolênico, linoleico, oleico, ácido palmítico e esteárico, com predominância de ácido α -linolênico (65,61 g/100g). O óleo apresentou elevado teor de tocoferóis (586,78 μ g/g), com o isômero γ -tocoferol representando mais de 90% de todos os isômeros e compostos fenólicos como miricetina, quercetina, campferol e ácido sináptico. A adição dos compostos antioxidantes α -tocoferol e miricetina, proporcionou estabilidade oxidativa ao óleo de chia quando avaliado por método acelerado, especialmente quando estes foram combinados. As informações nutricionais relatadas neste estudo ilustram os possíveis benefícios que a semente de chia pode promover a saúde, quer na forma integral ou óleo, além de esclarecer o potencial uso em aplicações industriais.

Palavras-chave: *Salvia hispanica* L.; ácidos graxos poli-insaturados; α -linolênico; ômega3

1. Introdução

A semente de chia (*Salvia hispanica* L.) tem sido descrita como uma boa fonte de proteínas, fibras e minerais, mas o maior interesse no seu uso é devido ao seu alto teor de óleo que fornece uma rica fonte de ácidos graxos poli-insaturados, especialmente o ácido α -linolênico (~60%) (Ayerza; Coates, 2004; Capitani; Spotorno; Nolasco; Tomás, 2012; Marineli et al., 2014). As suas características nutricionais lhe permitem a atribuição de alimento funcional, pois, além de fonte alimentar, o seu consumo pode produzir efeitos benéficos à saúde.

A chia é uma planta herbácea anual, da família *Lamiaceae*, nativa do sul do México e norte da Guatemala (Coates; Ayerza, 1996). Estudos reportam variação na composição das sementes em função da região de cultivo. Ainda que o desenvolvimento da planta seja melhor em regiões tropicais e subtropicais, também pode ser cultivada em climas amenos (Ayerza, 1995; Coates; Ayerza, 1996).

Sementes e óleo de chia contêm ainda um grupo de compostos antioxidantes naturais tais como tocoferóis, fitosteróis, carotenóides (Álvarez-Chávez, Valdivia-López, Aburto-Juárez, & Tecante, 2008) e compostos fenólicos (Capitani, Spotorno, Nolasco, & Tomás, 2012b; Reyes-Caudillo, Tecante, & Valdivia-López, 2008), que estão associados a múltiplos efeitos biológicos tais como: atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e

anticarcinogênica (Daglia, 2012; Manach, Mazur, & Scalbert, 2005; Nagori, Singh, Dewangan, Verma, & Tripathi, 2010; Yang, Landau, Huang, & Newmark, 2001).

O perfil de ácidos graxos de óleo de chia é nutricionalmente muito importante, porém pode resultar em uma baixa estabilidade oxidativa e prazo de validade reduzido. Além disso, a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados pode conduzir à formação de sabores e odores desagradáveis, além de promover a geração de radicais livres, que podem ter efeitos fisiológicos negativos sobre o organismo (Ahn et al., 2008).

A proteção contra oxidação lipídica é um fator crítico na qualidade do óleo e a sua preservação com antioxidantes tem sido tema de diversos estudos (Bera, Lahiri, & Nag, 2006; Fan & Eskin, 2015). Muitos estudos mostram o uso de combinações de antioxidantes de modo a produzir um efeito sinérgico (Marinova, Toneva, & Yanishlieva, 2008; Michotte et al., 2011).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi caracterizar quimicamente e nutricionalmente sementes e óleo de chia, bem como avaliar a estabilidade oxidativa do óleo pela adição dos antioxidantes α -tocoferol e miricetina.

2. Material e métodos

2.1. Sementes

As sementes de chia (*Salvia hispânica* L.) produzidas na região sul do Brasil, foram adquiridas da Giroil Agroindústria Ltda. Segundo o produtor, as sementes foram colhidas bem secas, passando apenas por processo de limpeza com posterior embalagem a vácuo. As amostras de sementes foram moídas em processador de alimentos (Pratic Blender Cadence, BLD300) para obtenção de uma farinha, que foi armazenada em sacos de polietileno de auto-selagem a 7 °C até à sua utilização.

2.2. Extração do óleo

O óleo foi extraído por prensagem a frio (~20 °C) em prensa hidráulica, fabricada pela Ribeiro, modelo P30T (São Paulo, Brasil) apresentando características de 160 cm de comprimento e êmbolo de 15 cm de diâmetro com uma aplicação máxima de pressão de $1,3 \times 10^7 \text{ N.m}^{-2}$. Em seguida foi filtrado a vácuo e armazenado em frascos âmbar sem *headspeace* a 4°C para análises posteriores.

2.3. Análises da semente

2.3.1. Composição centesimal e fibra alimentar

Os parâmetros umidade, proteínas e cinzas foram determinados pelo método oficial de análises, normatizado pela AOAC (2000). Os lipídios foram determinados pelo método descrito por Bligh & Dyer (1959). O teor de carboidratos total foi obtido por diferença entre 100 e a soma de cinzas, lipídeos, proteínas e umidade.

Fibra alimentar total (FAT) foi determinada pelo método enzimático-gravimétrico da AOAC (2000).

2.3.2. Fração proteica e perfil de aminoácidos

As sementes foram preparadas inicialmente pela separação da mucilagem e desengorduramento seguindo o método proposto por Vázquez-Ovando, Rosado-Rubio, Chel-Guerrero, & Betancur-Ancona (2010). Em seguida, foram submetidas ao fracionamento proteico baseado em diferenças de solubilidade (Osborne, 1924) com algumas modificações (Barba De La Rosa, Herrera-Estrella, Utsumi, & Paredes-López (1996); Sandoval-Oliveros & Paredes-López (2013)) para obtenção de albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em soluções salinas), prolaminas (solúveis em soluções alcoólicas) e glutelinas (solúvel em álcali diluído). Todas as frações foram dialisadas, liofilizadas e armazenadas a 4 °C até à sua utilização. As concentrações de proteínas foram estimadas de acordo com o método de Bradford (1976) utilizando uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA).

A determinação do perfil de aminoácidos foi realizada de acordo com o método descrito por White, Hart, & Fry (1986), no qual os aminoácidos foram determinados em amostra previamente hidrolisada em ácido clorídrico bidestilado 6 N, seguida de derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenil isotiocianato (PITC). A separação dos derivativos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (VARIAN, Waters 2690, California, USA) acoplado com coluna de fase reversa C18 (PICO-TAG, 3,9 x 150 mm). As fases móveis empregadas consistiram de um tampão acetato de concentração 0,0011 g/mL e pH 6,4 e, uma solução de acetonitrila a 60%. A injeção da amostra (20 µL) foi efetuada manualmente e a detecção ocorreu a 254 nm. A separação cromatográfica foi realizada a um fluxo constante de 1 mL/min, à temperatura de 35 °C. O tempo de corrida cromatográfica foi de 21 minutos. A curva de calibração foi construída com nove pontos, traçando-se um gráfico das alturas dos picos obtidos pela injeção de 20 µL da solução de aminoácido preparada numa faixa de 4,17 µg/mL a 90,60 µg/mL. Em cada curva de calibração,

o primeiro ponto correspondeu ao limite de quantificação nas condições empregadas, ou seja, a menor quantidade detectável pelo método.

2.3.3. Minerais

As amostras foram digeridas em um sistema de digestão por micro-ondas, Berghof, modelo *Speedwave four*. As sementes trituradas foram pesadas (0,4 g) e colocadas em tubos Teflon para digestão (DAP-60+). Uma mistura de ácido nítrico a 65% (3 mL) e peróxido de hidrogênio a 35% (3 mL) foi cuidadosamente adicionados. Após repouso, os tubos foram adequadamente fechados e introduzidos no micro-ondas. Os gradientes de temperatura, pressão e tempo utilizados foram sugeridos pelo fabricante, atendendo as especificações para sementes oleaginosas. Após esse período, os tubos foram arrefecidos até à temperatura ambiente e as amostras digeridas foram filtradas para análise dos minerais.

Os elementos químicos (Ca, Fe, Mg, P, K, Na, Al, Mn, Cu, Zn, Se, Cr, Co) foram determinados usando um espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente ICP-MS Thermo Scientific, segundo a norma EPA (1998).

2.4. Análises do óleo

2.4.1. Caracterização físico-química

Os parâmetros físicos e químicos do óleo: valor de acidez (VA), valor de peróxido (VP), coeficientes de extinção (K_{232} e K_{270}), valor de saponificação (VS) e valor de iodo (VI), foram determinados de acordo com recomendados pela AOCS Ca 5a-40, Cd 8b-90, Ch 5 -91, Cd 3a-94, Cd 1c-85; respectivamente (AOCS, 1998). A viscosidade cinemática foi determinada de acordo com a norma ASTM D445 (2015) e a massa específica a 20°C, de acordo com a norma ASTM D4052 (2015). O VA foi expresso como percentagem de ácido oleico. O VP foi expresso em miliequivalentes de peróxido por kg de óleo (meq peróxido/kg de óleo). O VS foi expresso como miligramas de álcali por grama de óleo (mg KOH/g óleo). O VI foi expresso em número de centigramas de iodo absorvido por grama da amostra ($\text{g I}_2/100 \text{ g óleo}$).

Os coeficientes de extinção (K_{232} e K_{270}) foram expressos como extinção específica de um 1% (p/v) de solução de óleo em isoctano utilizando uma célula de quartzo com 1 cm de caminho óptico em um espectrômetro UV-vis Shimadzu, modelo UV-2550. A viscosidade cinemática foi expressa como o tempo de escoamento do óleo através de um caminho percorrido em um viscosímetro capilar de vidro calibrado, sob a ação da força gravitacional (mm^2/s) e a

massa específica como a quantidade de massa por unidade de volume a uma temperatura específica (kg/m^3).

2.4.2. Perfil de ácidos graxos

Para a determinação do perfil de ácidos graxos do óleo de chia foi realizado uma esterificação metílica seguindo a metodologia descrita por Hartman & Lago (1973) e a quantificação obtida por curva de calibração com padrões de ésteres metílicos, utilizando um GCMS-QP2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipado com uma coluna Durabound DB-23 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm . A temperatura do injetor e do detector foram fixados em 230 °C e temperatura da coluna em 90 °C. O gradiente de eluição na coluna foi de 90 a 150 °C (10 °C/min), 150 a 200 °C (5 °C/min), 200 a 230 °C (3 °C/min) em um tempo total de corrida de 34 minutos, utilizando hélio como gás de arraste.

2.4.3. Atividade antioxidante

Para o ensaio de DPPH, foram utilizados diferentes volumes de óleo (5 - 200 μL) e trolox (200 ppm como referência externa). O volume foi ajustado a 1 mL pela adição de etanol a uma solução metanólica 0,5 mM de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil radical (DPPH, 250 μL) e Tween 20 (5 μL). Os tubos foram armazenados à temperatura ambiente no escuro durante 60 minutos (Gorinstein et al., 2003). O controle foi preparado como acima, sem amostra de óleo. A absorbância foi monitorada a 515 nm e a atividade sequestradora de radicais foi expressa como EC_{50} . O valor EC_{50} indica o volume (μL) de óleo necessário para eliminar 50% do radical livre DPPH. O potencial antioxidante é inversamente proporcional ao valor de EC_{50} .

Para o ensaio do descoloramento do β -caroteno: A atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ácido linoleico foi avaliada através do método proposto por (Jayaprakasha & Jaganmohan Rao, 2000) com algumas modificações (Condelli et al., 2015). Uma solução de β -caroteno (0,2 mg de β -caroteno dissolvido em 0,2 mL de clorofórmio), ácido linoleico (20 mg) e Tween 20 (200 mg) foram misturados. O clorofórmio foi removido utilizando um evaporador rotativo a 50 °C. Foi adicionada água destilada (50 mL). Quatro mililitros da emulsão foram transferidos em vários tubos contendo 0,2 mL de óleo ou etanol como controle. Trolox (200 ppm) foi utilizado como referência externa. Os tubos foram colocados a 50 °C durante 120 minutos. A absorbância foi medida a 470 nm. Os resultados foram expressos como percentagem de inibição do descoloramento do β -caroteno (% Inibição) e calculada como se segue:

$$\% \text{ Inibição} = \left(1 - \frac{A_s(t=0) - A_s(t=120)}{A_c(t=0) - A_c(t=120)} \right) \times 100$$

Onde $A_{s(t=0)}$ e $A_{c(t=0)}$ são as absorbâncias medidas no tempo zero de incubação para a amostra e o controle, respectivamente, e $A_{s(t=120)}$ e $A_{c(t=120)}$ são as absorbâncias medidas após 120 minutos de incubação para a amostra e o controle, respectivamente.

2.4.4. Perfil de tocoferóis e compostos fenólicos

O perfil de tocoferóis foi obtido a partir do método proposto por Khattab & Zeitoun (2013) com algumas modificações. 2 g de óleo foram submetidos a duas extrações sucessivas com 10 ml de metanol, seguida de outras duas extrações com 10 ml da mistura metanol: iso-propanol (1:1 v/v) utilizando uma centrífuga a 5000 rpm durante 10 min (4 °C) para separação de fases. As camadas orgânicas superiores das quatro extrações foram combinadas, secas sob N_2 , redissolvida em 5 ml da mistura metanol: iso-propanol, filtrada através de um filtro de seringa de 0,45 mm e submetida à análise por CLAE. A análise de tocoferóis foi realizada em um cromatógrafo líquido de alto desempenho (CLAE) Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com um injetor automático Rheodyne 7125i e um detector UV/VIS. As colunas utilizadas foram uma coluna Shimadzu LC-18 (25 cm x 4,6 mm, 5µm de tamanho de partícula, da Supelco, Bellefonte, PA) e uma pré-coluna C-18 ODS Shimadzu. A amostra foi eluída em um sistema isocrático, fluxo de 1 mL/min, utilizando como fase móvel metanol:água acidificada 0,17 mol/L de ácido acético glacial (99:1 v/v). A temperatura da coluna foi mantida em 25 °C e o volume de injeção foi 20 µL. Os picos foram adquiridos a 294 nm e os dados foram analisados utilizando o software *Lab Solutions* (Shimadzu) por comparação com os tempos de retenção dos padrões de tocoferóis α , δ e γ utilizados na preparação das curvas de calibração.

O perfil de compostos fenólicos foi determinado a partir do método proposto por Gómez-caravaca, Cerretani, Bendini, Segura-carretero, & Fernandez-gutiérrez (2006), com algumas modificações. 30 g de óleo de chia foram homogeneizados com 30 mL de hexano, e em seguida percorrido em um cartuxo SPE (LC-18, 2g, Superclean), pré-condicionado com 10 mL de metanol e 10 mL de hexano. Após uma lavagem com hexano (15 mL) para eliminar a fração não-polar do óleo, a amostra foi eluída com metanol (40 mL). O extrato metanólico foi seco sob N_2 , e o resíduo redissolvido em 1 mL de metanol, filtrada através de um filtro de seringa de 0,45 mm e submetida à análise por CLAE. A análise dos compostos fenólicos foi realizada no cromatógrafo e coluna descritos acima. A amostra foi eluída em um sistema gradiente que consiste em solvente A (2% de ácido acético, v/v) e o solvente B (acetonitrila: metanol, 2: 1, v/v), utilizada como a fase móvel, com um caudal de 1 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 25 °C e o volume de injeção foi de 20 µL. O sistema de gradiente iniciado a partir de 90% de A a 0 min, a 80% de A em 10 min, 70% de A em 15 min, 60% de

A em 25 min, 50% de A em 30-40 min, 75% de A em 42 minutos, e 90% de a em 44 min. Os picos dos compostos fenólicos foram monitorizados a 280 nm. O software *Lab Solutions* (Shimadzu) foi usado para controlar o sistema de LC-UV e de processamento de dados.

2.5. Estudo da estabilidade termo-oxidativa do óleo de chia

O efeito da adição dos antioxidantes α -tocoferol e miricetina foi avaliado no controle da estabilidade térmica e oxidativa do óleo de chia. Com o objetivo de verificar um possível efeito sinérgico, foi aplicado um delineamento experimental de mistura de dois componentes (Tabela 1). O antioxidante sintético TBHQ foi utilizado como referência e uma amostra de óleo sem antioxidante, como controle. O somatório das proporções dos componentes foi fixado em 200 mg/kg.

O modelo elementar para uma mistura de dois componentes é o modelo linear, porém, foi aplicado um modelo quadrático hipotético, de modo a avaliar a interação entre os componentes da mistura.

O preparo das misturas foi realizado pesando-se inicialmente os antioxidantes e em seguida o óleo. A mistura foi agitada durante 10 minutos de modo a homogeneizar e não promover aquecimento do óleo, posteriormente foram armazenadas a 4 °C durante uma noite.

Tabela 1 - Delineamento experimental utilizado para o estudo da estabilidade oxidativa do óleo de chia aditivado.

Ensaio	Componentes da mistura	
	α -tocoferol	Miricetina
1	1,00 (200 mg/kg)	0,00 (0 mg/kg)
2	0,00 (0 mg/kg)	1,00 (200 mg/kg)
3	0,75 (150 mg/kg)	0,25 (50 mg/kg)
4	0,25 (50 mg/kg)	0,75 (150 mg/kg)
5	0,50 (50 mg/kg)	0,50 (50 mg/kg)

2.5.1. Período de indução

Para estimar a estabilidade oxidativa do óleo de chia o equipamento Rancimat foi utilizado, seguindo normas da AOCS (2009). Este ensaio acelerado expressa o resultado em período de indução (PI), definido como o intervalo de tempo correspondente ao ponto de inflexão da curva de condutividade *versus* tempo. Determinou-se a 110 °C e 10 L de ar/h

utilizando aparelho Biodiesel Rancimat 873 (Metrohm, Suíça). 2 g de amostra foram pesados em cada tubo de reação. As análises foram realizadas em duplicata.

2.5.2. Análise térmica

As curvas termogravimétricas (TG / DTG) das amostras foram obtidas em um analisador térmico simultâneo da Shimadzu modelo DTG-60H. Os testes não-isotérmicos foram realizados utilizando amostras de aproximadamente 10 mg, em cadinho de alumina com atmosfera de oxigênio, fluxo de 50 mL/min, com taxa de aquecimento de 10 °C/min, variando de 25-800 °C.

3. Resultados e discussão

3.1 Sementes de chia

3.1.1. Composição centesimal e fibra alimentar

As propriedades nutricionais das sementes de chia encontram-se resumidos na Tabela 2. Os valores obtidos mostram que as sementes possuem teores de proteínas 25,03 (g/100g), lipídios 34,41 (g/100g), cinzas 5,18 (g/100g), umidade 6,01 (g/100g) e carboidratos 29,37 (g/100g). Os resultados de proteínas e lipídios pouco diferem dos encontrados em sementes de chia de outros países da América do Sul.

Tabela 2 - Composição centesimal e FAT de sementes de chia (*Salvia hispanica* L.) de diferentes origens geográficas (g/100g)

	Brasil	Valores reportados na literatura			
		Chile ^a	México ^b	Argentina ^c	Peru ^d
Proteínas	25,03	25,32	23,99	16,45	23,10
Lipídios	34,41	30,22	34,88	33,50	32,40
Umidade	6,01	5,82	6,32	na	na
Cinzas	5,18	4,07	4,32	na	na
Carboidratos	29,37	34,57	30,49	na	na
FAT	36,50	37,50	35,85	na	na

na - não avaliado

^a Marineli et al. (2014)

^b Segura-Campos, Salazar-Vega, Chel-Guerrero, & Betancur-Ancona (2013)

^c Ayerza & Coates (2011)

^d Ayerza & Coates (2004)

O teor de FAT na semente foi 36,50 g/100g. Este resultado foi semelhante a outros estudos e maiores do que outras sementes e cereais como linhaça (29,82 g/100g), quinoa (10,40 g/100g), amaranto (11,30 g/100g), aveia (13,10 g/100g), cevada (24,63 g/100g) e sorgo (21,01 g/100g) (Nandi & Ghosh, 2015; Nascimento et al., 2014; Ragaei, Abdel-Aal, & Noaman, 2006; Sandhu, Godara, Kaur, & Punia, 2015).

Assim, uma porção de 25 g de semente de chia ao dia, fornece aproximadamente 9g de fibra alimentar, ou seja, 36% do total da necessidade de ingestão diária preconizada pela *American Dietetic Association* (Borderías, Sánchez-Alonso, & Pérez-Mateos, 2005). Estudos epidemiológicos têm contribuído significativamente para o reconhecimento da fibra alimentar como constituinte essencial de uma dieta saudável e redução do risco de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e câncer colorretal (Park, 2016).

Embora o maior interesse no cultivo dessa semente esteja voltado ao alto teor de óleo produzido, rico em ácidos graxos poli-insaturados, o teor de proteínas se apresenta como uma importante fonte nutricional, com valores mais elevados do que outras culturas tradicionais, tais como trigo, milho, arroz e aveia (Coates & Ayerza (h), 1996).

3.1.2. Fração proteica e perfil de aminoácidos

Dentre as frações proteicas contidas nas sementes de chia, verifica-se que a maior proporção é de globulina (51,29 g/100g), seguida de albumina (20,20 g/100g), prolaminas (13,26 g/100g) e glutelinas (10,82 g/100g) (Tabela 3). Um estudo realizado por Orona-Tamayo, Valverde, Nieto-Rendón, & Paredes-López (2015) mostrou que a fração de globulina representa a mais alta concentração de peptídeos após a digestão gastrointestinal e que estes constituintes apresentam um elevado potencial para atuar como antioxidantes, quelante de íons e inibidores da enzima angiotensin-converting na saúde humana.

Tabela 3 - Fração proteica de sementes de chia

Fração proteica	g/100g semente
Albuminas	20,20 ± 0,8
Globulinas	51,29 ± 1,0
Prolaminas	13,26 ± 0,2
Glutelinas	10,82 ± 0,2

Média ± desvio padrão (n=3)

O perfil de aminoácidos presentes nas proteínas das sementes de chia, encontram-se na Tabela 4. Observa-se a presença de todos os aminoácidos essenciais, exceto o triptofano.

Segundo Reeds (2000), uma quantidade inadequada de ingestão desses aminoácidos no metabolismo humano pode ocasionar alterações nos processos bioquímicos e fisiológicos.

