

## DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DEL GRANO DE ERAGROSTIS TEF

### *Determination of the Phenolic Composition of Eragrostis Tef*

Ana LÓPEZ PÉREZ; Susana GONZÁLEZ MANZANO

Departamento de química analítica, nutrición y bromatología. Facultad de Farmacia, Campus Miguel de Unamuno. 37007 Salamanca, España.

Correo-e: susanagm@usal.es

**RESUMEN:** *Eragrostis tef* es un cereal etíope con grano comestible. Se distinguen dos variedades comerciales de teff definidas por el color de su semilla; netch (blanco) y qey (rojo / marrón). El reciente interés surgido en países occidentales por el teff se sustenta en su composición libre de gluten y en sus apreciadas ventajas nutricionales. El presente trabajo tiene como objetivo la caracterización del perfil polifenólico del grano de *Eragrostis tef*. Para ello, se han identificado y cuantificado los compuestos fenólicos presentes en las dos variedades, mediante cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa, con doble detección por espectrofotometría de diodo y espectrometría de masas (HPLC-DAD-MS). La bibliografía revisada describe los polifenoles presentes en *Eragrostis tef* como no flavonoides. En contraposición, en este estudio se han identificado flavonas, en concreto, derivados de luteolina y apigenina. El número de flavonas tentativamente identificadas en este trabajo ha sido de 10, casi todas ellas identificadas por primera vez.

**Palabras clave:** Eragrostis tef; cereal; polifenoles; flavonas; HPLC-Ms.

**ABSTRACT:** *Eragrostis tef* is an Ethiopian cereal with edible grain. There are two commercial teff varieties defined by the color of their seed; netch (white) and qey (red / brown). The recent interest in western countries for teff is based on their gluten-free composition and their appreciated

nutritional advantages. The present work aims to characterize the polyphenolic profile of the *Eragrostis tef* grain. Therefore, the phenolic compounds present in the two varieties were identified and quantified by reverse phase high performance liquid chromatography with double detection by diode spectrophotometry and mass spectrometry (HPLC-DAD-MS). The revised literature describes the polyphenols in *Eragrostis tef* as non-flavonoids. In contrast, in this study flavones have been identified, in particular, luteolin and apigenin derivatives. The number of flavones tentatively identified in this study was 10, almost all of them identified in this work for the first time.

*Key words:* Eragrostis tef; cereal; polifenoles; flavonas; HPLC-MS.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. *Teff. Descripción y características*

*Eragrostis tef*, conocido como teff o tef, es un antiguo cereal originario de Etiopía, donde se utiliza como base culinaria para elaborar injera. Su grano comestible destaca por su tamaño, siendo posiblemente el más pequeño del mundo. En relación con otros cereales más comunes como el arroz, el trigo o el maíz, se desconoce bastante sobre su composición nutricional y sus beneficios potenciales para la salud (Baye, 2014).

El teff es una planta anual tetraploide perteneciente a la familia de las gramíneas o poáceas (*Poaceae*), subfamilia *Chloridoideae*, tribu *Eragrostideae* y género *Eragrostis* (Callejo *et al.*, 2012). Existen unas 350 especies, pero solo *Eragrostis tef* (Zuccagni) Trotter se cultiva para consumo humano (Assefa *et al.*, 2015).

Se distinguen dos variedades comerciales de teff definidas por el color diferente de su semilla; netch (blanco) y qey (rojo / marrón) (Gebremariam *et al.*, 2014).

Su composición destaca por poseer un perfil nutricional muy atractivo y no contener gluten (Gebremariam *et al.*, 2014).

-Los carbohidratos complejos representan el 80% de su grano. Posee un contenido alto en almidón, por lo que se considera un cereal de digestión lenta, con un índice glucémico bajo, siendo adecuado para pacientes diabéticos tipo 2 (Cheng *et al.*, 2017).

-La cantidad de fibra de su harina es mayor que la de otros cereales, ya que en su producción no se eliminan el salvado y el germen debido al pequeño tamaño de su grano (Hager *et al.*, 2012)

–La proteína representa hasta el 13%, siendo similar o superior a muchos cereales. El perfil general de aminoácidos esenciales del teff se considera completo y equilibrado (Cheng *et al.*, 2017). La concentración de lisina es relativamente alta, este aminoácido suele ser limitante en cereales. Además la ausencia de gluten hace que el teff sea un alimento con características adecuadas para personas celiacas (Baye, 2014).

–En cuanto a la grasa, proporciona una mejor fuente de ácidos grasos que los cereales refinados resultando rico en ácidos grasos insaturados, predominantemente en ácido oleico y linoleico (Baye, 2014).

–El teff destaca por su riqueza mineral, siendo mayor en contenido de hierro, calcio, cobre y cinc que otros cereales. El hallazgo de hierro en niveles muy superiores a otros granos suscitó que se estudiara sobre la contaminación de los suelos etíopes. La biodisponibilidad de los minerales no intrínsecos no está completamente dilucidada, sin embargo tales cantidades de hierro se han relacionado en varios estudios con la ausencia de anemia nutricional por falta de hierro en Etiopía (Abebe *et al.*, 2007) (Arguedas, 2008).

–Con respecto a fitoquímicos, contiene una elevada cantidad de fitatos, reservorio de fósforo en muchas semillas. Como efecto negativo cabe destacar sus propiedades quelantes, pudiendo disminuir la biodisponibilidad de otros minerales. Por otra parte, presentan efectos beneficiosos con propiedades anticancerígenas, aunque la fermentación para la elaboración de injera da lugar a su degradación. La existencia de la cantidad de fitatos óptima, absorbible y beneficiosa es desconocida (Abebe *et al.*, 2007).

Otro grupo de compuestos fitoquímicos con gran relevancia en este cereal y del que se basa este trabajo, son los polifenoles.

## 1.2. Polifenoles. Descripción y características

Estos compuestos son un grupo heterogéneo de metabolitos secundarios de plantas, involucrados en múltiples acciones como la defensa contra patógenos. Igualmente tienen beneficios cuando entran a formar parte de la dieta en humanos, debido principalmente a su capacidad como captadores de radicales libres. Por ello, son estudiados como agentes potenciales para prevenir y tratar enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, tales como el cáncer o el envejecimiento, además de patologías cardiovasculares, endocrinas y neurodegenerativas (Crozier *et al.*, 2009) (Li *et al.*, 2014).

Existen discrepancias en la definición exacta de compuestos fenólicos, aceptándose en general las siguientes afirmaciones: moléculas formadas por un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo unidos o moléculas con dos anillos aromáticos con un grupo hidroxilo en cada uno de ellos (Crozier *et al.*, 2009).

En general se suele clasificar los polifenoles en dos grandes grupos: flavonoides y no flavonoides.

Los flavonoides son compuestos con dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>). Las principales subclases de flavonoides de la dieta son flavonoles, flavonas, flavanoles, antocianidinas, flavanonas e isoflavonas (Crozier *et al.*, 2009).

Los principales no-flavonoides de importancia dietética son los ácidos fenólicos (mayoritariamente el ácido gálico), los ácidos hidroxicinámicos y sus derivados conjugados (principalmente ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido sinápico) y los estilbenos (Crozier *et al.* 2009).

La mayoría de los flavonoides existen habitualmente en sus medios naturales en forma de *O*-glicósidos, normalmente unidos a grupos hidroxilo en posiciones 3, 7 o 4', y menos frecuentemente como *C*-glicósidos, ligados directamente a los carbonos C-6 o C-8. Los azúcares pueden estar adicionalmente esterificados con ácidos alifáticos (p. ej., ácidos malónico o acético) o aromáticos (p. ej., ácidos *p*-cumárico, cafeico o ferúlico) (Santos-Buelga y González-Paramas 2014). Se conocen también las *O*-glicosil-*C*-glicosil flavonas, donde la *O*-glicosilación puede estar en el hidroxilo fenólico o en el resto de azúcar a partir de *C*-glicosilación, principalmente en la posición 2", seguida de la 6" (Ferrerres *et al.*, 2007).

La identificación completa de los compuestos polifenólicos presentes en el teff no está totalmente descrita, en algunas publicaciones se hace una valoración global de todos los polifenoles, determinando el índice de polifenoles totales.

En dichos estudios realizados previamente a este trabajo, se han identificado y cuantificado globalmente los polifenoles demostrando ser bastante relevantes en comparación con otros cereales. Hager *et al.* hallaron cantidades de 465,47 mg /100 g en trigo sarraceno y de 175,65 mg / 100 g en teff y menores respectivamente para sorgo, maíz, trigo integral y quinoa.

## 2. OBJETIVO

El reciente interés surgido en países occidentales por el teff se sustenta en su composición libre de gluten y en sus apreciadas ventajas nutricionales. Sin embargo, destacan las escasas publicaciones encontradas sobre sus propiedades, su composición y en concreto, sobre sus polifenoles.