Esta amostra exibiu uma elevada porcentagem de ácido glutâmico, ácido aspártico e arginina. Resultados semelhantes foram reportados por (Olivos-Lugo, Valdivia-López, & Tecante, 2010; Sandoval-Oliveros & Paredes-López, 2013). A presença de elevados níveis de ácido glutâmico e aspártico estão associados a um estímulo do sistema nervoso central e imunológico em humanos (Monda, Viggiano, Sullo, & De V, 1998; Williams et al., 2005) e a arginina como um potencial aminoácido de prevenção à doenças cardíacas (Hov, Aasarød, Sagen, & Åsberg, 2015).

Tabela 4 - Perfil de aminoácidos em sementes de chia (*Salvia hispanica* L.) brasileira

Aminoácidos	mg/g proteína	mg/g proteína (recomendada pela FAO 2002 para adultos)
<i>Essenciais</i>		
Histidina	16,3 ± 0,1	15
Isoleucina	34,2 ± 0,23	30
Leucina	57,0 ± 0,05	59
Lisina	43,4 ± 0,07	45
Metionina + Cistina	36,0 ± 0,10	22
Felilalanina + Tirosina	46,8 ± 0,30	38
Treonina	36,0 ± 0,01	23
Valina	40,0 ± 0,04	39
<i>Condicionalmente essenciais ou não essenciais</i>		
Arginina	80,2 ± 0,10	
Alanina	38,8 ± 0,02	
Ácido aspártico	83,3 ± 0,04	
Ácido glutâmico	142,7 ± 0,30	
Glicina	35,0 ± 0,13	
Prolina	20,0 ± 0,25	
Serina	22,8 ± 0,06	

Média ± desvio padrão (n=3)

3.1.3. Minerais

A semente de chia possui uma ampla variedade de minerais sendo uma excelente fonte de cálcio (600,1 mg/100g), fósforo (650,0 mg/100g), magnésio (470,9 mg/100g), potássio (786,4 mg/100g), ferro (24,3 mg/100g) e zinco (5,5 mg/100g) (Tabela 5). Não foi encontrado elementos tóxicos como arsênio, chumbo e cádmio. Resultados semelhantes foram obtidos por Capitani, Spotorno, Nolasco, & Tomás (2012) e Bolaños, Marchevsky, & Camiña (2015) e maiores do que os relatores para outros grãos e cereais como amaranto, quinoa, trigo e sorgo (Nascimento et al., 2014; Ragaee et al., 2006). Os níveis de ferro encontrados nos grãos (24,3 mg/100g) são muito elevados, o que representa valores raros em grãos (Ixtaina, 2010). Observa-se ainda a presença do selênio, mineral essencial associado a redução do risco de câncer, funcionamento adequado do sistema imune e potencial antioxidante (Rayman, 2000). A FAO/WHO (2001) preconiza a ingestão de 0,026-0,034 mg/dia deste constituinte para adultos, assim, o consumo de 20 g (2 colheres de sopa) de sementes de chia ao dia supre metade da necessidade diária.

Segundo o Departamento de Agricultura dos EUA, ao comparar o grão de chia com o leite, este contém quantidade seis vezes superior de cálcio, o dobro de fósforo e quatro vezes mais potássio (USDA, 2015).

Tabela 5 - Perfil de minerais em sementes de chia (*Salvia hispanica* L.) brasileira

Elementos	mg/100g (semente)
<i>Macroelementos</i>	
Cálcio	600,1 ± 0,05
Ferro	24,3 ± 0,03
Magnésio	470,9 ± 0,03
Fósforo	650,0 ± 1,4
Potássio	786,4 ± 1,2
Sódio	10,0 ± 0,05
<i>Microelementos</i>	
Alumínio	9,6 ± 0,02
Manganês	3,0 ± 0,05
Cobre	1,9 ± 0,06
Zinco	5,5 ± 0,01
Selênio	0,078 ± 0,02
Cromo	0,097 ± 0,01
Cobalto	0,025 ± 0,01
Média ± desvio padrão (n=3)	

3.2 Óleo de chia

3.2.1. Caracterização físico-química

A Tabela 6 mostra as características físico-químicas do óleo de sementes de chia. O valor médio de acidez foi de 1,20g ácido oleico/100 g óleo e peróxido de 0,2 meq peróxido/kg óleo. Estes valores são inferiores ao recomendado pelo Codex Alimentarius Comissão (1999) para óleos vegetais prensados a frio, indicando que o processo de extração não provocou oxidação no óleo. Resultado semelhante foi reportado por Ixtaina et al. (2011)

O alto valor de iodo encontrado (200,45 g I₂/100 g óleo) indica um elevado grau de insaturação, assim quanto maior o teor de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) maior o VI. Resultados semelhantes são encontrados em óleos de semente de linhaça, noz e peixe (Costa, Almeida, Alvim-Ferraz, & Dias, 2013; Khattab & Zeitoun, 2013; Martínez et al., 2015).

O valor de saponificação obtido foi 193,1 mg KOH/g óleo. Este parâmetro indica o comprimento médio da cadeia de ácido graxo presente em uma amostra, quanto maior o comprimento, menor é a quantidade de álcali absorvido (Penfield & Campbell, 1990) , assim um óleo com um comprimento de cadeia pequena como óleo de coco, o valor de saponificação varia de 248-265 mg KOH/g óleo, já para um óleo de cadeia maior como girassol esse valor varia de 188-194 mg KOH/g óleo (BRASIL, 2005).

A absorção nos comprimentos de onda 232 nm e 270 nm ocorre devido a presença de sistemas dienos e trienos conjugados, respectivamente. Em geral estes compostos são formados por oxidação e/ou refino do óleo. Valores baixos encontrados para K_{232nm} e K_{270nm} (1,675 e 0,315), respectivamente, indicam boa qualidade do óleo.

Parâmetros físicos do óleo como massa específica e viscosidade estão associados ao grau de insaturação e ao peso molecular (Ackman & Eaton, 1977; Hui, 2006), assim quanto maior o nível de insaturação maior é a massa específica e menor é a viscosidade. O valor obtido para massa específica neste estudo (0,9303 kg/m³) é maior que os encontrados por Singh & Singh (2010) para outros óleos vegetais como linhaça (0,9236 kg/m³), soja (0,9138 kg/m³) e girassol (0,9161 kg/m³), já o valor encontrado para viscosidade cinemática (23,50 mm²/s) é menor para estes óleos (27,2; 32,6; 33,9 kg/m³), respectivamente.

Tabela 6 - Características físico-químicas do óleo da semente de chia (*Salvia hispanica* L.) brasileira

Parâmetros	Valores
Valor de acidez (g ácido oleico/100 g óleo)	1,20 ± 0,3
Valor de peróxido (meq peroxide/kg óleo)	0,20 ± 0,1
Valor de iodo (g I ₂ /100 g óleo)	200,45 ± 2,1
Valor de saponificação (mg KOH/g óleo)	193,1 ± 0,1
K _{232nm}	1,675 ± 0,1
K _{270nm}	0,315 ± 0,1
Viscosidade cinemática (mm ² /s)	23,50 ± 0,0
Massa específica (kg/m ³)	0,9303 ± 0,0
Média ± desvio padrão (n=3)	

3.2.2. Perfil de ácidos graxos

A Tabela 7 mostra que a composição em ácidos graxos do óleo de chia são, principalmente α -linolênico, linoleico, oleico, ácido palmítico e esteárico, com uma quantidade predominante de ácido α -linolênico (65,61 g/100g) (Fig. 1). Estes resultados estão de acordo com os reportados em outros estudos (Ayerza & Coates, 2004; Marineli et al., 2014). O óleo de chia contém a maior quantidade de ácido α -linolênico do que qualquer fonte vegetal conhecida (Ayerza, 1995).

A relação de ácidos graxos n-6/n-3 (0,23) encontrada é inferior a maior parte dos óleos vegetais, tais como o milho (76,57), colza (2,26), soja (6,68), girassol (30,77), azeite (17,86) (Tuberoso, Kowalczyk, Sarritzu, & Cabras, 2007) e linhaça (0,28) (Khattab & Zeitoun, 2013). Baixas proporções de n-6/n-3 têm sido associadas com a redução do risco de doença cardiovascular (Simopoulos, 2004).

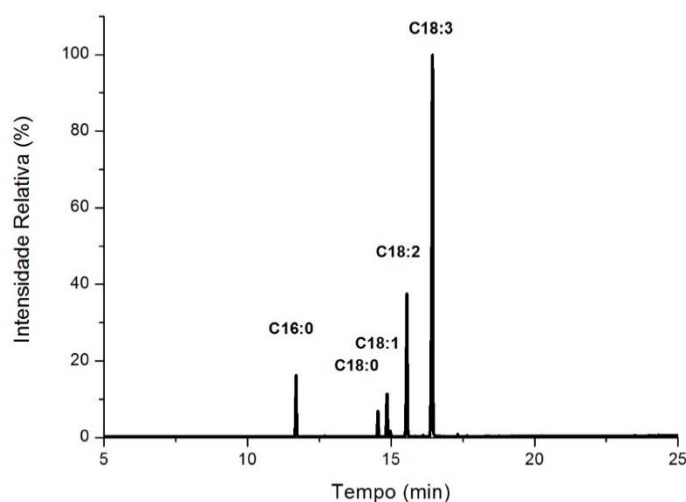
Assim, o uso de óleo de semente de chia na dieta humana ocasionaria diversos benefícios, pois o uso de óleos vegetais com alto teor de ácidos graxos poli-insaturados tem demonstrado fornecer várias propriedades benéficas à saúde (Ganesan, Brothersen, & McMahon, 2014).

Tabela 7 - Perfil de ácidos graxos de óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) brasileira

Ácidos graxos	(g/100 g dos ácidos graxos totais)
Ácido palmítico (C _{16:0})	7,60 ± 0,1
Ácido esteárico (C _{18:0})	3,47 ± 0,1
Ácido oleico (C _{18:1})	8,09 ± 0,1
Ácido linoleico (C _{18:2})	15,23 ± 0,1
Ácido α -linolênico (C _{18:3})	65,61 ± 0,1
SFA	11,07
PUFA	88,93
PUFA/SFA	8,03
n-6/n-3 relação	0,23

Média $\pm$ desvio padrão (n=3)

SFA, ácidos graxos saturados; PUFA, ácidos graxos poli-insaturados; n-6/n-3 relação (ácido linoleico/ α -linolênico).

**Fig. 1.** Cromatograma do perfil de ácidos graxos de óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) brasileira.

3.2.3. Atividade antioxidante

As funções dos antioxidantes implicam na capacidade em conter os efeitos da atividade de espécies reativas ao oxigênio e diminuir a incidência de câncer e outras doenças degenerativas. Sua ação pode ser atribuída a diversos mecanismos, como: eliminação de espécies de radicais por doação de hidrogênio, supressão de oxigênio singlete, decomposição

de peróxidos, quelantes de metais, inibidores de enzimas oxidativas ou absorvedores de radiação UV (Pisoschi & Pop, 2015).

Os testes que expressam a capacidade antioxidante podem ser categorizados em dois grupos: ensaios para a capacidade de eliminação de radicais e ensaios que testam a capacidade de inibir a oxidação de lipídios sob condições de oxidação acelerada. Neste estudo a atividade antioxidante para o óleo de chia foi determinada pelos ensaios de DPPH e descoramento do β -caroteno e os resultados estão apresentados na Tabela 8. O valor de EC_{50} para óleo de chia foi 22 μ L, volume necessário para eliminar 50% do radical livre DPPH, com uma percentagem de inibição de oxidação em sistema lipídico de 50%. Em um estudo anterior realizado nas mesmas condições de análise, Condelli et al. (2015) reportou um valor de EC_{50} de 40 e 20% de inibição para óleo de oliva extra virgem.

A ação anti-radical mais forte do óleo de chia em comparação com o azeite pode ser devido as diferenças nos níveis e composição de lipídios polares e insaponificáveis (fitoesteróis e tocóis), as características estruturais dos compostos antioxidantes presentes; sinergismo de lipídios polares com outros componentes presentes e diferentes comportamentos cinéticos das substâncias antioxidantes. Segundo Ramadan & El-Shamy (2013) são estes fatores que mais contribuem para a eficiência de extinção de radicais em óleos.

Tabela 8 - Atividade antioxidante de óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) brasileira

Amostras	EC_{50} (μ L)	% Inibição
Óleo de chia	$22 \pm 0,7$	$50 \pm 1,3$
Óleo de oliva extra virgem ^a	$40 \pm 1,8$	$20 \pm 2,1$
Trolox	$10 \pm 0,3$	$75 \pm 1,0$

Média $\pm$ desvio padrão (n=3)

^a Condelli et al. (2015)

3.2.4. Perfil de tocoferóis e compostos fenólicos

As Figuras 2 e 3 mostram os perfis de tocoferol e compostos fenólicos do óleo de sementes de chia. O teor de tocoferóis encontrado foi 486,78 μ g/g de óleo (Tabela 9), onde o principal composto foi o isômero gama, representando mais de 90% do total de tocoferóis. Delta e alfa apresentaram valores de 16,24 e 15,32, respectivamente. O isômero beta não foi quantificado neste trabalho, uma vez que ele em conjunto com o gama não pode ser completamente separado por cromatografia líquida de fase reversa (Delgado-Zamarreño, Bustamante-Rangel, Sánchez-Pérez, & Carabias-Martínez, 2004).

Resultados semelhantes foram reportados por Ixtaina, Nolasco, & Tomás (2012) e Martínez et al. (2015).

Como antioxidantes lipossolúveis, os tocoferóis desempenham um papel importante na estabilidade de ácidos graxos poli-insaturados. Na sua ausência, estes ácidos podem resultar na formação de radicais livres (Papas, 1998).

Os compostos fenólicos majoritários identificados em óleo de chia foram miricetina, quercetina, kampferol e ácido sináptico (Tabela 9, Fig. 3). Segundo Tuberoso et al. (2007), a maior parte dos compostos fenólicos encontrados em óleo de chia não estão presentes em outras sementes oleaginosas.

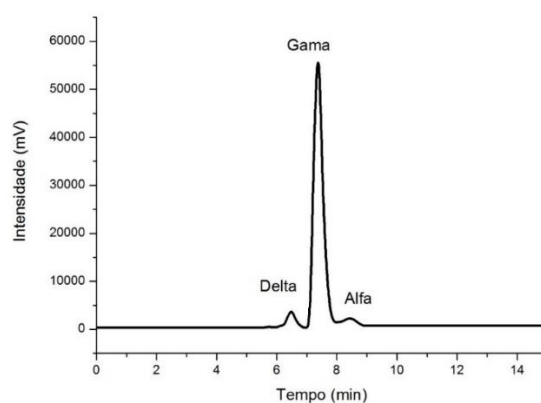


Fig. 2. Cromatograma do perfil de tocoferóis em óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) brasileira

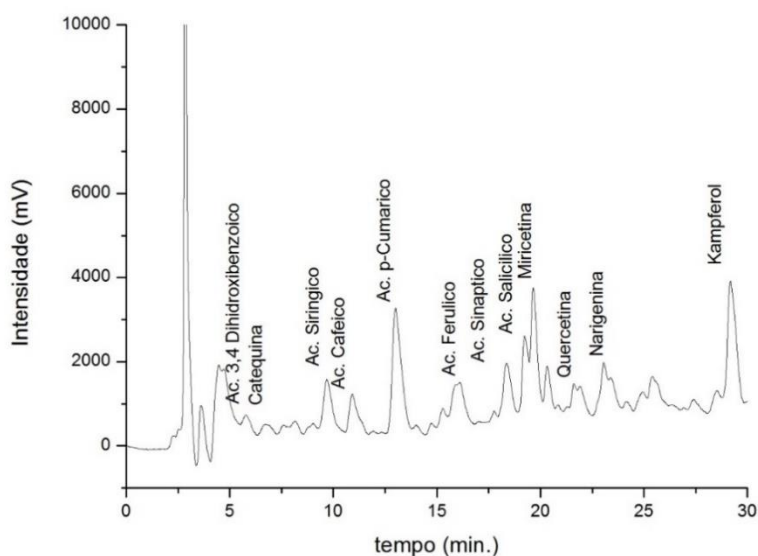


Fig. 3. Cromatograma do perfil dos compostos fenólicos do óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) brasileira

Tabela 9 - Compostos bioativos presentes em óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) brasileira

Compostos fenólicos (µg/g)	
<i>Ácido fenólicos</i>	
Protocatequínico	0,50 ± 0,10
Siríngico	0,50 ± 0,12
Cafeico	0,40 ± 0,00
<i>p</i> -Cumárico	2,50 ± 0,10
Ferúlico	0,40 ± 0,10
Sináptico	2,00 ± 0,20
Salicílico	1,90 ± 0,10
<i>Flavonoides</i>	
Catequina	1,00 ± 0,00
Miricetina	5,00 ± 0,20
Quercetina	2,70 ± 0,10
Narigenina	0,50 ± 0,10
Kampferol	5,40 ± 0,10
Total	22,80 ± 1,22
Tocoferóis (µg/g)	
Delta	16,24 ± 2,98
Gama	455,22 ± 12,35
Alfa	15,32 ± 2,46
Total	586,78 ± 17,79
Média ± desvio padrão (n=3)	

3.3. Estudo da estabilidade termo-oxidativa de óleo de chia

Os resultados de PI e as etapas de decomposição obtidas pela TG para os ensaios de estabilidade termo-oxidativa do óleo de chia pelo método Rancimat se encontram na Tabela 10.

O PI variou de 1,69 – 4,00 h (Fig. 4), comparando estes resultados com o óleo de chia sem antioxidantes (0,6 h), verifica-se uma proteção de 3 a 7 vezes maior quando adicionados os antioxidantes em estudo. Miricetina foi mais eficaz do que o α -tocoferol durante a oxidação acelerada do óleo a 110 °C e o TBHQ sem dúvida foi o antioxidante com maior poder de proteção, ressaltando que todas as amostras, individuais ou em mistura, se encontravam na mesma concentração de 200 ppm.

A partir do diagrama de Pareto (Fig. 5), observa-se que os dois componentes da mistura apresentam um efeito sinérgico, ou seja, a resposta obtida com os dois componentes misturados é maior do que suas respostas individuais.

A oxidação de lipídios é uma das principais causas para a deterioração da qualidade de óleos comestíveis, ela é a causa de importantes alterações deteriorativas nas suas propriedades químicas, sensoriais e nutricionais. As peculiaridades da ação de inibição dos antioxidantes na oxidação lipídica pode ser descrito por duas características cinéticas: eficácia, que representa a possibilidade de bloquear o processo de radical de cadeia por interação com radicais peroxila, que é responsável pela duração do PI e força, expressando a possibilidade de as porções do inibidor participar de outras reações (laterais), que podem conduzir a uma alteração na taxa de oxidação durante o PI (Yanishlieva & Marinova, 1992).

O comportamento térmico das amostras de óleo de chia com e sem antioxidantes foi avaliado pela TG/ DTG (Fig 6) em atmosfera oxidante (oxigênio).

Observa-se que as amostras apresentam perfis termogravimétricos semelhantes, com quatro etapas comuns de variação de massa. Essa etapas de decomposição ocorrem a partir da insaturação dos ácidos graxos, inicialmente é degradado os poli-insaturados, monoinsaturados e saturados, na respectiva ordem (Volli & Purkait, 2014). A primeira etapa, apresenta uma estabilidade térmica de aproximadamente 170 °C. Os ensaios 4 e TBHQ, apresentaram maior estabilidade, onde a T_{inicial} foi 193,2 °C e 189,4 °C, respectivamente, além disso, apresentaram as menores perdas de massa nessa etapa (11,0% e 9,7%, respectivamente) comparado ao óleo sem antioxidante que foi de 12,7%. A diferença discreta observada entre as amostras podem ser explicadas pelo fato de os antioxidantes utilizados não possuírem estabilidade térmica maior que 200 °C (Santos et al., 2012), assim, os antioxidantes aditivados não apresentaram estabilidade maior que os naturalmente encontrados no óleo como compostos fenólicos e tocoferóis.

Tabela 10 - Efeito dos antioxidantes α -tocoferol e miricetina na estabilidade termo-oxidativa do óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) brasileira

Ensaio	Etapas	T _{inicial} (°C)	T _{final} (°C)	T _{pico} (°C)	Δ massa (%)	PI (h)
1	1	175,8	297,5	278,6	12,7	1,69
	2	297,5	379,2	338,5	17,5	
	3	379,2	465,4	412,6	50,5	
	4	465,4	566,0	507,8	19,0	
2	1	181,1	302,1	283,7	10,9	2,76
	2	302,1	368,6	336,8	11,9	
	3	368,6	472,2	412,0	58,7	
	4	472,2	563,7	512,2	18,4	
3	1	178,8	305,9	284,8	12,6	2,69
	2	305,9	376,2	339,4	14,2	
	3	376,2	470,7	412,2	56,6	
	4	470,7	566	511,0	16,4	
4	1	193,2	299,0	279,7	11,0	4,00
	2	299,0	386,8	342,5	19,6	
	3	386,8	470,7	414,6	53,2	
	4	470,7	566,8	511,2	16,5	
5	1	185,6	296,0	280,7	11,6	2,99
	2	296,0	378,5	338,3	17,7	
	3	378,5	468,4	409,5	52,9	
	4	468,4	573,6	509,5	17,7	
Óleo fresco	1	173,5	295,3	279,0	12,7	0,6
	2	295,3	372,4	336,5	16,1	
	3	372,4	464,7	409,3	55,9	
	4	464,7	569,0	507,6	15,3	
TBHQ	1	189,4	304,3	290,8	9,7	9,01
	2	304,3	366,4	338,4	10,3	
	3	366,4	468,4	411,7	64,4	
	4	468,4	559,2	509,8	15,6	

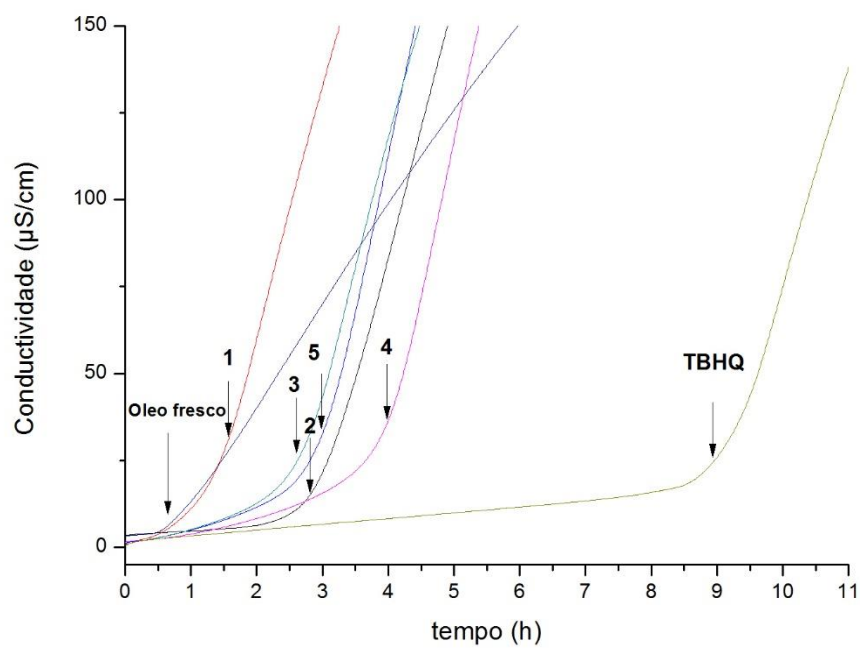


Fig. 4. Curvas de período de indução (condutividade vs. tempo) obtidos a partir do teste acelerado Rancimat do óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) com e sem antioxidantes

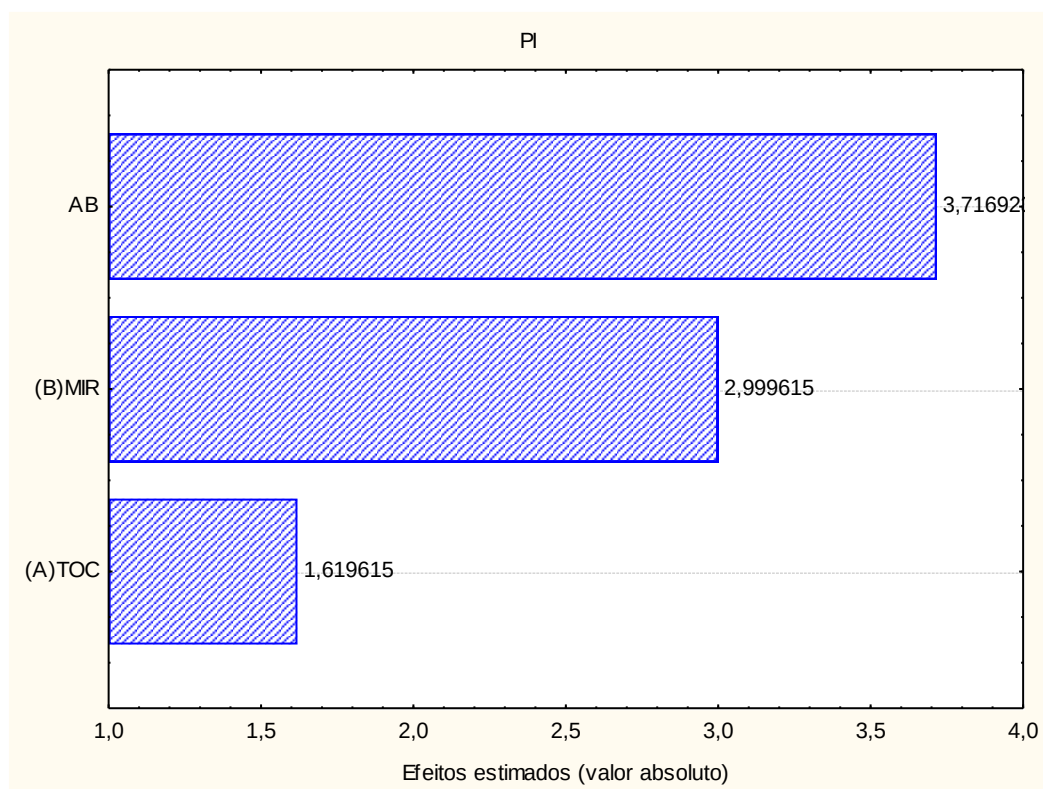


Fig. 5. Diagrama de Pareto para os resultados de PI

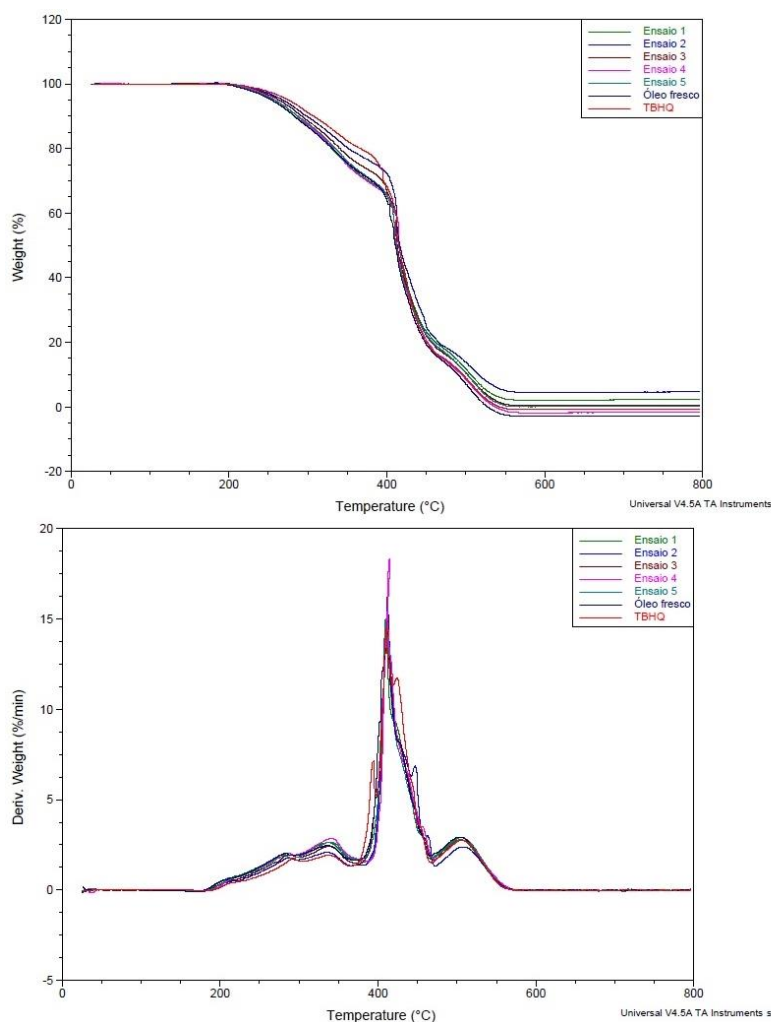


Fig. 6. Curvas TG/DTG obtidas a partir da análise t do óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) com e sem antioxidantes

4. Conclusão

Os resultados indicaram que as sementes de chia brasileira são importantes fontes de proteínas, fibra alimentar, ácidos graxos polinsaturados, especialmente o α -linolênico, e compostos bioativos com potencial nutricional e tecnológico. Sementes e óleo de chia também contêm compostos fenólicos, principalmente, miricetina, quercetina, kampferol e ácido sináptico. O óleo contém ainda elevados teores de tocoferóis que contribuem para a elevada capacidade antioxidante. O consumo de chia, por suas características nutricionais e funcionais portanto, pode ser uma alternativa importante na dieta humana para melhoria da saúde.

O estudo de estabilidade oxidativa mostrou que apesar da presença de compostos antioxidantes, o alto teor de ácidos graxos polinsaturados susceptíveis à oxidação, requer o uso

de meios que retardem o processo de oxidação, como aditivação com substâncias antioxidantes, tecnologias inovadoras como encapsulação e uso de embalagens “inteligentes”.

Referências

- Ackman, R. G., & Eaton, C. a. (1977). Specific gravities of rapeseed and canbra oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 54(10), 435.
- Ahn, J.-H., Kim, Y.-P., Lee, Y.-M., Seo, E.-M., Lee, K.-W., & Kim, H.-S. (2008). Optimization of microencapsulation of seed oil by response surface methodology. *Food Chemistry*, 107(1), 98–105.
- Álvarez-Chávez, L. M., Valdivia-López, M. D. L. A., Aburto-Juárez, M. D. L., & Tecante, A. (2008). Chemical Characterization of the Lipid Fraction of Mexican Chia Seed (*Salvia hispanica* L.). *International Journal of Food Properties*, 11(3), 687–697.
- AOAC Association of Official Analytical Chemists. (2000). *Official methods of analysis of AOAC International* (19th ed.). Washington, D.C.: AOAC International.
- ASTM D4052. (2015). Standard Test Method for Density , Relative Density , and API Gravity of Liquids by Digital Density Meter.
- ASTM D445. (2015). Standard Test Method for Kinematic viscosity of transparent and Opaque Liquids.
- Ayerza, R. (1995). Oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.), from five northeastern locations in northwestern Argentina. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72(9), 1079–1081.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2004). Composition of chia (*Salvia hispanica*) grown in six tropical and subtropical ecosystems of South America. *Tropical Science*, 44(3), 131–135.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2004). Composition of chia (*Salvia hispanica*) grown in six tropical and sub-tropical ecosystems of South America. *Tropical Science*, 44(3), 131–135.

- Ayerza, R., & Coates, W. (2011). Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Industrial Crops and Products*, 34(2), 1366–1371.
- Barba De La Rosa, A. P., Herrera-Estrella, A., Utsumi, S., & Paredes-López, O. (1996). Molecular characterization, cloning and structural analysis of a cDNA encoding an amaranth globulin. *Journal of Plant Physiology*, 149(5), 527–532.
- Bera, D., Lahiri, D., & Nag, A. (2006). Studies on a natural antioxidant for stabilization of edible oil and comparison with synthetic antioxidants. *Journal of Food Engineering*, 74(4), 542–545.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911–917.
- Bolaños, D., Marchevsky, E. J., & Camiña, J. M. (2015). Elemental Analysis of Amaranth, Chia, Sesame, Linen, and Quinoa Seeds by ICP-OES: Assessment of Classification by Chemometrics. *Food Analytical Methods*.
- Borderías, a. J., Sánchez-Alonso, I., & Pérez-Mateos, M. (2005). New applications of fibres in foods: Addition to fishery products. *Trends in Food Science and Technology*, 16(10), 458–465.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254.
- BRASIL. (2005). Resolução RDC ANVISA/MS nº. 270, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 set. 2005. Seção 1.
- Capitani, M. I., Spotorno, V., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2012a). Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT - Food Science and Technology*, 45(1), 94–102.

- Capitani, M. I., Spotorno, V., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2012b). Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT - Food Science and Technology*, 45, 94–102.
- Coates, W., & Ayerza (h), R. (1996). Production potential of chia in northwestern Argentina. *Industrial Crops and Products*, 5(3), 229–233.
- Codex Alimentarius Comission. (1999). Standard for edible fats and oils not covered by individual standards. Codex Stan 19-1981.
- Condelli, N., Caruso, M. C., Galgano, F., Russo, D., Milella, L., & Favati, F. (2015). Prediction of the antioxidant activity of extra virgin olive oils produced in the Mediterranean area. *Food Chemistry*, 177, 233–239.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.001>
- Costa, J. F., Almeida, M. F., Alvim-Ferraz, M. C. M., & Dias, J. M. (2013). Biodiesel production using oil from fish canning industry wastes. *Energy Conversion and Management*, 74, 17–23.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174–81.
- Delgado-Zamarreño, M. M., Bustamante-Rangel, M., Sánchez-Pérez, A., & Carabias-Martínez, R. (2004). Pressurized liquid extraction prior to liquid chromatography with electrochemical detection for the analysis of vitamin E isomers in seeds and nuts. *Journal of Chromatography A*, 1056(1-2), 249–252.
- EPA. (1998). *Método 6020A (SW-846): plasma indutivamente acoplado-espectrometria de massa*.
- Fan, L., & Eskin, N. A. M. (2015). *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. Elsevier.
- FAO/WHO. (2001). Human Vitamin and Mineral Requirements. *Human Vitamin and Mineral Requirements*, 303.

- Ganesan, B., Brothersen, C., & McMahon, D. J. (2014). Fortification of foods with omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 98–114.
- Gómez-caravaca, A. M., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-carretero, A., & Fernández-gutiérrez, A. (2006). Original Paper A simple and rapid electrophoretic method to characterize simple phenols , lignans , complex phenols , phenolic acids , and flavonoids in extra- virgin olive oil, 2221–2233.
- Gorinstein, S., Martin-Belloso, O., Katrich, E., Lojek, A., Číž, M., Gligelmo-Miguel, N., ... Trakhtenberg, S. (2003). Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14(3), 154–159.
- Hartman, L., & Lago, L. C. (1973). Rapid preparation of fatty acids methyl esters. *Laboratory Practice*, 22, 475–476.
- Hov, G. G., Aasarød, K. I., Sagen, E., & Åsberg, A. (2015). Arginine, dimethylated arginine and homoarginine in relation to cardiovascular risk in patients with moderate chronic kidney disease. *Clinical Biochemistry*, 48(10-11), 646–51.
- Hui, Y. H. (2006). *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering*. CRC Press.
- Ixtaina, V. Y. (2010). *Caracterización de la semilla e el aceite de chía (Salvia hispanica L.) obtenido mediante distintos procesos: aplicación en tecnología de alimentos*. La Plata: Universidad Nacional de La Plata.
- Ixtaina, V. Y., Martínez, M. L., Spotorno, V., Mateo, C. M., Maestri, D. M., Diehl, B. W. K., ... Tomás, M. C. (2011). Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(2), 166–174.
- Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2012). Oxidative stability of chia (*Salvia hispanica* L.) seed oil: Effect of antioxidants and storage conditions. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(6), 1077–1090.

- Jayaprakasha, G. K., & Jaganmohan Rao, L. (2000). Phenolic Constituents from the Lichen *Parmotrema stuppeum* (Nyl .) Hale and Their Antioxidant Activity. *Zeitschrift Für Naturforschung*, 55, 1018–1022.
- Khattab, R. Y., & Zeitoun, M. a. (2013). Quality evaluation of flaxseed oil obtained by different extraction techniques. *LWT - Food Science and Technology*, 53(1), 338–345.
- Manach, C., Mazur, A., & Scalbert, A. (2005). Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, 16(1), 77–84.
- Marineli, R. S., Moraes, É. A., Lenquiste, S. A., Godoy, A. T., Eberlin, M. N., & Maróstica Jr, M. R. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 1304–1310.
- Marinova, E., Toneva, A., & Yanishlieva, N. (2008). Synergistic antioxidant effect of α -tocopherol and myricetin on the autoxidation of triacylglycerols of sunflower oil. *Food Chemistry*, 106(2), 628–633.
- Martínez, M. L., Curti, M. I., Roccia, P., Llabot, J. M., Penci, M. C., Bodoira, R. M., & Ribotta, P. D. (2015). Oxidative stability of walnut (*Juglans regia* L.) and chia (*Salvia hispanica* L.) oils microencapsulated by spray drying. *Powder Technology*, 270, 271–277.
- Michotte, D., Rogez, H., Chirinos, R., Mignolet, E., Campos, D., & Larondelle, Y. (2011). Linseed oil stabilisation with pure natural phenolic compounds. *Food Chemistry*, 129(3), 1228–1231.
- Monda, M., Viggiano, a, Sullo, a, & De V, L. (1998). Aspartic and glutamic acids increase in the frontal cortex during prostaglandin E1 hyperthermia. *Neuroscience*, 83(4), 1239–1243.
- Nagori, K., Singh, M. K., Dewangan, D., Verma, V. K., & Tripathi, D. K. (2010). Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. *Journal Of Chromatography*, 2(5), 122–130.

- Nandi, I., & Ghosh, M. (2015). Studies on functional and antioxidant property of dietary fibre extracted from defatted sesame husk, rice bran and flaxseed. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5(2), 129–136.
- Nascimento, A. C., Mota, C., Coelho, I., Gueifão, S., Santos, M., Matos, A. S., ... Castanheira, I. (2014). Characterisation of nutrient profile of quinoa (*Chenopodium quinoa*), amaranth (*Amaranthus caudatus*), and purple corn (*Zea mays* L.) consumed in the North of Argentina: Proximates, minerals and trace elements. *Food Chemistry*, 148, 420–426.
- Niki, E. (2001). Lipid peroxidation and its inhibition: Overview and perspectives. *Journal of Oleo Science*, 50(2), 47–54.
- Olivos-Lugo, B. L., Valdivia-López, M. Á., & Tecante, A. (2010). Thermal and physicochemical properties and nutritional value of the protein fraction of Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.). *Food Science and Technology International = Ciencia Y Tecnología de Los Alimentos Internacional*, 16(1), 89–96.
- Osborne, T. B. (1924). *The vegetable proteins. Monographs on Biochemistry*. (2nd ed.). London: Longmans green and Co.
- Papas, A. M. (1998). *Antioxidant status, diet, nutrition, and health*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Park, Y. (2016). Dietary fiber and health: Cardiovascular disease and beyond. In *Fruits, Vegetables, and Herbs* (pp. 423–449). Elsevier.
- Penfield, M. P., & Campbell, A. M. (1990). *Experimental food science* (3rd ed.). San Diego, Academic Press.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74.
- Ragaei, S., Abdel-Aal, E. S. M., & Noaman, M. (2006). Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *Food Chemistry*, 98(1), 32–38.

- Ramadan, M. F., & El-Shamy, H. (2013). Snapdragon (*Antirrhinum majus*) seed oil: Characterization of fatty acids, bioactive lipids and radical scavenging potential. *Industrial Crops and Products*, 42(1), 373–379.
- Rayman, M. P. (2000). The importance of selenium to human health. *The Lancet*, 356, 233–41.
- Reeds, P. J. (2000). Dispensable and Indispensable Amino Acids for Humans. *The Journal of Nutrition*, 1835–1840.
- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., & Valdivia-López, M. A. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107, 656–663.
- Sandhu, K. S., Godara, P., Kaur, M., & Punia, S. (2015). Effect of toasting on physical, functional and antioxidant properties of flour from oat (*Avena sativa* L.) cultivars. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 0–6.
- Sandoval-Oliveros, M. R., & Paredes-López, O. (2013). Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(1), 193–201.
- Santos, N. a., Cordeiro, A. M. T. M., Damasceno, S. S., Aguiar, R. T., Rosenhaim, R., Carvalho Filho, J. R., ... Souza, A. G. (2012). Commercial antioxidants and thermal stability evaluations. *Fuel*, 97, 638–643.
- Segura-Campos, M. R., Salazar-Vega, I. M., Chel-Guerrero, L. a., & Betancur-Ancona, D. a. (2013). Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 723–731.
- Simopoulos, A. P. (2004). Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acid Ratio and Chronic Diseases. *Food Reviews International*, 20(1), 77–90.
- Singh, S. P., & Singh, D. (2010). Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 200–216.

- Tuberoso, C. I. G., Kowalczyk, A., Sarritzu, E., & Cabras, P. (2007). Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Food Chemistry*, 103(4), 1494–1501.
- USDA (United States Department of Agriculture). (2015). National Nutrient Database for Standard Reference Release 28. Retrieved November 9, 2015, from <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search>
- Vázquez-Ovando, J. A., Rosado-Rubio, J. G., Chel-Guerrero, L. A., & Betancur-Ancona, D. A. (2010). Dry processing of chía (*Salvia hispanica* L.) flour: chemical characterization of fiber and protein. *CyTA - Journal of Food*, 8(2), 117–127.
- Volli, V., & Purkait, M. K. (2014). Physico-chemical properties and thermal degradation studies of commercial oils in nitrogen atmosphere. *Fuel*, 117, 1010–1019.
- White, J. A., Hart, R. J., & Fry, J. C. (1986). An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *Journal of Automatic Chemistry*, 8(4), 170–177.
- Williams, S. M., Sullivan, R. K. P., Scott, H. L., Finkelstein, D. I., Colditz, P. B., Lingwood, B. E., ... Pow, D. V. (2005). Glial glutamate transporter expression patterns in brains from multiple mammalian species. *Glia*, 49(4), 520–541.
- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M., & Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 381–406.
- Yanishlieva, N. V., & Marinova, E. M. (1992). Inhibited oxidation of the lipids. I. Complex estimation and comparison of the antioxidative properties of some natural and synthetic antioxidants. *Fat Science Technology*, 94(10), 374–379.

Optimization of the extraction of phenolic compounds from seeds of Brazilian chia using mixture design

Maristela Alves Alcântara^a, Isabelle de Lima Brito Polari^a, Bruno Raniere Lins de Albuquerque Meireles^a, Anderson Eduardo Alcântara de Lima^b, Raul Rosenhaim^c, Nataly Albuquerque dos Santos^{d,e}, Antonio Gouveia de Souza^a, Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro^{a,d,e}

^aGraduation Program in Food Science and Technology, CT, Campus I, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58051-900 João Pessoa, Paraíba, Brazil.

^b Graduation Program in Chemistry, CCEN, Campus I, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58051-900 João Pessoa, Paraíba, Brazil.

^c Department of Chemical Engineering, CT, Campus I, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58051-900 João Pessoa, Paraíba, Brazil.

^d Department of Food Technology , CTDR, Campus I, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58051-900 João Pessoa, Paraíba, Brazil.

^e UFPB Institute of Paraíba Development, Campus I, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58051-900 João Pessoa, Paraíba, Brazil.

ABSTRACT

This study investigated the efficiency of the extraction of phenolic compounds from seeds of chia, *Salvia hispanica* L. utilizing the statistical tool of mixture planning, simplex-lattice design. The solvents used were acetone, ethanol and water and the responses analyzed were total phenolic content (TPC), antioxidant activity by the capture of the free radical DPPH and ferric reduction ability (FRAP). It was possible to assess the efficiency of extraction of phenolic compounds of chia, by the solvents, when isolated or in binary mixture. The polarity of the solvents and their mixture strongly influenced the extraction, in which mixtures of moderately polar mixtures, such as acetone-water and ethanol-water were highly efficient to extract the antioxidant phenolic compounds. The phenolic profile showed that the acids sinapic, caffeic, salicylic, protocatechuic, hydroxybenzoic acid, syringic and the flavonoids myricetin, quercetin and kaempferol are the compounds that most contribute to the elevated antioxidant activity.

Keywords: *Salvia hispanica* L.; Antioxidant activity; Mixture design; Phenolic compounds

1. Introduction

Chia (*Salvia hispanica* L.) is an annual herbaceous plant that belongs to the *Lamiaceae* family. This plant is native from Southern Mexico and northern Guatemala (Coates & Ayerza, 1996), and has recently been marketed as a crop in South America (Ayerza & Coates, 2011).

Chia seeds have been described as a good source of oils, proteins, fibers and minerals (Ayerza & Coates, 2004; Capitani, Spotorno, Nolasco, & Tomás, 2012; Marineli et al., 2014). However the bigger interest in its use is due to its high oil content, supplying a rich source of poly-unsaturated fatty acids. The chia oil is unique, since it contains the highest proportion of omega-3-linolenic acid of any known natural source (Coates & Ayerza, 1996). On the other hand, the process of oil extraction from the seeds gives rise to a residue, rich in phenolic compounds with antioxidant potential, which can be used in commercial applications, such as oils and fats (Matthäus, 2002).

Phenolic compounds are considered as secondary metabolites, which are synthesized by plants during the normal development (Harborne, 1993) and as an answer to stress conditions such as infections, injuries, UV radiation, among others (Beckman, 2000; Nicholson & Hammerschmidt, 1992).

Due to the increasing demand for phenolic compounds and its growing application in the food industry, as antimicrobial and antioxidant agents and as food stabilizers, several studies related to the extraction of phenolic compounds have been carried out. The phenolic compounds can be extracted by several solvents and several extraction methods. Solvent extraction is the most common method used to isolate natural antioxidants. The solvent properties present, undoubtedly the key role in the extraction of antioxidant compounds (Rezaie, Farhoosh, Iranshahi, Sharif, & Golmohamadzadeh, 2015).

In many extraction systems, the solvents are utilized isolatedly, however they can produce inefficient results. In these cases it is convenient to use solvent mixtures, which can vary from binary, ternary and even multicomponent mixtures. An important aspect in the studies performed in mixed solvents is the role of solvent-solvent interactions in competition for the solvation of solutes (Shafique, Hussain, Asif, Pradhan, & Farooqui, 2013).

Experiments with mixing are a special class of experiments with response surface, in which the estimate of the properties of a multicomponent system is possible, starting from a limited number of observations. These observations are obtained from pre-selected combinations of components in an attempt to determine which of them, somehow, optimize the response (Piepel & Cornell, 1994).

We used the statistical mixture design with a simplex lattice model, with acetone, ethanol and water as solvents, aiming at identifying the most adequate mixture for the extraction of phenolic compounds from seeds of chia (*Salvia hispanica* L.), in such a way to produce the dry extract with the biggest antioxidant activity. Such activity was evaluated by the capture of free radicals and ferric reduction ability besides the biggest total phenolic content, as well as the identification by HPLC of these compounds.

2. Materials and methods

2.1. Seeds

The seeds of chia (*Salvia hispanica* L.) produced in Entre-Ijuís, state of Rio Grande do Sul, in the Southern region of Brazil, were acquired from Giroil Agroindústria Ltd. According to the producer, the seeds were harvested and dried, passing only by a cleaning process with subsequent vacuum packaging. The seed samples were milled in a food processor (Pratic Blender Cadence, BLD300) and degreased with n-hexane in a Soxhlet apparatus. The resulting flour was stored in a dark container under refrigeration (2-8 °C) until the moment of analysis.

2.2. Reagents

The standards of gallic acid, TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine), DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), the phenolic acids: protocatechuic, hydroxybenzoic, salicylic, syringic, gentisic, vanillic, p-coumaric, sinapic, trans-cinnamic, caffeic and ferulic and flavonoids: rutin, myricetin, quercetin, naringin, kaempferol, catechin, hesperetin, chrysin were obtained from Sigma-Aldrich (Sigma Co., USA). The Folin-Ciocalteu reagent was supplied by Merck. The reagents ferric chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sodium acetate trihydrate and sodium carbonate were obtained from Vetec Química Fina Ltd. The solvents n-hexane, acetone, and ethanol, of analytical grade were obtained from FMAIA. HPLC grade methanol and acetonitrile from J. T. Baker (Phillipsburg, USA).

2.3. Preparation of the antioxidant extracts

In order to investigate the effect of the different solvents in the extraction of the phenolic compounds in the chia flour, a simplex-lattice design was utilized with acetone, ethanol and water. The antioxidant extracts were obtained in a proportion sample – solvent or solvent mixture of 1:10 at room temperature under mechanical stirring (ET-420 Incubator) for 3 h.

Next, followed centrifugation (5000 x *g* for 10 min), vacuum filtration and overnight (15h) drying in an oven with air circulation at 40 ° C. The experimental design produced 14 extracts that were used to evaluate the antioxidant potential.

2.4. Total phenolic content (TPC)

The total phenolic content of the chia seeds extracts was determined according to the Folin-Ciocalteu's method (Slinkard & Singleton, 1977) with some modification. A 150 µL aliquot of the extract (5 mg/mL in ethanol) was transferred to a test tube containing 60 µL of Folin-Ciocalteu reagent and 2.61 µL of distilled water. The mixture was stirred and after 1 minute, 180 µL of Na₂CO₃ (15%) were added. After the incubation of the solutions for 2 h at room temperature, the absorbance readings of the mixtures were measured at 760 nm. Gallic acid was used in the standard curve (0.001-0.020 mg/mL in ethanol) and the results were expressed in terms of gallic acid equivalent (mg GAE/g extract).

2.5. DPPH free radical scavenging activity

The activity of elimination of the free radicals of the extracts was determined based on the DPPH (Rufino et al., 2007), with some modification. A 30 µL aliquot of the extract was added into 3.0 mL of a diluted DPPH solution in ethanol (0.0236 mg/mL), stirred and incubated for 30 min in the dark, and the absorbance was measured at 517 nm. The standard curve was obtained with Trolox (100-2000 µmol/L in ethanol). The results were expressed in µmol Trolox equivalent (TE)/g extract.

2.6. FRAP Assay (ferric reducing antioxidant power)

The antioxidant capacity of ferric reduction was determined by the FRAP method (Rufino et al., 2006), with adaptation. Under darkened condition, the FRAP reagent was prepared with a 300 mmol/L acetate buffer (pH 3.6), 2,4,6-tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) 10 mmol /L in a solution of 40 mmol /L and a 20 mmol /L. A suitable aliquot of the extract was transferred to a test tube and added 0.27 mL of ultrapure water and 2.7 mL of FRAP reagent. The mixture was stirred and kept in a water bath for 30 minutes at 37 ° C. After cooling to room temperature, the samples and standards were read at 595 nm. The standard curve was performed with Trolox (100-2000 mmol / L in ethanol). The results were expressed in micromol Trolox equivalent (TE) / g extract.

2.7. HPLC analysis

The chromatographic analyses were carried out in a high performance liquid chromatograph (HPLC) Shimadzu (Kyoto, Japan), equipped with an automatic injector Rheodyne 7125i and one UV/VIS detector. The columns utilized were a Shimadzu LC-18 (25 cm x 4.6 mm, 5 μ m particle size, from Supelco, Bellefonte, PA, USA) and a Shimadzu C-18 ODS pre-column. For the identification of the phenolic compounds, the samples were eluted with a gradient system consisting of solvent A (2% acetic acid, v/v) and solvent B (acetonitrile: methanol, 2:1, v/v), used as the mobile phase, with a flow rate of 1 mL/min. The temperature of the column was maintained at 25 °C and the injection volume was 20 μ L. The gradient system started from 90% A at 0 min, to 80% A at 10 min, 70% A at 15 min, 60% A at 25 min, 50% A at 30–40 min, 75% A at 42 min, and 90% A at 44 min. The peaks of the phenolic compounds were monitored at 280 nm. The LabSolutions (Shimadzu) software was used to control the LC–UV system and for data processing.

2.8. Mixture design and models

The multivariate statistical technique used to optimize the mixing, simplex lattice design with axial points, was chosen because of the possibility of studies in all solvent proportions (0–100%). Besides this, such technique allows to examine a possible effect of interaction between the variables. All the tested conditions are represented in Table 1.

In this model, the different conditions testes make up a triangle, with the pure components in the vertices, thus representing 100% of each solvent. The representation of the mixtures are as follow: points in the sides, binary mixture (1/3:2/3); central point, ternary mixture (1: 1: 1) and axial points, ternary mixtures (2/3 of one of the solvents and solvents in which 1/6 for the other two). For this study, it was adopted the mathematical model more adequate for the responses (TPC, DPPH, FRAP), with restriction for the minimum and maximum levels.

2.9. Statistical analysis

The results of ANOVA, the regression analysis and response surfaces from models adjusted for simplex lattice were obtained using Statistica 7.0 (StatSoft). For each response, the models: linear, quadratic and cubic were tested. The most appropriate model, with a confidence level of 95% (p-value <0.05) was adopted.

3. Results and discussion

From the data of Table 1 that shows the simplex lattice design results, the ANOVA results of regression models from Simplex lattice design for the solvent optimization are shown in (Tab. 2). These data allowed to plot the contour plot (Fig.1) for the total phenolic content (TPC) the antioxidant activity (DPPH) and the antioxidant activity (FRAP), as a function of solvent proportions.

Table 1 - Experimental variables and responses used in the simplex-lattice mixture design.

Run number	Independent variables						Responses		
	Coded variables			Real variables			TPC ^a	DPPH ^a	FRAP ^a
	X ₁	X ₂	X ₃	Water	Ethanol	Acetone			
1	1.0000	0.0000	0.0000	100	0	0	34.71	110.87	370.33
2	0.0000	1.0000	0.0000	0	100	0	10.10	10.10	20.38
3	0.0000	0.0000	1.0000	0	0	100	36.18	56.87	200.55
4	0.3333	0.6667	0.0000	33.33	66.67	0	45.73	223.20	510.65
5	0.3333	0.0000	0.6667	33.33	0	66.67	58.44	250.20	720.15
6	0.0000	0.3333	0.6667	0	33.33	66.67	23.53	60.87	190.05
7	0.6667	0.3333	0.0000	66.67	33.33	0	54.10	250.20	680.65
8	0.6667	0.0000	0.3333	66.67	0	33.33	57.67	277.20	773.65
9	0.0000	0.6667	0.3333	0	66.67	33.33	15.60	40.27	100.55
10	0.3333	0.3333	0.3333	33.33	33.33	33.33	51.86	300.87	725.65
11	0.6667	0.1667	0.1667	66.67	16.67	16.67	56.97	290.20	800.65
12	0.1667	0.6667	0.1667	16.67	66.67	16.67	40.54	200.87	480.65
13	0.1667	0.1667	0.6667	16.67	16.67	66.67	60.96	380.53	990.15
14	0.3333	0.3333	0.3333	33.33	33.33	33.33	51.60	299.20	720.65

^a The results are expressed in mg GAE/g extract for the total phenolic contents (TPC) and $\mu\text{mol TE/g}$ dry extract for the antioxidant activities (DPPH, FRAP).

Table 2 - ANOVA results of regression models from Simplex lattice design for solvent optimization.

ANOVA Source	SS	DF	F-value	p-value	R ²
<i>TPC</i>					
Linear	1520.78	2	4.05	0.048	0.42
Quadratic	1827.24	3	20.41	0.0004	0.93
Special Cubic	20.11	1	0.64	0.449	0.93
Full Cubic	38.18	3	0.28	0.837	0.94
<i>DPPH</i>					
Linear	36132.20	2	1.38	0.292	0.20
Quadratic	112272.70	3	9.48	0.005	0.83
Special Cubic	6832.75	1	1.93	0.207	0.86
Full Cubic	6378.20	3	0.46	0.724	0.90
<i>FRAP</i>					
Linear	371231.08	2	2.55	0.123	0.32
Quadratic	612997.26	3	8.66	0.006	0.84
Special Cubic	23527.85	1	0.99	0.351	0.86
Full Cubic	42263.06	3	0.46	0.726	0.90

The results showed that, according to ANOVA, the quadratic model is the one that satisfactorily reproduce (p -value of 0.0004 for TPC; 0.005 for DPPH and 0.006 para FRAP) the response values in the vertices and the triangle edges concentrations, which respectively represent the individual components and their binary mixtures. Conversely, the p -values of linear and cubic models are shown outside the adopted confidence level.

On the other hand, from the treatment of the data to obtain the contour plots, it is possible to verify the influence of the interaction of the ternary mixtures (points in the interior of the triangle).

In order to investigate the quadratic model the global adjustment was applied to the studied answers, according to Table 3.

Table 3 - ANOVA results for overall fit of the quadratic model.

ANOVA Source	SS	D F	F-value	p-value	Equation
<i>TPC</i>					
Model	3348.02	5	22.43	0.0002	$y = 33.04w + 9.84e + 37.92a + 132.48we + 112.71wa - 4.16ea + 0$
Total Error	238.82	8			
Lack of fit	238.79	7	1009.25	0.024	$R^2=0.93$
Pure Error	0.03	1			
<i>DPPH</i>					
Model	150025.88	5	7.63	0.007	$y = 88.14w - 7.62e + 74.37a + 946.51we + 996.98wa + 269.52ea + 0$
Total Error	31450.38	8			
Lack of fit	31449.99	7	3221.85	0.01	$R^2=0.83$
Pure Error	1.39	1			
<i>FRAP</i>					
Model	984228.35	5	8.33	0.005	$y = 335.24w - 8.86e + 258.61a + 2101.16we + 2421.08wa + 548.39ea + 0$
Total Error	188845.33	8			
Lack of fit	188832.83	7	2158.09	0.02	$R^2=0.84$
Pure Error	12.50	1			

From the positive coefficients in the equations presented in Table 3, it is possible to notice that the efficiency of the extraction of the chia phenolic compounds by the solvents, when isolated or in binary mixtures. These differences in the extraction efficiency by several solvents has been ascribed to their polarities and it strongly depends of the material matrix, as well as from the type of extractable compounds (Rezaie et al., 2015).

When isolated, acetone can be used to obtain the highest value of TPC (coefficient of 37.92 for β_3), on the other hand, for DPPH and FRAP, water is the best solvent. It may be noticed by the coefficients of the model (88.14 and 335.24 for β_1). For the binary mixtures, the coefficients present more efficient interaction, as when the mixture coefficient is bigger than the average of the isolated solvents, this indicates that the two components act in synergy.

It is possible to notice, by the negative coefficients in the equations, that ethanol is not an indicated solvent for the determinations of DPPH and FRAP (-7.62 and -28.86 for β_2). An antagonistic effect is also visualized for the mixture of ethanol and acetone in the case of TPC (-4.16 for β_{23}).

3.1. Effect of the solvents on the extraction of the total phenolic compounds (TPC)

The amount of the total phenolic compounds extracts from the chia seeds by the different solvents varied from 10.10 to 60.96 mg GAE/g extract (Table 1).

Fig. 1 shows that the mixture of solvents displays a higher capacity of phenolics extract than the isolated solvents. The mathematical model equation for TPC shows the efficiency of compound extract in the decreasing order: water-ethanol; acetone-water; acetone; water; ethanol. On the other hand, it is shown in the contour plot that the ternary mixture presented a significant influence on the extraction. The results obtained are in agreement with the studies reported by Chew et al., (2011) and Fernández-Agulló et al., (2013), which related that the mixture of solvents is more favorable for the extraction of phenolic compounds in vegetable samples than the mono-solvent systems.

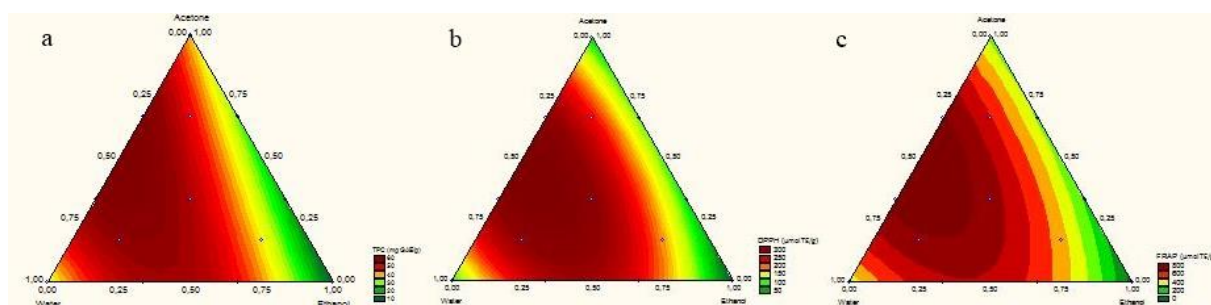


Fig. 1. Contour plot as a function of solvent proportion (a): total phenolic content (TPC) (b): antioxidant activity (DPPH) (c): antioxidant activity (FRAP)

The addition of water to the organic solvents improved the extraction efficiency, what can be explained by the presence of sugars, proteins and other components that more soluble in water than in ethanol and acetone (Zieliński & Kozłowska, 2000). Besides this, the use of water in combination with organic solvents contributes to the creation of moderate polar medium, favoring the extraction (Liyana-Pathirana & Shahidi, 2006), once the chemical nature of the phenolic compounds varies from the simple to highly polarized (Andreo & Jorge, 2006).

This can be confirmed by the studies of Reyes-Caudillo, Tecante, & Valdivia-López, (2008) and Marineli et al. (2014) that found values of 0.92 and 0.94 mg GAE per gram of chia seed, respectively, where as Martínez-Cruz & Paredes-López, (2014) determined 1.64 mg GAE/g of chia seeds for the (70:30 v/v) methanol/ water mixture. Converting the values obtained in this present study of mg GAE/g de extract to mg GAE/g seeds, we have for the

ethanolic extract (run 2) and hydroethanolic extract (run 4) the values of 0.51 and 2.23 mg GAE/g de seeds (Table 1).

3.2. Effect of the solvents on the antioxidant activity by the scavenging of the DPPH• free radicals

The radical is commonly used for the evaluation of the antioxidant activity in in vitro essays. DPPH• is a stable free radical that accepts one electron or a hydrogen atom to become a stable molecule. As the result of the color change from purple to yellow color, the absorbance decreases when the radical is eliminated by an antioxidant compound (Bondet, Brand-Williams, & Berset, 1997).

The results showed variations in the DPPH• radical scavenging activity in extracts of chia seeds from 10.10 to 380.53 $\mu\text{mol TE/g}$ extract (Table 1). The influence of the solvent utilized on the extraction of the phenolic compounds was determinant for the results of DPPH• antioxidant activity. The antioxidant potential determined by this method followed the same tendency observed for the total phenolic compounds, in which the extracts obtained with the binary mixtures water-acetone, water-ethanol and ternary mixture were more efficient in the extraction of compounds with antioxidant activity than the mono-component solvent systems. These results can indicate that the phenolic compounds present in the chia seeds display a moderately polar character. Similarly to the present study, moderately polar mixtures like acetone and water have been reported to be more efficient in the extraction of phenolics from different natural sources, especially in protein-rich foods, once this type of mixture is able to degrade polyphenol-protein complexes (Meneses, Martins, Teixeira, & Mussatto, 2013). This fact explains the elevate efficiency of this solvent mixture in extracting phenolic compounds from chia seeds, once this material presents a high protein content.

Not observed in the quadratic model, but visualized in the contour plot (Fig. 1), the highest antioxidant activity experimentally obtained was the ternary mixture (1/6w; 1/6e; 2/3a) with 380.53 $\mu\text{mol TE/g}$.

Similar results were reported by Marineli et al., (2014) for the Chilean chia (436.61 $\mu\text{mol TE/g}$) and by Capitani et al., (2012) for the fibrous fractions of the Argentinean chia obtained by pressure and solvent 446.40 and 348.60 $\mu\text{mol TE/g}$, respectively.

3.3. Effect of the solvents on the antioxidant activity by FRAP

The ferric reduction power is often utilized as an indicator of the activity of donating electrons, which is an important property to test the antioxidant action of phenols. This method

is based on the capacity of a compound to reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} (Terpinc, Polak, Makuc, Ulrih, & Abramovič, 2012).

The results of the antioxidant activity by the FRAP method showed variations from 20.38 to 990.15 $\mu\text{mol TE/g}$ extract (Table 1). Equally to the behavior of results of TPC and DPPH, the highest antioxidant activity by the FRAP assay was also obtained for the binary extracts water-acetone, water-ethanol and ternary mixture (Fig 1). A similar result was obtained by Meneses et al., (2013) upon investigating the influence of the influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains.

According to Mussatto, Ballesteros, Martins, & Teixeira, (2011), the utilization of organic solvents like acetone and ethanol in the manufacturing process to obtain food ingredients is regulated from the standpoint of food safety. Thus, it is preferable to utilize solvent mixtures such water-acetone or water-ethanol, as they present a more efficient extraction of the phenolic compounds.

3.4. HPLC analysis

The composition of the phenolic substances present in the chia extracts were determined by HPLC. Table 4 shows the quantification of main present substances.

The phenolic compounds present in species of the family *Lamiaceae* species are potential sources of natural antioxidants for commercial operation and are typically compounds of benzoic acids, cinnamic acids and their esters and flavonoids (Boros et al., 2010).

As evidenced in Table 4, in the chia seeds extracts, the main phenolic compounds identified and quantified are the acids sinapic, caffeic, salicylic, protocatechuic, hydroxybenzoic, gentisic and the flavonoids myricetin, quercetin e kaempferol, what is in accordance with the literature. Reyes-Caudillo et al., (2008) found that the major phenolic components of Mexican chia seed crude extracts are glycosides of quercetin and kaempferol, furthermore, hydrolyzed extracts showed significant amounts of the same aglycon phenolic compounds. Recently, Marineli et al., (2014) identified the presence of chlorogenic acid, quercetin, myricetin and decarboxymethyl elenolic acid linked by EASI (-)-MS and Martínez-Cruz & Paredes-López, (2014) found as the main compounds found in chia by UHPC the acids rosmarinic, protocatechuic, caffeic, gallic and daidzin.

The extracts that present the highest values of phenolic compounds were the number 5 (1/3 water - 2/3 acetone), number 10 (1/3 water - 1/3 ethanol - 1/3 acetone) and number 13 (1/6 water - 1/6 ethanol - 2/3 acetone), with their chromatogram displayed in Fig. 2.

Table 4 - Phenolic compounds present in seeds of chia (*Salvia hispanica* L.) using different solvent proportions for the extraction.

Phenolic compound	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>Hydroxybenzoic acid</i>														
Protocatechuic acid	18.6	3.8	9.4	8.2	4.0	3.8	25.6	29.6	2.8	17.0	4.4	3.0	13.8	4.0
Hydroxybenzoic acid	9.4	0.8	0.4	0.6	6.6	1.2	13.0	14.6	1.2	4.6	12.2	1.0	nd	1.2
Salicylic acid	7.6	nd	9.6	81.6	25.0	9.6	16.2	18.6	6.2	10.4	15.8	114.6	241.2	10.2
Syringic acid	9.2	8.0	0.2	3.4	2.0	0.2	4.0	5.2	1.0	1.2	4.2	0.2	3.4	1.2
Gentisic acid	16.8	3.0	7.2	0.4	10.2	5.4	10.0	8.6	4.2	4.8	8.8	1.4	nd	8.0
Vanillic acid	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ellagic acid	3.6	3.4	3.6	nd	nd	3.4	nd	nd	3.4	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Hydroxycinnamic acid</i>														
<i>p</i> -coumaric acid	2.4	0.2	0.4	0.6	5.2	0.2	0.2	3.8	0.2	3.2	3.2	0.4	5.0	0.4
Sinapic acid	3.2	3.0	3.8	82.4	304.0	6.4	233.4	238.2	5.2	373.2	200.2	89.0	174.4	371.4
trans-cinnamic acid	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Caffeic acid	2.0	0.2	0.2	0.8	4.8	0.4	3.4	3.4	0.2	3.8	2.8	1.4	3.6	3.2
Ferulic acid	0.4	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.4	0.2	0.1	14.4	0.4
<i>Flavonoid</i>														
Rutin	5.6	4.4	4.6	1.2	13.6	7.4	14.0	17.0	6.8	6.8	13.6	96.4	182.8	6.8
Myricetin	40.2	7.0	125.0	80.2	267.4	15.0	146.6	166.2	11.6	178.6	132.6	72.4	198.6	177.8
Quercetin	9.2	29.6	4.8	10.2	19.4	6.2	14.4	14.6	5.6	18.2	13.0	12.8	18.0	18.8
Naringin	0.8	nd	nd	0.4	0.2	nd	0.4	0.2	nd	0.4	0.2	0.8	0.2	0.4
Kaempferol	8.6	7.4	7.6	7.6	7.4	7.8	8.4	7.6	7.6	7.8	8.2	7.8	8.2	7.8
Catechin	8.8	0.6	2.0	1.0	2.4	1.6	5.0	4.4	0.4	2.0	7.2	1.2	8.2	2.0
Hesperetin	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Chrysin	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr

The results are expressed in mg/g extract

nd – not identified; tr - traces

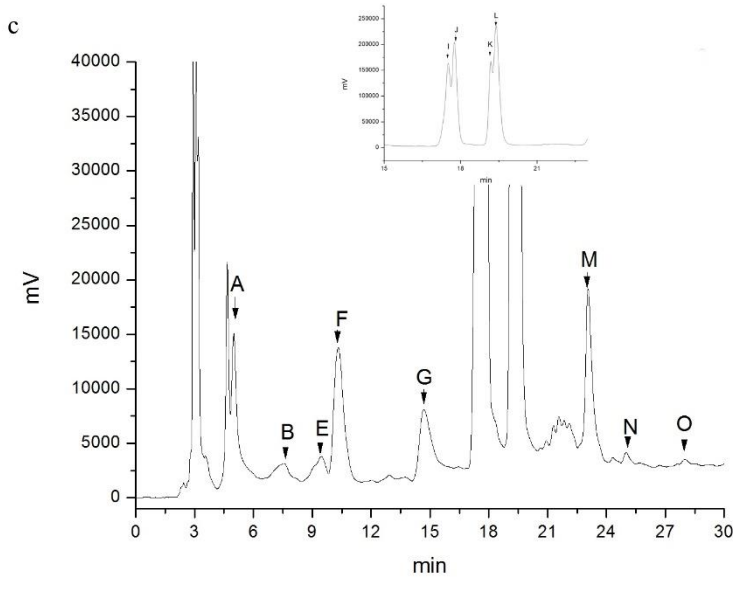
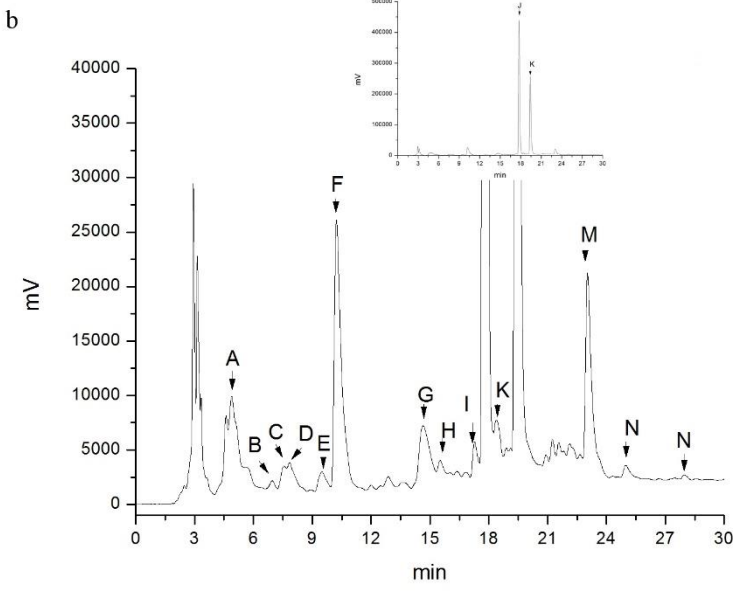
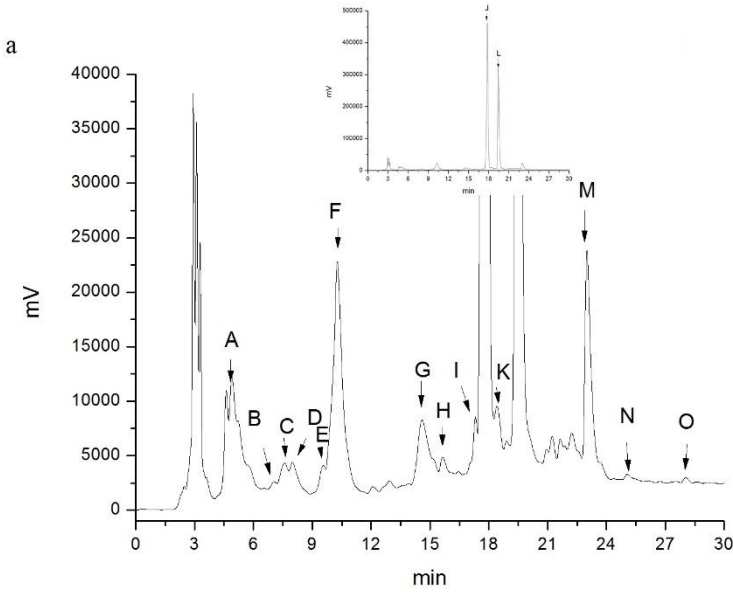


Fig. 2. HPLC chromatogram of the phenolic compounds of the chia seeds extracts obtained in runs (a): 5 (b) 10 (c) 13. Peaks: A, protocatechuic acid; B, catechin; C, gentisic acid; D, hydroxybenzoic acid; E, syringic acid; F, caffeic acid; G, p-coumaric acid; H, ferulic acid; I, rutin; J, sinapic acid; K, salicylic acid; L, myricetin; M, quercetin; N, naringin; O, kaempferol.

Sinapic acid the most important detected and quantified compound in the chia seeds, in concentrations up to 373.2 mg/g in extract 10 (1/3 water - 1/3 ethanol - 1/3 acetone), representing 86,31% of the phenolic acids. Sinapic acid can act as a strong antioxidant with anti-inflammatory and neuroprotective effects (Lee et al., 2012). Furthermore, sinapic acid has been reported to prevent alterations in the levels of lipids and lipoproteins by virtue of its antilipidaemic effect in isoproterenol induced myocardial infarcted rats (Roy & Mainzen Prince, 2013).

Protocatechuic acid was found in all the samples, with the exception of the binary mixtures 4 and 5 (1/3 water - 2/3 ethanol) and (1/3 water - 2/3 acetone). It is noticed that in the binary mixtures 7 and 8 (2/3 water - 1/3 ethanol) and (2/3 water - 1/3 acetone), with a higher concentration of water, show the highest values (25.6 and 29.6 mg/g extract, respectively). Thus, it is possible to verify the influence of water in the extraction of protocatechuic acid.

The importance of water is also noticed in the extractions of the acids hydroxybenzoic and gentisic.

Salicylic acid was shown present in all the extracts, with its highest content in the mixture of run 13 (241.2 mg/g). This phenolic compound has several therapeutic properties on human health, as an analgesic, antipyretic and anti-inflammatory (Grosser, Smyth, & FitzGerald, 2011).

The acids syringic, vanillic, ellagic, *p*-coumaric and trans-cinnamic presented low concentrations or were not even identified in most of the extracts.

Myricetin was the second main compound identified, with concentrations of up to 198.6 mg/g in the extract of run 13 (1/6 water - 1/6 ethanol - 2/3 acetone), representing 88.43% of the flavonoids. Pekkarinen, Heinonen, & Hopia, (1999) showed that compared with other flavonoids (quercetin, kaempferol, Catechin and rutin), myricetin showed the highest antioxidant capacity. Studies prove that myricetin has more phenolic hydroxyl groups, indicating that its antioxidant capacity increases with the number of these hydroxyl groups. Tiwari, Mohan, Kasture, Maxia, & Ballero, (2009) showed that myricetin has an ability of preventing cardiotoxic effects induced by isoproterenol. Knekt et al., (2002) found that men with higher myricetin intakes had a lower prostate cancer risk.

Caffeic acid and quercetin also showed important contribution, with values of 16.0 and 19.4 mg/g for the extracts of run 10 (1/3 water – 1/3 ethanol – 1/3 acetone) and run 5 (1/3 water – 2/3 acetone), respectively. Caffeic acid is known to present antioxidant, anti-inflammatory, antinociceptive and anti-diabetic properties (Chao, Mong, Chan, & Yin, 2010; Pradhananga & Shim, 2015). On the other hand, quercetin, one of main dietary flavonoids has demonstrated antioxidant, anti-inflammatory, antiviral and anticancer effects (Erlund, 2004).

Some phenolic acids were more extracted in the runs in which water was present in higher concentrations. On the other hand, for the flavonoids, acetone was the solvent that was more influent. This can be explained by the fact that acetone interacts with the flavonoids by means of non-covalent interactions of these compounds with the flavonoids, promoting a rapid diffusion of these compounds into the solution (Luque de Castro & Tena, 1996). Another explanation relies on the fact that the absolute value of the association energy and association Helmholtz free energy of the flavonoids monomers are higher in acetone than in water (Codorniu-Hernández, Mesa-Ibirico, Montero-Cabrera, Martinez-Luzardo, & Stohrer, 2005). Besides this, the flavonoid structures are less polar in comparison with the phenolic acid. The moderately polar medium, as the optimum, confirms the results obtained in the spectrophotometric tests of TPC, DPPH and FRAP.

4. Conclusion

Chia seeds contain a considerable amount of phenolic compounds with antioxidant potential, which can be extracted using organic solvents. However, this extraction depends on the interaction between the phenolic compounds present and the type of solvent. Moderately polar solvent mixtures such as acetone-water and ethanol-water were highly efficient to extract the phenolic antioxidant compounds of the studied sample. The phenolic profile of the extracts show that the acids sinapic, caffeic, salicylic, protocatechuic, hydroxibenzoic, gentisic and the flavonoids myricetins, quercetin and kaempferol are the compounds that contribute most to the high antioxidant activity.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Brazilian agencies CAPES, by the Ph. D. scholarship, and to MCT and CNPq.

References

- Andreo, D., & Jorge, N. (2006). Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *Boletim Do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 24(2), 319–336.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2004). Composition of chia (*Salvia hispanica*) grown in six tropical and sub-tropical ecosystems of South America. *Tropical Science*, 44(3), 131–135.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2011). Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Industrial Crops and Products*, 34(2), 1366–1371.
- Beckman, C. H. (2000). Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(3), 101–110.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.Free Radical Method. *LWT - Food Science and Technology*, 30(6), 609–615.
- Boros, B., Jakabová, S., Dörnyei, Á., Horváth, G., Pluhár, Z., Kilar, F., & Felinger, A. (2010). Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*, 1217(51), 7972–7980.
- Capitani, M. I., Spotorno, V., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2012). Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT - Food Science and Technology*, 45(1), 94–102.
- Chao, C., Mong, M., Chan, K., & Yin, M. (2010). Anti-glycative and anti-inflammatory effects of caffeic acid and ellagic acid in kidney of diabetic mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(3), 388–395.
- Chew, K. K., Khoo, M. Z., Ng, S. Y., Thoo, Y. Y., Aida, W. M. W., & Ho, C. W. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal*, 18(4), 1427–1435.
- Coates, W., & Ayerza (h), R. (1996). Production potential of chia in northwestern Argentina. *Industrial Crops and Products*, 5(3), 229–233.

- Codorniu-Hernández, E., Mesa-Ibirico, A., Montero-Cabrera, L., Martinez-Luzardo, F., & Stohrer, W.-D. (2005). MO-calculations on the solvation effects on the structure of natural flavonoids in aqueous and acetone phases. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 715(1-3), 227–239.
- Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24(10), 851–874.
- Fernández-Agulló, a., Pereira, E., Freire, M. S., Valentão, P., Andrade, P. B., González-álvarez, J., & Pereira, J. a. (2013). Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Industrial Crops and Products*, 42(1), 126–132.
- Grosser, T., Smyth, E., & FitzGerald, G. A. (2011). Anti-inflammatory, Antipyretic, and Analgesic Agents; Pharmacotherapy of Gout. In L. L. Brunton, B. A. Chabner, & B. C. Knollmann (Eds.), *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (12th ed., pp. 959–1004). New York: McGraw-Hil.
- Harborne, J. B. (1993). *Introduction to Ecological Biochemistry* (4th ed.). London: Academic Press.
- Hernanz, D., Nuñez, V., Sancho, a. I., Faulds, C. B., Williamson, G., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2001). Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydrodimers in barley and processed barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4884–4888.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., ... Aromaa, A. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(3), 560–568.
- Lee, H. E., Kim, D. H., Park, S. J., Kim, J. M., Lee, Y. W., Jung, J. M., ... Ryu, J. H. (2012). Neuroprotective effect of sinapic acid in a mouse model of amyloid β 1-42 protein-induced Alzheimer's disease. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 103(2), 260–266.
- Liyana-Pathirana, C. M., & Shahidi, F. (2006). Antioxidant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(3), 477–485.
- Luque de Castro, M. D., & Tena, M. T. (1996). Strategies for supercritical fluid extraction of polar and ionic compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 15(1), 32–37.

- Marineli, R. da S., Moraes, É. A., Lenquiste, S. A., Godoy, A. T., Eberlin, M. N., & Maróstica Jr, M. R. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 1304–1310.
- Martínez-Cruz, O., & Paredes-López, O. (2014). Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) by ultra high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1346, 43–48.
- Matthäus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3444–3452.
- Meneses, N. G. T., Martins, S., Teixeira, J. a., & Mussatto, S. I. (2013). Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology*, 108, 152–158.
- Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, 83, 173–179.
- Nicholson, R. L., & Hammerschmidt, R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 30, 369–389.
- Pekkarinen, S. S., Heinonen, I. M., & Hopia, A. I. (1999). Flavonoids quercetin, myricetin, kaemferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(4), 499–506.
- Piepel, G. F., & Cornell, J. A. (1994). Mixture Experiment Approaches: Examples, Discussion, and Recommendations. *Journal of Quality Technology*, 26(3), 177–196.
- Pradhananga, S., & Shim, W. (2015). Caffeic acid exhibits anti-pruritic effects by inhibition of multiple itch transmission pathways in mice. *European Journal of Pharmacology*.
- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., & Valdivia-López, M. A. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107, 656–663.
- Rezaie, M., Farhoosh, R., Iranshahi, M., Sharif, A., & Golmohamadzadeh, S. (2015). Ultrasonic-assisted extraction of antioxidative compounds from Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *mutica*) hull using various solvents of different physicochemical properties. *Food Chemistry*, 173, 577–583.

- Roy, S. J., & Mainzen Prince, P. S. (2013). Protective effects of sinapic acid on cardiac hypertrophy, dyslipidaemia and altered electrocardiogram in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. *European Journal of Pharmacology*, 699(1-3), 213–218.
- Rufino, M. D. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S. De, Morais, S. M. De, Sampaio, C. D. G., Pérez-jiménez, J., & Saura-Colixto, F. D. (2006). Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). *Comunicado Técnico Embrapa*, 125, 1–4.
- Rufino, M. D. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S. De, Morais, S. M. De, Sampaio, C. D. G., Pérez-jiménez, J., & Saura-Colixto, F. D. (2007). Metodologia Científica : Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. *Comunicado Técnico Embrapa*, 127, 1–4.
- Shafique, M., Hussain, S., Asif, S., Pradhan, V., & Farooqui, M. (2013). Thermodynamic Characteristics of Solvents : A Review, 3(11), 98–104.
- Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49–55.
- Terpinc, P., Polak, T., Makuc, D., Ulrih, N. P., & Abramovič, H. (2012). The occurrence and characterisation of phenolic compounds in *Camelina sativa* seed, cake and oil. *Food Chemistry*, 131(2), 580–589.
- Tiwari, R., Mohan, M., Kasture, S., Maxia, A., & Ballero, M. (2009). Cardioprotective Potential of Myricetin in Isoproterenol-induced Myocardial Infarction in Wistar Rats. *Phytotherapy Research*, 23, 1361–1366.
- Zieliński, H., & Kozłowska, H. (2000). Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2008–2016.

Influência do método de homogeneização da emulsão na estabilidade de óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) microencapsulado por *spray drying*

Maristela Alves Alcântara^a, Ismael Martins Monteiro da Silva^b, Ana Luiza Mattos Braga^{c,d}, Renata Valeriano Tonon^e, Raul Rosenhaim^f, Nataly Albuquerque dos Santos^{c,d}; Antonio Gouveia de Souza^a; Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro^{a,c,d}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, CT, Campus I, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58051-900 João Pessoa, Paraíba, Brasil.

^b Graduação em Tecnologia de Alimentos, CTDR, Campus I, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58055-000 João Pessoa, Paraíba, Brasil.

^c Departamento de Tecnologia de Alimentos, CTDR, Campus I, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58055-000 João Pessoa, Paraíba, Brasil.

^d Instituto UFPB de Desenvolvimento do Estado da Paraíba, IDEP, Campus I, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58051-900 João Pessoa, Paraíba, Brasil.

^e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Agroindústria de Alimentos, EMBRAPA, CEP 23020-470 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

^f Departamento de Engenharia Química, CT, Campus I, Universidade Federal da Paraíba, CEP 58051-900 João Pessoa, Paraíba, Brasil.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do método de homogeneização, ultrassom ou rotor-estator, nas propriedades de emulsões o/a formadas com óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) e na estabilidade deste óleo em pó. A microencapsulação foi realizada por *spray drying*, utilizando como material de parede uma mistura de maltodextrina 10DE, maltodextrina 20DE, isolado proteico de soro de leite e goma arábica (40/40/15/5). O teor de sólidos totais das emulsões foi de 30% (p/p), e a concentração de óleo em relação aos sólidos foi de 30% (p/p), aproximando-se do conteúdo de óleo utilizado comercialmente. As emulsões foram avaliadas quanto ao tamanho de gotas e estabilidade. A caracterização das micropartículas foi realizada pela umidade, tamanho de partículas, óleo superficial, óleo encapsulado, eficiência de

encapsulação, morfologia, oxidação lipídica e estabilidade oxidativa. O uso do ultrassom promoveu uma redução significativa do tamanho das gotas (4,62 até 0,48 μm) e um aumento considerável na eficiência de encapsulação (42 até 96%). A estabilidade oxidativa também foi melhorada com o uso do ultrassom, em especial nos processos em que não foi associado ao rotor-estator. O período de indução do óleo *in natura* (0,6 h) foi otimizado para 8,2 h quando encapsulado pelo processo de ultrassom por 3 min. Concluindo, foi possível obter uma micropartícula de óleo de chia com concentração de óleo de interesse industrial (30% p/p) com alta eficiência de encapsulação e boa estabilidade oxidativa utilizando-se a tecnologia verde do ultrassom para a etapa de homogeneização do óleo.

Palavras-chave: microencapsulação; óleo de chia; ultrassom; spray drying

1. Introdução

Chia (*Salvia hispanica* L.) é uma planta herbácea anual que pertence à família Lamiaceae. Esta planta é nativa do sul do México e norte da Guatemala (Coates & Ayerza, 1996), e atualmente é cultivada também na América do Sul (Ayerza & Coates, 2011). A semente de chia tem sido descrita como uma boa fonte de óleo, proteínas, fibras e minerais (Ayerza & Coates, 2004; Capitani, Spotorno, Nolasco, & Tomás, 2012; Marineli et al., 2014), mas o maior interesse no seu uso é devido ao seu alto teor de óleo que fornece uma rica fonte de ácidos graxos poliinsaturados. O óleo de chia contém a maior proporção de ácido α -linolênico do que qualquer fonte natural conhecida (Ayerza, 1995; Coates & Ayerza, 1996). O óleo da semente de chia é composto predominantemente por ácidos graxos insaturados, sendo o α -linolênico (ω -3) o seu principal componente correspondendo a aproximadamente 60%, seguido do linoleico (20,3%), oleico (7,6%), palmítico (6,6%) e esteárico (3,3%) (Álvarez-Chávez, Valdivia-López, Aburto-Juárez, & Tecante, 2008). Os ácidos graxos poliinsaturados como o ômega-3 (ω -3) são importantes para uma boa saúde e promovem benefícios para os indivíduos que sofrem de doenças cardiovasculares, diabetes e distúrbios de resposta imune (Djordjevic, McClements, & Decker, 2004; McClements, Decker, & Weiss, 2007). No entanto, mesmo que o perfil de ácidos graxos do óleo de semente de chia seja nutricionalmente favorável, o elevado grau de insaturação torna-o muito suscetível à oxidação. A oxidação conduz à formação de sabores e odores desagradáveis reduzindo a vida de prateleira do produto, além de promover a geração de radicais livres, que podem ter efeitos fisiológicos negativos

sobre o organismo (Ahn et al., 2008). Assim, há uma necessidade do emprego de tecnologias alternativas para retardar este processo e manter a sua estabilidade e propriedades nutricionais.

Nesse contexto, a microencapsulação por *spray drying* surge como uma importante tecnologia para resguardar a matriz oleaginosa dos processos oxidativos. O processo converte o óleo em um pó de fluxo livre que pode ser facilmente manuseado e utilizado para nutracêuticos e/ou a fortificação de alimentos (Gallardo et al., 2013). A aplicação do processo de secagem por *spray drying* em microencapsulação envolve três passos básicos: preparo da mistura do material de parede, formação de uma emulsão estável por meio de homogeneização e atomização da emulsão na câmara de secagem.

O preparo da emulsão inicia-se com a seleção do material de parede, este é baseado principalmente em sua funcionalidade interfacial (Zhang et al., 2015) e irá influenciar tanto na estabilidade da emulsão antes da secagem, quanto na capacidade de proteção do produto em pó. Ubbink, Kasapis, & Norton (2009), demonstraram que uma pequena quantidade de alguns compostos de baixo peso molecular melhora a estabilidade de compostos bioativos encapsulados. Uma série de biopolímeros tem sido utilizada na microencapsulação de vários ingredientes alimentícios por *spray drying*. A maltodextrina é um dos principais materiais de aplicação no processo de secagem por atomização, devido às suas características físicas, tais como solubilidade elevada e baixa viscosidade, mesmo quando se encontram em elevadas concentrações de sólidos (Helena C.F. Carneiro, Tonon, Grosso, & Hubinger, 2013). As proteínas do soro do leite apresentam boa capacidade de emulsificação, auxiliando na encapsulação do ingrediente (Dickinson, 2009). Além disso, as proteínas são excelentes na proteção contra a oxidação, sendo menos permeáveis ao oxigênio (Charve & Reineccius, 2009). Gallardo et al. (2013) demonstraram que a mistura ternária de maltodextrina (DE10) com goma arábica e proteína do soro apresentou boa proteção oxidativa para óleo de linhaça, quando avaliado pelo teste acelerado de rancimat.

A formação da emulsão consiste numa das etapas mais importantes para a microencapsulação, pois influencia diretamente nas propriedades das microcápsulas. Diferentes métodos são empregados para a formação das emulsões, dentre eles destacam-se: a alta pressão, os ultrassons, o rotor-estator, e sistemas de membrana (Schultz, Wagner, Urban, & Ulrich, 2004). A homogeneização de óleos por equipamentos do tipo rotor-estator é eficiente, porém proporcionam gotas maiores, além de alta incorporação de oxigênio na fase contínua da emulsão, o que é prejudicial ao óleo. Já a utilização de ultrassom conduz à formação de emulsões com tamanhos de gotículas pequenas (Jafari, Assadpoor, He, & Bhandari, 2008). O tamanho da gota é um fator muito importante para a estabilidade física das emulsões, uma vez

que gotas menores costumam fornecer emulsões mais estáveis. Homogeneização por ultrassom é uma tecnologia emergente usada para produzir emulsões estáveis com baixa adição de energia (Sivakumar, Tang, & Tan, 2014). Recentemente, esta tecnologia vem sendo utilizada também para estabilizar emulsões como parte de processos de encapsulação de óleos (Le & Le, 2014; Silva, Azevedo, Cunha, Hubinger, & Meireles, 2016; Silva, Zabet, & A. Meireles, 2015). No entanto, de acordo com o melhor de nosso conhecimento, ainda não foi avaliado o impacto do processo de ultrassom sobre a oxidação de óleos encapsulados. Além disto, é importante verificar a viabilidade desta técnica em produzir emulsões estáveis com concentração de óleo na faixa de interesse industrial, como exemplo 30 - 40% da matéria seca, pois a maioria dos estudos foram realizados com concentração de óleo de até 20% da matéria seca (Silva et al., 2016, 2015).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do método de homogeneização, ultrassom ou rotor-estator, nas propriedades de emulsões formadas com óleo de chia (*Salvia hispanica* L.) e na estabilidade do óleo em pó microencapsulado por *spray drying*. Para tal, foi estudada uma formulação com maltodextrina, proteínas do soro e goma arábica, em concentração de óleo de chia mais elevada (30% do material seco), aliando matérias-primas convencionais a indústria com uma concentração de óleo economicamente mais atrativa.

2. Material e métodos

2.1. Material

As sementes de chia (*Salvia hispanica* L.) produzidas em Entre-Ijuís-RS, localizada na região sul do Brasil, foram adquiridas da Giroil Agroindústria Ltda. As sementes foram colhidas secas, passando apenas por processo de limpeza com posterior embalagem a vácuo. Uma prensa hidráulica Ribeiro (modelo P30T, São Paulo, Brasil) apresentando características de 160 cm de comprimento e êmbolo de 15 cm de diâmetro com uma aplicação máxima de pressão de $1,3 \times 10^7 \text{ N.m}^{-2}$ foi usada para prensagem a frio ($\sim 20^\circ\text{C}$) das sementes para a obtenção do óleo de chia (CHO). Este óleo foi filtrado à vacuo e armazenado em frascos âmbar sem headspace a 4°C .

O isolado proteico de soro - WPI (BiPRO whey protein isolate) foi obtido da Davisco Foods International (EUA). As maltodextrinas (MD) Maltogill 10DE e 20DE foram cedidas pela Cargill (São Paulo, Brasil) e a Goma Arábica (GA) foi adquirida da Food Pymes (São Paulo, Brasil).

2.2. Preparo das emulsões

As emulsões foram preparadas com 30% (p/v) de sólidos totais e contendo óleo de chia na proporção de 30% w/w em relação aos sólidos totais. Como material de parede, utilizou-se uma mistura contendo WPI, GA e MD (DE10 e DE20), que a proporção foi definida através de ensaios preliminares de estabilidade da emulsão. As emulsões foram obtidas utilizando-se dois tipos de homogeneizadores: rotor-estator ultraturrax (IKA T18, Wilmington, USA) e/ou ultrassom (Hielscher UIP 1000hd, Alemanha), em tempos variando de 1 a 3 minutos, conforme Tabela 1.

As condições operacionais do aparelho ultrassônico foram: probe ultrassônico com 18 mm de diâmetro, 20 kHz de frequência e potência de 260 W, com temperatura controlada por um banho termostático a 10 °C. A altura do probe do ultrassom em contato com as emulsões foi padronizada em 40 mm. O Ultraturrax foi operado a uma rotação de 15000 rpm. Todas as amostras foram produzidas em um volume de 200 mL.

Tabela 1 - Descrição dos processos e tempos de emulsificação

Amostras	Ultraturrax	Ultrassom
T1	1 min	-
T2	2 min	-
T3	3 min	-
U1	-	1 min
U2	-	2 min
U3	-	3 min
TU1	2 min	1 min
TU2	1 min	2 min

2.3. Caracterização das emulsões

2.3.1. Tamanho das gotas das emulsões

A distribuição de tamanho e diâmetro médio de gota das emulsões foram determinados usando o equipamento de difração a laser MICROTRAC S3500 (Microtrac Inc., Montgomery Ville, USA). A análise foi conduzida imediatamente após a preparação das emulsões, em duplicata e em três ciclos, utilizando água destilada como dispersante (índice de refração de 1,33). O diâmetro médio foi calculado com base no diâmetro médio de uma esfera de mesma área (diâmetro de Sauter) (D_{32}) e o índice de polidispersidade (PDI) baseado na distribuição de partes de volume, de acordo com as Equações 1 e 2 (Silva et al., 2016):

$$D_{32} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (1)$$

$$PDI = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad (2)$$

onde d_i é o diâmetro médio das gotas; n_i é o número de gotas; e D_{10} , D_{50} e D_{90} que são diâmetros de volume equivalentes a 10%, 50% e 90% do volume cumulativo, respectivamente.

2.3.2. Estabilidade das emulsões

Imediatamente após o processo de emulsificação, alíquotas de 10 mL de cada uma das emulsões foram transferidas para provetas idênticas com capacidade de 25 mL, seladas e armazenadas a 25 °C. A separação da fase oleosa foi monitorada a cada 15 min durante 2 h e 24 h após o preparo das emulsões. A estabilidade (não separação de fases) foi expressa qualitativamente em sim ou não e quantitativamente através do índice de cremação após 1,5h, sendo o índice de cremação descrito pela Equação 3.

$$\% IC = \left(\frac{H}{H_0} \right) \times 100 \quad (3)$$

onde: H_0 representa a altura inicial da emulsão e H representa a altura da fase superior após 1,5h.

2.4. Microencapsulação por spray drying

As emulsões foram secas em um atomizador Lab Plant SD-06 (Huddersfield, Inglaterra), com bico de atomização de 0,5 mm de diâmetro, sob uma pressão de pulverização de 2,5 bar. A temperatura do ar de entrada foi ajustada para 160 ± 2 °C e a de saída foi mantida a 60 ± 5 °C a uma taxa de alimentação média de 7 mL/min.

2.5. Caracterização das partículas

2.5.1. Teor de umidade

O teor de umidade das amostras foi determinado gravimetricamente em estufa a vácuo durante 24h a 70 °C (AOAC Association of Official Analytical Chemists, 2006).

2.5.2. Óleo superficial

O óleo superficial das microcápsulas (Equação 4) foi determinado de acordo com (Bae & Lee, 2008). Em tubos Falcon, contendo 2 g de pó, foram adicionados 15 mL de hexano. A mistura foi homogeneizada em agitador tipo vortex por 2 minutos, e em seguida, centrifugada por 15 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi recolhido e o pó restante foi lavado três vezes com 20 mL de hexano. O solvente foi evaporado a 60 °C em estufa de ar circulante e o conteúdo lipídico determinado gravimetricamente.

$$\text{Óleo Superficial (\%)} = 100 \times \frac{\text{g óleo da superfície}}{100\text{g pó}} \quad (4)$$

2.5.3. Óleo encapsulado

O conteúdo de óleo encapsulado (Equação 5) foi quantificado segundo Hardas, Danviriyakul, Foley, Nawar, & Chinachoti (2002). Amostras de 2 g de pó foram pesadas em tubos Falcon e adicionados 10 mL de hexano, homogeneizadas em agitador tipo vortex e centrifugadas a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao resíduo foram adicionados 5 mL de água destilada, o que foi seguido de nova agitação em vortex por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 25 mL de uma solução hexano/isopropanol (3:1 v/v), e agitado em vortex por mais 2 minutos, seguido de centrifugação por 15 minutos a 5000 rpm. A fase orgânica foi cuidadosamente separada com auxílio de pipeta pasteur e transferida para um erlenmeyer previamente tarado. O processo de extração com a solução hexano/isopropanol foi repetido por mais duas vezes e a fase orgânica coletada no mesmo erlenmeyer. A fase orgânica coletada foi evaporada a 60 °C em estufa de ar circulante e o conteúdo lipídico determinado gravimetricamente.

$$\text{Óleo Encapsulado (\%)} = 100 \times \frac{\text{g óleo interno}}{100\text{g pó}} \quad (5)$$

2.5.4. Eficiência de microencapsulação

A eficiência de microencapsulação foi determinada pela fração de óleo encapsulado sobre a quantidade total de óleo (Equação 6).

$$\text{Eficiência de Encapsulação (\%)} = 100 \times \frac{\text{óleo encapsulado}}{\text{óleo total}} \quad (6)$$

onde óleo_{Total} é o somatório do óleo encapsulado e óleo superficial (Eq. 4 e 5).

2.5.5. Distribuição do tamanho de partículas

A distribuição de tamanho e diâmetro médio de partícula foi determinado por dispersão da luz usando difração a laser MICROTRAC S3500 (Microtrac Inc., Montgomery Ville, USA). As amostras foram dispersas em 2-propanol (índice de refração 1.38) e o diâmetro médio foi determinado com base no diâmetro médio de uma esfera do mesmo volume (diâmetro Brouckere) (D_{43}), como descrito na Equação 7.

$$D_{43} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (7)$$

onde d_i é o diâmetro médio de particular e n_i é o número de partículas

2.5.6. Valor de peróxido

O valor de peróxido foi determinado de acordo com o método proposto pela International Dairy Federation IDF, com algumas modificações (Semb, 2012; Shantha & Decker, 1994) e a extração do óleo foi realizada segundo Partanen et al. (2008). Uma amostra de 0,5 g de pó foi pesada em um tubo de ensaio e suspenso em 5 mL de água. O tubo foi agitado durante 30 minutos para garantir a dissolução do pó. Uma porção de 400 μ L foi retirada e agitada com 1,5 mL de uma mistura iso-octano/ isopropanol (2:1) para extração do óleo. Em seguida, as fases foram separadas por centrifugação (5000 rpm por 5 minutos) e a fase superior foi recolhida para a análise. As extrações foram realizadas em triplicata. Uma alíquota de 300 μ L do meio de extração foram adicionados a 9,6 mL de uma mistura de clorofórmio/metanol (7:3). Para a formação de cor, foram adicionados 50 μ L de uma solução de Fe^{2+} ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 40 mg dissolvidos em 10 mL 3.7% HCl) e 50 μ L de tiocianato de amônia 30% (7,5 g dissolvidos em 25 mL de água destilada). A amostra foi agitada, mantida em repouso, no escuro, por 5 minutos e então medida a absorbância a 500 nm. O valor de peróxido foi determinado usando uma curva padrão de Fe^{3+} (1-25 μ g).

2.5.7. Estabilidade oxidativa pelo teste acelerado Rancimat

O teste acelerado Rancimat foi usado para estimar a estabilidade do óleo de chia para a oxidação antes e após a microencapsulação. O equipamento Rancimat foi utilizado com um modo de avaliação expresso pelo período de indução (IP), definido como o intervalo de tempo correspondente ao ponto de inflexão da curva de condutividade versus tempo. As análises foram realizadas a 110 °C e 10 L de ar/h utilizando um aparelho de Rancimat 873 (Metrohm, Herisau,

Suíça). 2 g de amostra foram pesados em cada tubo de reação. O óleo fresco foi usado como controle. As análises foram realizadas em duplicata.

2.5.8. Perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa

O perfil de ácidos graxos e o monitoramento do Ácido Linolênico (ALA) do óleo fresco e microencapsulado foi determinado por cromatografia em fase gasosa. Neste caso, o óleo resultante extraído da determinação total de óleo (seção 2.5.4) foi usado para a análise de CG após derivatização de ácidos graxos para se obter os ésteres metílicos correspondentes. Perfis cromatográficos foram registrados e o percentual de ALA foi determinado por curva de calibração com padrões de ésteres metílicos utilizando um GCMS-QP2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipado com uma coluna Durabound DB-23 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m. A temperatura do injetor e do detector foram fixados em 230 °C e temperatura da coluna em 90 °C. O gradiente de eluição na coluna foi de 90 a 150 °C (10 °C/min), 150 a 200 °C (5 °C/min), 200 a 230 °C (3 °C/min) em um tempo total de corrida de 34 minutos. O gás transportador foi Hélio.

2.5.9. Morfologia das microcápsulas

A microestrutura das partículas foi observada em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (HITACHI, modelo TM 3000, Japão) acoplado a um EDS (Energy Dispersive Spectrometer for X-ray analysis, Brucker, Madison, USA) para a determinação de microelementos. As amostras analisadas foram colocadas em suportes metálicos (stubs) por adesão em fita dupla face metalizada, sendo então observadas no MEV para a aquisição das imagens.

2.6 Análise estatística

A análise dos dados foram realizadas pela aplicação da análise de variância (ANOVA) e teste Tukey visando identificar diferenças significativas entre as médias, utilizou-se o software Action 2.9 (ACTION, 2016) gratuito. O nível de significância considerado para a diferença entre as médias foi de 5% ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

3. Resultados e discussão

3.1. Formulação e estabilidade das emulsões preliminares

Emulsões preliminares foram preparadas em rotor-estator na condição fixa de 15000 por 5 min utilizando óleo na proporção de 30% dos sólidos totais. Gallardo et al. (2013) demonstrou que a mistura de parede com maltodextrina, proteínas do soro e goma arábica (64%MD:17%WPI:17%GA) proporcionou boa estabilidade oxidativa ao óleo de linhaça. No presente estudo, estes três biopolímeros também serão avaliados como material de parede para encapsulação de óleo de chia. No entanto, serão conferidas duas principais modificações: 1) um maior conteúdo de óleo, a fim de tornar a micropartícula economicamente mais viável; 2) uma mistura de maltodextrina DE10 e DE20, a fim de obter uma matriz com maior conteúdo de maltooligómeros. Ubbink (2010) relata que no estado vítreo, em concentração de água diferente de zero, o volume intermolecular de uma matriz de carboidratos reduz rapidamente com a adição de 30% de carboidratos de baixo peso molecular.

A definição da formulação foi pautada no critério de ser uma emulsão com alto conteúdo de óleo e estável por ao menos 1,5 h (tempo do processo de secagem). Assim, variou-se a concentração de WPI de 10-20% do material de parede para ampliar a faixa estudada por Gallardo et al. (2013). Fixou-se o conteúdo de GA em 5% do material de parede e a proporção dos tipos de maltodextrina (50% DE10: 50% DE20), para obter-se a maior concentração possível de maltooligómeros. Assim, a concentração total de MD variou de acordo com o conteúdo de WPI. A Tabela 2 apresentam as formulações testadas inicialmente e as respectivas estabilidades das emulsões após 1,5 h do preparo.

Tabela 2 - Resultado do estudo da estabilidade das emulsões 1,5 h após o preparo.

Formulação	MD / WPI / GA	Separação de fases (%)
1	75 / 20 / 5	6,8
2	80 / 15 / 5	0
3	85 / 10 / 5	4,2

Os resultados expressos na Tabela 2 mostram que apenas a emulsão na proporção de 80/15/5 de MD/WPI/GA manteve-se estável no período avaliado. Frascareli, Silva, Tonon, & Hubinger (2012) relata em seu estudo que emulsões contendo maior quantidade de emulsificante recobrindo a gota reduzem (impede) a coalescência. Na formulação 3 há uma diminuição na proporção de proteína e aumento na maltodextrina caso que pode explicar a

ocorrência de separação de fase é que, conforme menciona Carneiro (2011), as maltodextrinas possuem baixa capacidade emulsificante, assim diminuindo a estabilidade da emulsão. Já na formulação 1 ocorre o inverso, ocorrendo também separação de fase, o mesmo autor afirma ainda que quanto maior a quantidade de proteína na formulação maior a porcentagem de separação de fases. A formulação que apresentou-se estável continha 80% MD / 15% WPI / 5% GA, sendo a maltodextrina dividida em 40% DE10 e 40% DE20. Esta formulação foi escolhida para conduzir os ensaios com ultrassom e secagem por atomização.

3.1. Influência do processo e tempo de homogeneização sobre as características da emulsão

A influência do processo e do tempo de homogeneização sobre as propriedades das emulsões está apresentada na Tabela 3. O diâmetro médio das gotas variou de 3,45 a 4,62 μm quando foi usado o rotor-estator como método de preparação, de 0,48 a 1,34 μm quando usado apenas o ultrassom e de 0,52 a 0,86 μm quando combinados os dois métodos. A redução pronunciada do tamanho das gotas com o uso do ultrassom pode ser explicada pela alta energia fornecida a emulsão com elevadas ondas de choque produzidas pelo equipamento, promovendo um maior cisalhamento das gotas dispersas, reduzindo assim seu tamanho (Hielscher, 2005).

Tabela 3 - Estabilidade e tamanho de gotas das emulsões

Amostras	Processo	Tempo (min.)	D ₃₂ (μm)	PDI	Estabilidade após 24 h
T1	Rotor-estator	1	4,62 $\pm$ 0,04 ^a	1,69 $\pm$ 0,04 ^g	Não
T2		2	3,69 $\pm$ 0,01 ^b	1,82 $\pm$ 0,06 ^e	Não
T3		3	3,45 $\pm$ 0,06 ^c	2,08 $\pm$ 0,04 ^d	Não
U1	Ultrassom	1	1,34 $\pm$ 0,03 ^d	9,44 $\pm$ 0,09 ^a	Não
U2		2	0,62 $\pm$ 0,01 ^f	1,74 $\pm$ 0,03 ^f	Sim
U3		3	0,48 $\pm$ 0,00 ^g	2,27 $\pm$ 0,10 ^b	Sim
TU1	Rotor-estator	2 + 1	0,86 $\pm$ 0,01 ^e	1,83 $\pm$ 0,11 ^e	Sim
TU2	+ Ultrassom	1 + 2	0,52 $\pm$ 0,00 ^{fg}	2,14 $\pm$ 0,04 ^c	Sim

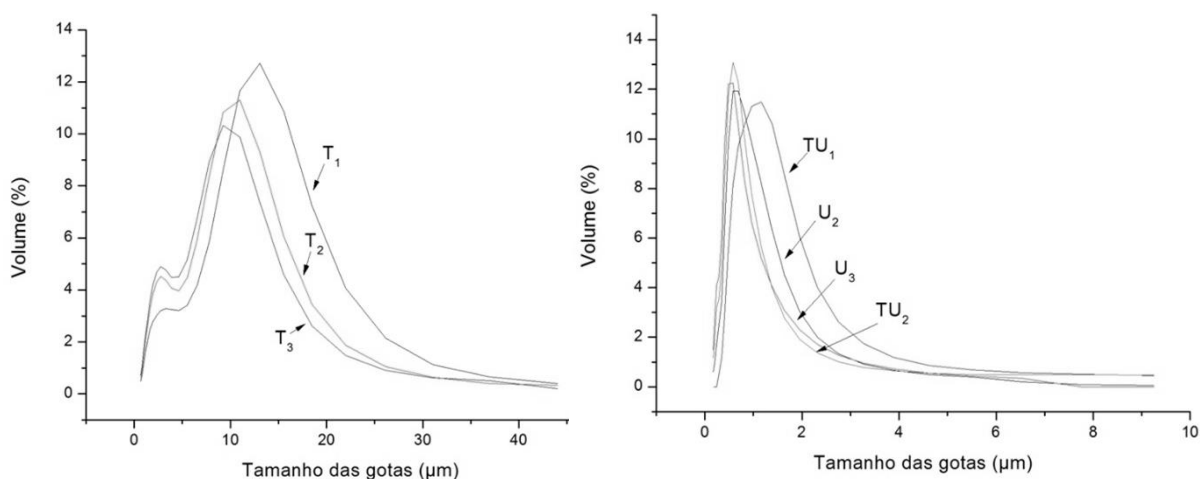
Resultados estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão.

Amostras com letras diferentes possuem valores significativamente diferentes de outras amostras em uma mesma coluna ($p < 0,05$).

Silva et al. (2016) estudaram o efeito da homogeneização por ultrassom nas propriedades de micropartículas de óleo de urucum. Quando 16% WPI foi usado como material de parede, os diâmetros médios das gotas da emulsão foram menores que 1 μm em situação de potência nominal acima de 300 W e 3 min de processo. Por outro lado, Silva et al. (2015)

obtiveram diâmetro médio de gota menor do que 1 micrón, quando utilizaram como material de parede GA, apenas em condições extremas como 640 W e 3 min. Como no presente estudo obtivemos gotas tão pequenas quanto 0,5 micrón com potência de 260 W e 3 min, sugere-se que a combinação de material de parede MD/GA/WPI facilitou a quebra da gota.

A Figura 1 mostra as curvas da distribuição do tamanho de gotas da emulsão. Para os processos T_1 , T_2 e T_3 , as curvas apresentaram distribuição bimodal, com dois picos distintos em torno de 4 e 15 μm . Os processos U_2 , U_3 , TU_1 e TU_2 apresentaram distribuição unimodal, com um discreto desvio das curvas, sendo observado um pico predominante em torno de 0,6 μm para os três primeiros e em torno de 1 μm para o último. O processo U_1 , apresentou um comportamento excepcional aos demais processos, com uma distribuição bimodal, com um pico predominante em 1 μm e outro em 50 μm . Isto pode ser explicado pela quantidade de óleo superficial presente nesta amostra após homogeneização, onde o desvio nas curvas pode ser devido a presença do óleo não emulsionado. Todas as amostras exceto U_1 apresentaram uma dispersibilidade (PDI) semelhante. Após 1 h de preparação todas as emulsões se mostraram estáveis, mas após 24 h apenas as amostras produzidas com o ultrassom é que se apresentaram estáveis. As emulsões deveriam se manter estáveis durante o processo de microencapsulação por *spray drying* em um tempo de duração de aproximadamente 50 minutos.



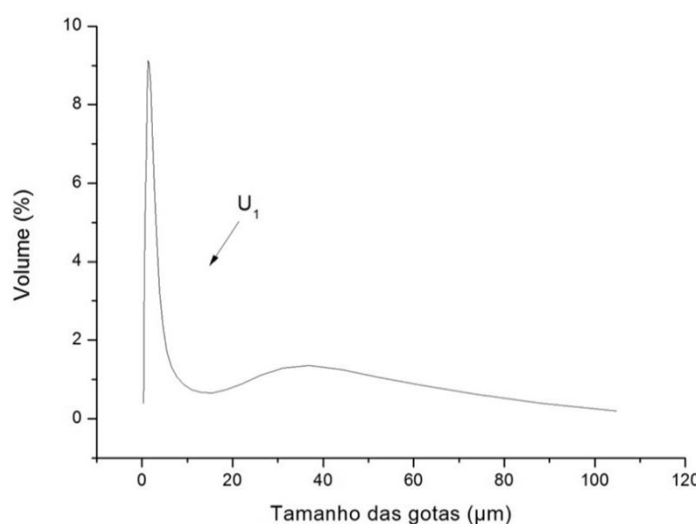


Figura 1. Distribuição do tamanho das gotas das emulsões obtidas por diferentes tempos e processos de homogeneização

3.2. Caracterização das microcápsulas

As micropartículas produzidas pelo processo de *spray drying* foram caracterizadas pelo teor de umidade, óleo superficial, eficiência de encapsulação, diâmetro médio das partículas (D_{43}) e porcentagem de óleo encapsulado (Tabela 4).

Tabela 4 - Tamanho das partículas, teor de umidade, óleo superficial e eficiência de encapsulação de diferentes microcápsulas de óleo de chia

Amostras	Óleo encapsulado (g/100g pó)	Óleo superficial (g/100g pó)	Eficiência de encapsulação (%)	Tamanho da micropartícula (D_{43} μm)
T1	12,59 ± 0,03 ^g	17,40 ± 0,10 ^a	41,97 ± 0,38 ^g	13,94 ± 0,22 ^c
T2	14,34 ± 0,01 ^f	15,64 ± 0,15 ^b	57,82 ± 0,85 ^f	12,28 ± 0,10 ^f
T3	25,52 ± 0,08 ^d	14,45 ± 0,20 ^c	63,85 ± 0,31 ^e	12,33 ± 0,23 ^e
U1	21,96 ± 0,07 ^e	8,03 ± 0,17 ^d	73,21 ± 0,50 ^d	16,27 ± 0,71 ^b
U2	28,34 ± 0,03 ^{ab}	1,62 ± 0,22 ^{fg}	94,59 ± 0,58 ^{ab}	13,76 ± 0,47 ^d
U3	28,76 ± 0,06 ^a	1,22 ± 0,27 ^g	95,93 ± 0,11 ^a	11,87 ± 1,03 ^g
TU1	26,91 ± 0,03 ^c	3,06 ± 0,12 ^e	89,80 ± 0,51 ^c	16,40 ± 0,71 ^a
TU2	27,92 ± 0,06 ^b	2,04 ± 0,16 ^f	93,19 ± 0,54 ^b	16,39 ± 0,71 ^a

Amostras com letras diferentes possuem valores significativamente diferentes de outras amostras em uma mesma coluna ($p < 0,05$).

O teor de umidade dos pós apresentou pouca variação (0,74 e 2,00 %), uma vez que foram utilizadas as mesmas condições de secagem e formulação de material de parede para todas as amostras. Nenhum efeito do processo de homogeneização foi observado sobre esta propriedade. Resultados semelhantes foram observados por Silva et al., (2014) que produziram emulsões com óleo de café verde e diferentes combinações de materiais de parede, utilizando pressão de homogeneização de 50 MPa e não observaram qualquer influência da pressão de homogeneização sobre o teor de umidade das micropartículas. Os valores de umidade do presente trabalho não ultrapassaram 2% p/p estando de acordo com valores de micropartículas a base de amido (Silva et al., 2016).

A eficiência de encapsulação variou de 41,97 a 95,93%, conforme mostrado na Tabela 4. Pode-se observar que houve um aumento da eficiência e uma diminuição do tamanho de gotas da emulsão quando o processo de ultrassom foi utilizado. Alguns estudos (Jafari et al., 2008; Soottitantawat et al., 2005; Zhang et al., 2015) vêm demonstrando que o tamanho das gotas de óleo está associada com a eficiência de microencapsulação. O aumento no tamanho de gotículas de óleo na emulsão pode resultar em uma maior quantidade de óleo superficial e uma menor eficiência, e isto poderia provocar uma maior aceleração da oxidação do óleo nas microcápsulas. Isto pode ser observado neste estudo pela forte correlação (-0,97) apresentada na Figura 2.

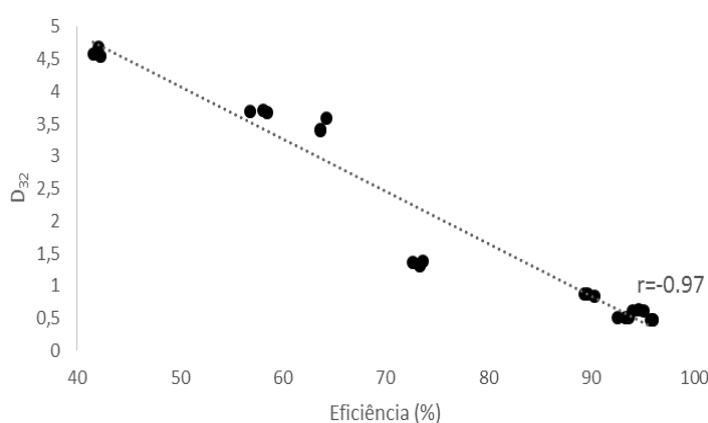


Figura 2. Correlação entre a eficiência de encapsulação e o tamanho de gotas da emulsão (D₃₂)

As amostras emulsionadas no rotor-estator apresentaram baixa eficiência, isto pode ser devido ao elevado teor de óleo utilizado (30% w/w em relação aos sólidos totais). Frascareli, Silva, Tonon, & Hubinger (2012) utilizando um rotor-estator na microencapsulação de óleo de

café, verificaram que quanto mais elevada a concentração de óleo, mais baixa foi a eficiência de encapsulação, o que pode ser atribuído a uma baixa quantidade de material de parede disponível para fornecer uma matriz estrutural que mantenha as gotículas de óleo encapsuladas. Os autores observaram que teores de óleo abaixo de 20% p/p em relação aos sólidos totais, foram os mais indicados para produção de micropartículas com elevada eficiência. No entanto, industrialmente, as micropartículas (por *spray-drying*) de óleo nutricional são produzidas com teores de 30-40% de óleo em relação aos sólidos totais para melhor rendimento e viabilidade econômica. Cabe ressaltar que o presente estudo foi realizado com 30% de óleo e apresentou resultados de porcentagem de eficiência de encapsulação equivalentes a trabalhos da literatura realizados com apenas 20% de óleo.

O óleo superficial e a eficiência de encapsulação não foram afetados pelo tamanho das partículas D_{43} . Estes resultados estão de acordo com os relatados por Soottitantawat et al. (2005) e Rodea-González et al. (2012), mas estão em contraste com aqueles alcançados por Jafari et al. (2008) que relataram que a eficiência de encapsulação poderia ser melhorada fazendo com que as partículas de pó apresentem distribuição de tamanho ótimo $<38\ \mu\text{m}$ para não-voláteis (óleo de peixe) e entre 38 e $63\ \mu\text{m}$ para produtos voláteis (d-limoneno).

O diâmetro médio da partícula (D_{43}) apresentou a mesma ordem de grandeza para todas as amostras. O tamanho de partícula das microcápsulas é influenciada pelo bico atomizador, pela taxa de distribuição de líquido, pelas condições de atomização, a pressão de ar e teor de sólidos totais (McNamee, O’Riordan, & O’Sullivan, 1998). Neste estudo, todas as emulsões foram secas sob condições operacionais idênticas, de modo que não foram observadas grandes variações no tamanho das micropartículas.

3.3. Estabilidade oxidativa

O teste acelerado de oxidação Rancimat tem sido amplamente utilizado devido à sua facilidade de uso e reprodutibilidade, tanto em óleos microencapsulados (Gallardo et al., 2013; Velasco, Dobarganes, Holgado, & Márquez-Ruiz, 2009) quanto em óleos não encapsulados (García-Moreno, Pérez-Gálvez, Guadix, & Guadix, 2013). A Figura 3 mostra as curvas de IP obtidas para as amostras de óleo microencapsulado em comparação com o óleo de chia fresco (controle). O óleo de chia fresco apresentou um IP de 0,6 h. Esse tempo curto era esperado devido à presença do teor elevado do ácido linolênico (65%), que é um ácido graxo ω -3. Resultado superior de 1,14 h foi relatado por Martínez et al. (2012), sob as mesmas condições operacionais. De acordo com o Boletim de Aplicação 204/2e da (Metrohm, 2013) que trata da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras pelo método Rancimat, óleos poliinsaturados como

óleo de peixe e de linhaça apresentam resultados típicos de período de indução de 0,25 e 0,5-2,0, respectivamente.

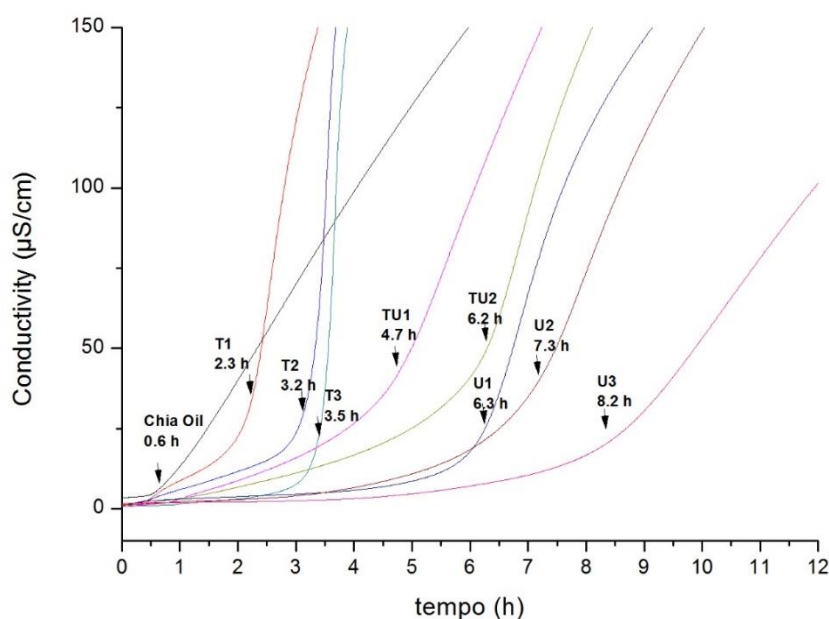


Figura 3. Curvas de oxidação (condutividade vs. tempo) obtidos a partir do teste acelerado Rancimat de óleo de chia microencapsulado. Óleo de chia fresco foi utilizado como controle. As setas indicam o período de indução (IP) determinada para cada amostra.

O tipo e o tempo de homogeneização influenciaram o período de indução, ou seja, quanto maior o tempo de homogeneização e quando o ultrassom foi utilizado o IP foi aumentado. Mas é importante ressaltar que todas as micropartículas apresentaram um IP maior do que o do óleo puro, demonstrando que a encapsulação é uma forma atrativa de aumentar a proteção do óleo de chia. Foi observado ainda uma forte correlação entre o óleo superficial das micropartículas e o IP (Figura 4), o que pode ser explicado pelo fato do óleo na superfície estar disponível para uma oxidação mais acelerada, enquanto que o óleo encapsulado está protegido pelo material de parede.

As amostras TU2, U2 e U3 apresentaram, respectivamente, tempos de indução de 6,2 h, 7,3 h e 8,2 h. No entanto, estas amostras não apresentaram diferença significativa no diâmetro médio da emulsão e nem nas propriedades físico-químicas do pó, a saber, óleo encapsulado, óleo superficial e eficiência de encapsulação. Assim, a única explicação plausível para esta diferença observada nos tempos de indução recai sobre os métodos de homogeneização. Durante o uso do rotor-estator, uma certa quantidade de ar (oxigênio) é incorporada a amostra,

o que não ocorre com o sistema de ultrassom, que ao contrário ocorre em cabine fechada. Na Figura 3 percebe-se que todas as amostras homogeneizadas total ou parcialmente com rotor-estator tiveram tempos de indução inferiores às amostras homogeneizadas com ultrassom. Isto ocorreu mesmo para a situação U1, na qual o tamanho do diâmetro médio da gota é maior do que os obtidos para as amostras TU1 e TU2. Portanto, pode-se afirmar que para o óleo de chia encapsulado, o método de homogeneização por ultrassom traz uma grande vantagem processual em termos da estabilidade final conferida ao óleo encapsulado.

Silva et al. (2014) não observaram o mesmo comportamento no estudo da microencapsulação de óleo de café verde em diferentes combinações de materiais de parede, utilizando pressão de homogeneização de 50 MPa. Os autores verificaram que o tipo de homogeneização não influenciou o tempo de indução, enquanto a combinação do material da parede afetou essa propriedade. Gallardo et al. (2013) também observaram que a combinação de material de parede influenciou o tempo de indução do óleo de linhaça encapsulado, sendo o maior tempo (9,5 h) obtido para composição com MD, WPI e GA e 4,3 vezes maior que o óleo de linhaça puro.

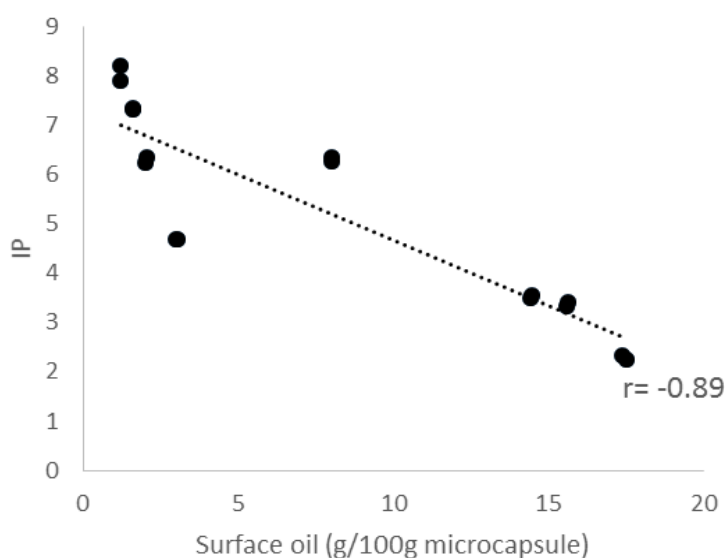


Figura 4. Correlação entre o óleo superficial e o período de indução (PI) obtido pelo método Rancimat

Em relação ao valor de peróxido, todas as amostras apresentaram teor abaixo de 1 meq peróxido/kg oil, sugerindo que o processo de microencapsulação não alterou negativamente a estabilidade do óleo. A fim de avaliar uma possível degradação dos ácidos graxos poliinsaturados, em especial o ácido linolênico (ALA), as amostras encapsuladas foram

avaliadas em relação ao perfil de ácidos graxos. Os perfis cromatográficos dos óleos microencapsulados foram semelhantes ao óleo fresco (OCH) (Figura 5) e os teores permaneceram os mesmos (Tabela 4).

Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos do óleo de chia fresco e microencapsulados.

Ácidos graxos	OCH	T1	T2	T3	U1	U2	U3	TU1	TU2
Ácido palmítico (C _{16:0})	7,60	7,55	7,49	7,92	7,85	7,57	7,83	7,55	7,51
Ácido esteárico (C _{18:0})	3,47	3,28	3,15	3,47	3,42	3,32	3,61	3,41	3,34
Ácido oleico (C _{18:1})	8,09	7,53	7,30	7,92	8,02	7,60	7,85	7,67	8,06
Ácido linoleico (C _{18:2})	15,23	16,27	16,34	16,88	15,41	16,07	16,35	16,51	15,44
Ácido α -linolênico (C _{18:3})	65,61	65,38	65,72	63,80	65,30	65,43	64,37	64,87	65,66

Os resultados são apresentados em % de ácidos graxos totais

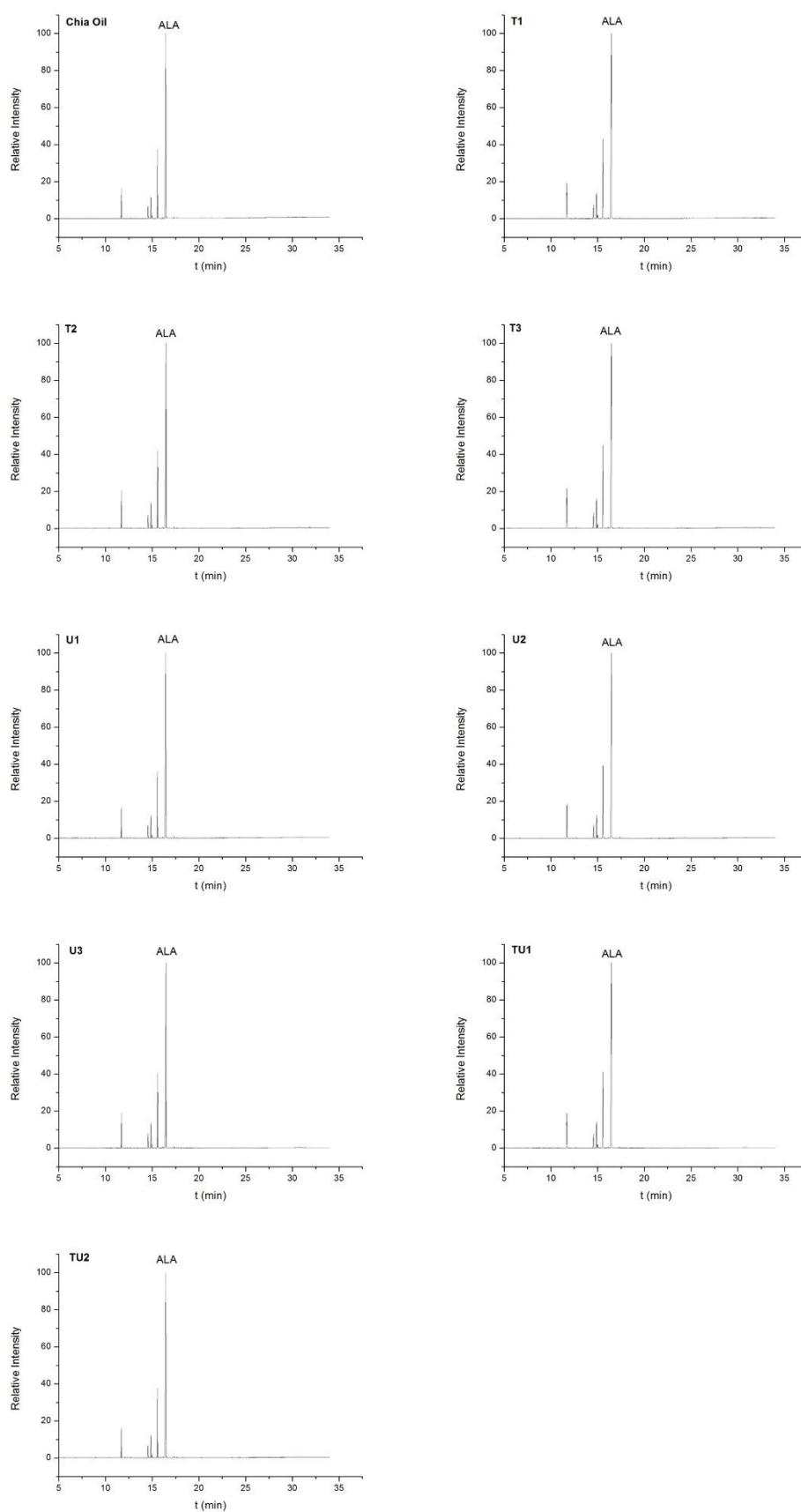


Figura 5. Perfil cromatográfico de óleo de chia extraído das microcápsulas. Óleo de chia fresco foi utilizado como controle.

3.4. Morfologia das microcápsulas

A Figura 6 mostra as microfotografias observadas em microscópio eletrônico de varredura dos pós produzidos. As partículas exibiram forma esférica e tamanhos variados, que é uma característica típica de pós secos por pulverização. Não foi observado fissuras ou porosidade na superfície da partícula, indicando uma cobertura completa do material de parede sobre o núcleo utilizado.

Não foi observado nenhum efeito dos processos de homogeneização sobre a morfologia das partículas, provavelmente as condições operacionais de secagem em *spray drying* é que são responsáveis pelas características físicas das micropartículas.

Algumas partículas apresentaram depressões na superfície, formadas possivelmente pelo encolhimento durante a secagem das partículas e o arrefecimento (Kalab, 1979) ou pelo colapso sofrido pelas gotículas durante as fases iniciais da secagem (Ré, 1998). Características morfológicas similares foram encontradas por Tonon, Grosso, & Hubinger (2011) e Carneiro et al. (2013).

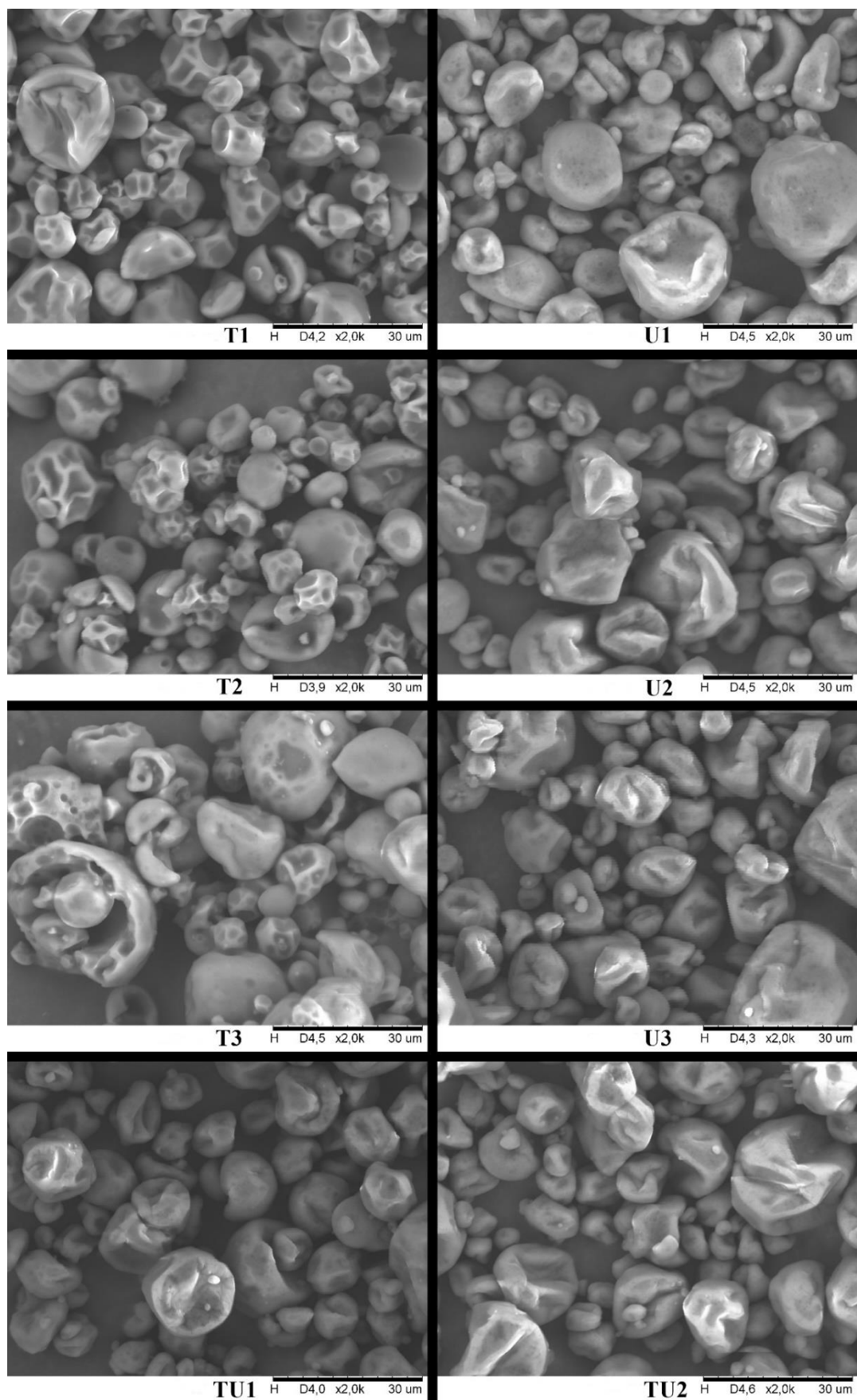


Figura 6. Microfotografias por Microscopia Eletrônica de Varredura de óleo de chia microencapsulado.

4. Conclusão

Neste trabalho foi possível avaliar a influência de diferentes processos de homogeneização das emulsões de óleo de chia em água e o impacto provocado nas propriedades das microcápsulas de óleo obtidas por *spray drying*. O processo de emulsificação utilizando o ultrassom promoveu um melhoramento no tamanho das gotas, eficiência de encapsulação e estabilidade oxidativa. O tamanho das partículas dos pós e o perfil de ácidos graxos não foram afetados pelo processo empregado.

O presente estudo foi realizado com 30% de óleo, similarmente à micropartículas comerciais, e apresentou resultados de porcentagem de óleo encapsulado (28,76%) e eficiência de encapsulação (96%) equivalentes a trabalhos da literatura realizados com apenas 20% de óleo. Considerando-se ainda os baixos índices oxidativos do óleo encapsulado, pode-se concluir que a composição de material de parede aliado a um processo de homogeneização e a uma tecnologia de microencapsulação de baixo custo, como o *spray-drying*, foram adequados para desenvolver uma micropartícula de óleo de chia estável, com viabilidade tecnológica de ser produzida industrialmente.

Agradecimentos

Os autores agradecem a agência de fomento brasileira CAPES e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

Referências

- ACTION. (2016). Software Livre. Versão 2.9. São Carlos: ESTATCAMP, 2015. Em: <http://www.portalaction.com.br/content/download-action>. Acesso em: 12 fevereiro 2016.
- Ahn, J.-H., Kim, Y.-P., Lee, Y.-M., Seo, E.-M., Lee, K.-W., & Kim, H.-S. (2008). Optimization of microencapsulation of seed oil by response surface methodology. *Food Chemistry*, 107(1), 98–105.
- Álvarez-Chávez, L. M., Valdivia-López, M. D. L. A., Aburto-Juárez, M. D. L., & Tecante, A. (2008). Chemical Characterization of the Lipid Fraction of Mexican Chia Seed (*Salvia hispanica* L.). *International Journal of Food Properties*, 11(3), 687–697.

- AOAC Association of Official Analytical Chemists. (2006). *Official methods of analysis of AOAC International* (18th ed.). Gaithersburg, Maryland.
- Ayerza, R. (1995). Oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.), from five northeastern locations in northwestern Argentina. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72(9), 1079–1081.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2004). Composition of chia (*Salvia hispanica*) grown in six tropical and sub-tropical ecosystems of South America. *Tropical Science*, 44(3), 131–135.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2011). Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Industrial Crops and Products*, 34(2), 1366–1371.
- Bae, E. K., & Lee, S. J. (2008). Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *Journal of Microencapsulation*, 25(8), 549–560.
- Capitani, M. I., Spotorno, V., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2012). Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT - Food Science and Technology*, 45(1), 94–102.
- Carneiro, H. C. F. (2011). Microencapsulação De Óleo De Linhaça Por Spray Drying : Influência Da Utilização De Diferentes.
- Carneiro, H. C. F., Tonon, R. V., Grosso, C. R. F., & Hubinger, M. D. (2013). Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, 115(4), 443–451.
- Charve, J., & Reineccius, G. a. (2009). Encapsulation performance of proteins and traditional materials for spray dried flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2486–2492.
- Coates, W., & Ayerza (h), R. (1996). Production potential of chia in northwestern Argentina. *Industrial Crops and Products*, 5(3), 229–233.

- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1473–1482.
- Djordjevic, D., McClements, D. J., & Decker, E. a. (2004). Oxidative Stability of Whey Protein-stabilized Oil-in-water Emulsions at pH 3: Potential ω -3 Fatty Acid Delivery Systems (Part B). *Journal of Food Science*, 69(5), 356–362.
- Frascareli, E. C., Silva, V. M., Tonon, R. V., & Hubinger, M. D. (2012). Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food and Bioproducts Processing*, 90(3), 413–424.
- Gallardo, G., Guida, L., Martinez, V., López, M. C., Bernhardt, D., Blasco, R., ... Hermida, L. G. (2013). Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. *Food Research International*, 52(2), 473–482.
- García-Moreno, P. J., Pérez-Gálvez, R., Guadix, A., & Guadix, E. M. (2013). Influence of the parameters of the Rancimat test on the determination of the oxidative stability index of cod liver oil. *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 303–308.
- Hardas, N., Danviriyakul, S., Foley, J. L., Nawar, W. W., & Chinachoti, P. (2002). Effect of relative humidity on the oxidative and physical stability of encapsulated milk fat. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(2), 151–158.
- Hielscher, T. (2005). Ultrasonic Production of Nano-Size Dispersions and Emulsions. *Ens*, (December), 14–16.
- Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Encapsulation Efficiency of Food Flavours and Oils during Spray Drying. *Drying Technology*, 26(7), 816–835.
- Jinapong, N., Suphantharika, M., & Jamnong, P. (2008). Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, 84(2), 194–205.
- Kalab, M. (1979). Microstructure of Dairy Foods. 1. Milk Products Based on Protein. *Journal of Dairy Science*, 68(12), 3234–3248.

- Le, H. Du, & Le, V. V. M. (2014). Application of ultrasound to microencapsulation of coconut milk fat by spray drying method.
- Marineli, R. S., Moraes, É. A., Lenquiste, S. A., Godoy, A. T., Eberlin, M. N., & Maróstica Jr, M. R. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 1304–1310.
- Martínez, M. L., Marín, M. a., Salgado Faller, C. M., Revol, J., Penci, M. C., & Ribotta, P. D. (2012). Chia (*Salvia hispanica* L.) oil extraction: Study of processing parameters. *LWT - Food Science and Technology*, 47(1), 78–82. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643811004324>
- McClements, D. J., Decker, E. a., & Weiss, J. (2007). Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components. *Journal of Food Science*, 72(8), 109–124.
- McNamee, B. F., O’Riordan, E. D., & O’Sullivan, M. (1998). Emulsification and Microencapsulation Properties of Gum Arabic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4551–4555.
- Metrohm. (2013). Application Bulletin 204/2 e. Oxidation stability of oils and fats – Rancimat method, 1–4.
- Partanen, R., Raula, J., Seppänen, R., Buchert, J., Kauppinen, E., & Forssell, P. (2008). Effect of relative humidity on oxidation of flaxseed oil in spray dried whey protein emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5717–5722.
- Ré, M. I. (1998). Microencapsulation by spray dry. *Drying Technology*, 16(6), 1195–1236.
- Rodea-González, D. A., Cruz-Olivares, J., Román-Guerrero, A., Rodríguez-Huezo, M. E., Vernon-Carter, E. J., & Pérez-Alonso, C. (2012). Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. *Journal of Food Engineering*, 111(1), 102–109.
- Schultz, S., Wagner, G., Urban, K., & Ulrich, J. (2004). High-pressure homogenization as a process for emulsion formation. *Chemical Engineering and Technology*, 27(4), 361–368.

- Semb, T. N. (2012). *Analytical Methods for Determination of the Oxidative Status in Oils*. Norwegian University of Science and Technology. Department of Biotechnology.
- Shantha, N. C., & Decker, E. a. (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77(2), 421–424.
- Silva, E. K., Azevedo, V. M., Cunha, R. L., Hubinger, M. D., & Meireles, M. A. A. (2016). Ultrasound-assisted encapsulation of annatto seed oil: Whey protein isolate versus modified starch. *Food Hydrocolloids*, 56, 71–83.
- Silva, E. K., Zabet, G. L., & A. Meireles, M. A. (2015). Ultrasound-assisted encapsulation of annatto seed oil: Retention and release of a bioactive compound with functional activities. *Food Research International*, 78, 159–168.
- Silva, V. M., Vieira, G. S., & Hubinger, M. D. (2014). Influence of different combinations of wall materials and homogenisation pressure on the microencapsulation of green coffee oil by spray drying. *Food Research International*, 61, 132–143.
- Sivakumar, M., Tang, S. Y., & Tan, K. W. (2014). Cavitation technology – A greener processing technique for the generation of pharmaceutical nanoemulsions. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), 2069–2083.
- Sootitawat, A., Bigeard, F., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M., & Linko, P. (2005). Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated d-limonene by spray drying. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(1), 107–114.
- Tanon, R. V., Grosso, C. R. F., & Hubinger, M. D. (2011). Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. *Food Research International*, 44(1), 282–289. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.018>
- Ubbink, J. (2010). Carbohydrates in Amorphous States: Molecular Packing, Nanostructure, and Interaction with Water. In D. S. Reid, T. Sajjanantakul, P. J. Lillford, & S. Charoenrein (Eds.), *Water Properties in Food, Health, Pharmaceutical and Biological Systems: ISOPOW 10*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.

- Ubbink, J., Kasapis, S., & Norton, I. T. (2009). *Modern Biopolymer Science*. Academic Press: New York.
- Velasco, J., Dobarganes, C., Holgado, F., & Márquez-Ruiz, G. (2009). A follow-up oxidation study in dried microencapsulated oils under the accelerated conditions of the Rancimat test. *Food Research International*, 42(1), 56–62.
- Zhang, Y., Tan, C., Abbas, S., Eric, K., Xia, S., & Zhang, X. (2015). Modified SPI improves the emulsion properties and oxidative stability of fish oil microcapsules. *Food Hydrocolloids*, 51, 108–117.

4. CONCLUSÃO

As sementes de chia são importantes fontes de proteína, ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, fibra alimentar e compostos bioativos com elevado potencial nutricional e tecnológico. Sementes e óleo de chia também contém compostos fenólicos que contribuem para elevada atividade antioxidante. Na farinha desengordurada foram encontrados, principalmente os ácidos sinápico, cafeico, salicílico, protocatequímico, hidroxibenzoico, gentísico e os flavonoides miricetina, quercetina e kaempferol, estes compostos foram extraídos com a utilização de solventes orgânicos. Misturas de solventes moderadamente polares como acetona-água e etanol-água foram altamente eficientes para extrair os compostos antioxidantes fenólicos da amostra estudada, ressaltando que essa extração é dependente da interação entre os compostos fenólicos presentes e o tipo de solvente. Já nos óleos foram encontrados principalmente, miricetina, quercetina, kaempferol e ácido sinápico. O óleo contém ainda elevados teores de tocoferóis, que contribuem para a elevada capacidade antioxidante. O processo de microencapsulação utilizado neste trabalho foi satisfatório. O principal ácido graxo α -linolênico encontrado no óleo de chia, não foi afetado pelo processo de microencapsulação. Quando o ultrassom foi utilizado no processo de homogeneização da emulsão houve uma melhora em alguns parâmetros do processo como tamanho das gotas e eficiência de encapsulação. Assim, foi possível obter microcápsulas com características desejáveis para aplicação em produtos alimentares utilizando um material de parede de baixo custo e processo de homogeneização adequado. Considerando a riqueza de fontes nutricionais e funcionais provenientes das sementes de chia, o aproveitamento tecnológico se faz necessário para melhorar a preservação e utilização de seus constituintes.

REFERÊNCIAS

- ACTION. (2016). Software Livre. Versão 2.9. São Carlos: ESTATCAMP, 2015. Em:
<http://www.portalaction.com.br/content/download-action>. Acesso em: 12 fevereiro 2016.
- AHN, J.-H., KIM, Y.-P., LEE, Y.-M., SEO, E.-M., LEE, K.-W., & KIM, H.-S. (2008). Optimization of microencapsulation of seed oil by response surface methodology. *Food Chemistry*, 107(1), 98–105.
- AOAC Association of Official Analytical Chemists. (2000). *Official methods of analysis of AOAC International* (19th ed.). Washington, D.C.: AOAC International.
- AOAC Association of Official Analytical Chemists. (2006). *Official methods of analysis of AOAC International* (18th ed.). Gaithersburg, Maryland.
- ASTM D4052. (2015). Standard Test Method for Density , Relative Density , and API Gravity of Liquids by Digital Density Meter.
- ASTM D445. (2015). Standard Test Method for Kinematic viscosity of transparent and Opaque Liquids.
- AYERZA, R. (1995). Oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.), from five northeastern locations in northwestern Argentina. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72(9), 1079–1081.
- AYERZA, R., & COATES, W. (2004). Composition of chia (*Salvia hispanica*) grown in six tropical and subtropical ecosystems of South America. *Tropical Science*, 44(3), 131–135.
- AYERZA, R., & COATES, W. (2004). Composition of chia (*Salvia hispanica*) grown in six tropical and sub-tropical ecosystems of South America. *Tropical Science*, 44(3), 131–135.
- AYERZA, R., & COATES, W. (2011). Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Industrial Crops and Products*, 34(2), 1366–1371.

- BAE, E. K., & LEE, S. J. (2008). Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *Journal of Microencapsulation*, 25(8), 549–560.
- BARBA DE LA ROSA, A. P., HERRERA-ESTRELLA, A., UTSUMI, S., & PAREDES-LÓPEZ, O. (1996). Molecular characterization, cloning and structural analysis of a cDNA encoding an amaranth globulin. *Journal of Plant Physiology*, 149(5), 527–532.
- BLIGH, E. G., & DYER, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911–917.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254.
- CAPITANI, M. I., SPOTORNO, V., NOLASCO, S. M., & TOMÁS, M. C. (2012). Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT - Food Science and Technology*, 45(1), 94–102.
- COATES, W., & AYERZA (H), R. (1996). Production potential of chia in northwestern Argentina. *Industrial Crops and Products*, 5(3), 229–233.
- CONDELLI, N., CARUSO, M. C., GALGANO, F., RUSSO, D., MILELLA, L., & FAVATI, F. (2015). Prediction of the antioxidant activity of extra virgin olive oils produced in the Mediterranean area. *Food Chemistry*, 177, 233–239.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.001>
- EPA. (1998). *Método 6020A (SW-846): plasma indutivamente acoplado-espectrometria de massa*.
- GÖKMEN, V., MOGOL, B. A., LUMAGA, R. B., FOGLIANO, V., KAPLUN, Z., & SHIMONI, E. (2011). Development of functional bread containing nanoencapsulated omega-3 fatty acids. *Journal of Food Engineering*, 105(4), 585–591.
- GÓMEZ-CARAVACA, A. M., CERRETANI, L., BENDINI, A., SEGURA-CARRETERO, A., & FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. (2006). Original Paper A simple and rapid electrophoretic method to characterize simple phenols , lignans , complex phenols , phenolic acids , and flavonoids in extra- virgin olive oil, 2221–2233.

- GORINSTEIN, S., MARTIN-BELLOSO, O., KATRICH, E., LOJEK, A., ČÍŽ, M., GLIGELMO-MIGUEL, N., ... TRAKHTENBERG, S. (2003). Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14(3), 154–159.
- Hardas, N., Danviriyakul, S., Foley, J. L., Nawar, W. W., & Chinachoti, P. (2002). Effect of relative humidity on the oxidative and physical stability of encapsulated milk fat. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(2), 151–158.
- HARTMAN, L., & LAGO, L. C. (1973). Rapid preparation of fatty acids methyl esters. *Laboratory Practice*, 22, 475–476.
- IXTAINA, V. Y. (2010). *Caracterización de la semilla e el aceite de chía (Salvia hispanica L.) obtenido mediante distintos procesos: aplicación en tecnología de alimentos*. La Plata: Universidad Nacional de La Plata.
- JAYAPRAKASHA, G. K., & JAGANMOHAN RAO, L. (2000). Phenolic Constituents from the Lichen *Parmotrema stuppeum* (Nyl .) Hale and Their Antioxidant Activity. *Zeitschrift Für Naturforschung*, 55, 1018–1022.
- JINAPONG, N., SUPHANTHARIKA, M., & JAMNONG, P. (2008). Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, 84(2), 194–205.
- KHATTAB, R. Y., & ZEITOUN, M. A. (2013). Quality evaluation of flaxseed oil obtained by different extraction techniques. *LWT - Food Science and Technology*, 53(1), 338–345.
- MARINELI, R. S., MORAES, É. A., LENQUISTE, S. A., GODOY, A. T., EBERLIN, M. N., & MARÓSTICA JR, M. R. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 1304–1310.
- OSBORNE, T. B. (1924). *The vegetable proteins. Monographs on Biochemistry*. (2nd ed.). London: Longmans green and Co.

- PACHECO, M. T. B., & SGARBIERI, V. C. (2001). Alimentos funcionais: conceituação e importância na saúde humana. In *Anais do I Simpósio Brasileiro sobre os Benefícios da Soja para a Saúde Humana -Documentos 169*. Londrina, PR: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- PARTANEN, R., RAULA, J., SEPPÄNEN, R., BUCHERT, J., KAUPPINEN, E., & FORSELL, P. (2008). Effect of relative humidity on oxidation of flaxseed oil in spray dried whey protein emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5717–5722.
- REYES-CAUDILLO, E., TECANTE, A., & VALDIVIA-LÓPEZ, M. A. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107(2), 656–663.
- REZAIE, M., FARHOOSH, R., IRANSHAHI, M., SHARIF, A., & GOLMOHAMADZADEH, S. (2015). Ultrasonic-assisted extraction of antioxidative compounds from Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *mutica*) hull using various solvents of different physicochemical properties. *Food Chemistry*, 173, 577–583.
- RUFINO, M. D. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S. DE, MORAIS, S. M. DE, SAMPAIO, C. D. G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., & SAURA-COLIXTO, F. D. (2006). Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). *Comunicado Técnico Embrapa*, 125, 1–4.
- RUFINO, M. D. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S. DE, MORAIS, S. M. DE, SAMPAIO, C. D. G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., & SAURA-COLIXTO, F. D. (2007). Metodologia Científica : Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. *Comunicado Técnico Embrapa*, 127, 1–4.
- SANDOVAL-OLIVEROS, M. R., & PAREDES-LÓPEZ, O. (2013). Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(1), 193–201.
- SEMB, T. N. (2012). *Analytical Methods for Determination of the Oxidative Status in Oils*. Norwegian University of Science and Technology. Department of Biotechnology.

- SHANTHA, N. C., & DECKER, E. A. (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77(2), 421–424.
- SLINKARD, K., & SINGLETON, V. L. (1977). Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49–55.
- ULBRICHT, C., CHAO, W., NUMMY, K., RUSIE, E., TANGUAY-COLUCCI, S., IANNUZZI, C. M., ... WEISSNER, W. (2009). Chia (*Salvia hispanica*): a systematic review by the natural standard research collaboration. *Reviews on Recent Clinical Trials*, 4(3), 168–174.
- VÁZQUEZ-OVANDO, J. A., ROSADO-RUBIO, J. G., CHEL-GUERRERO, L. A., & BETANCUR-ANCONA, D. A. (2010). Dry processing of chía (*Salvia hispanica* L.) flour: chemical characterization of fiber and protein. *CyTA - Journal of Food*, 8(2), 117–127.
- WHITE, J. A., HART, R. J., & FRY, J. C. (1986). An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *Journal of Automatic Chemistry*, 8(4), 170–177.