Por ello, el objetivo del presente trabajo es llevar a cabo una caracterización del perfil polifenólico del grano de *Eragrostis tef*. Para ello, se han identificado y cuantificado los compuestos fenólicos presentes en dos variedades: netch y qey, mediante cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa, con doble detección por espectrofotometría de diodo y espectrometría de masas (HPLC-DAD-MS).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. *Búsqueda bibliográfica*

Inicialmente se llevó a cabo una búsqueda general sobre el teff y sus polifenoles en las siguientes bases de datos: Scopus, Web of Science y CSIC.

#### 3.2. *Materiales*

##### ➤ Muestras

Se importaron granos de dos variedades, blanca y roja, de *Eragrostis tef* desde el mercado de Sodo, en Addis Abeba (Etiopía).

##### ➤ Reactivos

El solvente utilizado para realizar la extracción de los compuestos fenólicos, fue una solución de metanol calidad HPLC (Lab-Scan) al 75%, preparada *in situ* con agua ultrapura (Quantum EX Ultrapure Organex Cartridge-Millipore).

Los reactivos de la fase móvil empleados durante el análisis de los polifenoles fueron: ácido fórmico y trifluoroacético al 0,1% (Panreac), y acetonitrilo (HiPer-Solv CHROMANORM) calidad HPLC al 100%.

Para cuantificar se realizó una recta patrón con apigenina-7-O-glucósido (Extrasynthèse).

##### ➤ Equipo

Balanza analítica (Sartorius Extend ED124S), agitador orbital con incubación (VWR), sistema de purificación de agua ultrapura (Direct-QTM, Millipore), baño ultrasonido (Branson, modelo 5.510), centrífuga (Kokusan) y equipo de evaporación rotatorio «Büchi» con controlador de vacío V-850, rotavapor R-210 y baño calefactor B-49.

El HPLC utilizado fue un Hewlett-Packard 1.100 (Agilent Technologies), equipado con una bomba cuaternaria y un detector de diodos (DAD) acoplado a un HP Chem Station como estación de procesamiento de datos. El sistema de HPLC se conectó a través del DAD a una API 3.200 Qtrap (Applied Biosystems) espectrómetro de masas (MS).

#### 3.3. *Métodos*

##### ➤ Extracción de compuestos fenólicos

Los granos de teff fueron molidos en seco (3 series de 15 segundos de trituración seguidos de 10 segundos de espera) obteniéndose dos harinas, una por

cada variedad. Se realizó el análisis de cada muestra por triplicado. Se analizaron 3 muestras de cada harina, de 5 g cada una.

Se añadieron 50 mL de metanol al 75% en tubos de ensayo para realizar la primera extracción. Se llevaron las muestras al ultrasonido durante 20 minutos, y a continuación al agitador orbital (2 horas, temperatura 22 °C, velocidad 180 r. p. m.). Por último, se centrifugaron las muestras durante 4 minutos (velocidad angular 5.000 r. p. m. y temperatura entre 0 y 15 °C). Se reservó el sobrenadante y se continuó la extracción partiendo del precipitado. Para ello, se repitió el proceso descrito, diferenciándose únicamente en los tiempos de agitación, 20 horas para la segunda extracción y 24 horas para la tercera. Para eliminar el solvente se usó un rotavapor a vacío a temperatura máxima de 30 °C, evitando así la hidrólisis de los polifenoles. El residuo resultante fue redisolto en 5 mL de acetonitrilo al 30% y conservado en nevera.

#### ➤ Análisis de compuestos fenólicos

Las seis muestras se inyectaron en HPLC-DAD-MS. La separación se llevó a cabo empleando una columna Phenomenex (5 µm, 150 mm x 4,6 mm) termostatazada a 35 °C y con una fase móvil formada por ácido trifluoroacético al 0,1% como reactivo acuoso (A) y acetonitrilo al 100% como fase orgánica (B). El gradiente de elución establecido fue 0% de B isocrático durante 5 min, 5-25% de B durante 10 min, 25-35% de B durante 10 min, 35-45% de B durante 10 min, 45-50% de B durante 15 min, 50-55% de B durante 15 min, isocrático 60% B durante 5 min y reequilibrar la columna a las condiciones iniciales de disolvente. El flujo fue de 0,5 mL/min y el volumen de inyección de 100 µL.

La identificación de los compuestos se realizó en base a los espectros UV-visible, los tiempos de retención observados en los cromatogramas y los datos de MS y MS<sup>n</sup> obtenidos del espectrómetro de masas.

Para cuantificar los compuestos identificados se realizó una recta de calibrado con patrón de apigenina de 0,1 a 0,001 mg/mL.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. *Identificación de los polifenoles del teff*

Tras la separación mediante HPLC se obtuvieron los cromatogramas de cada variedad (Figura 1).

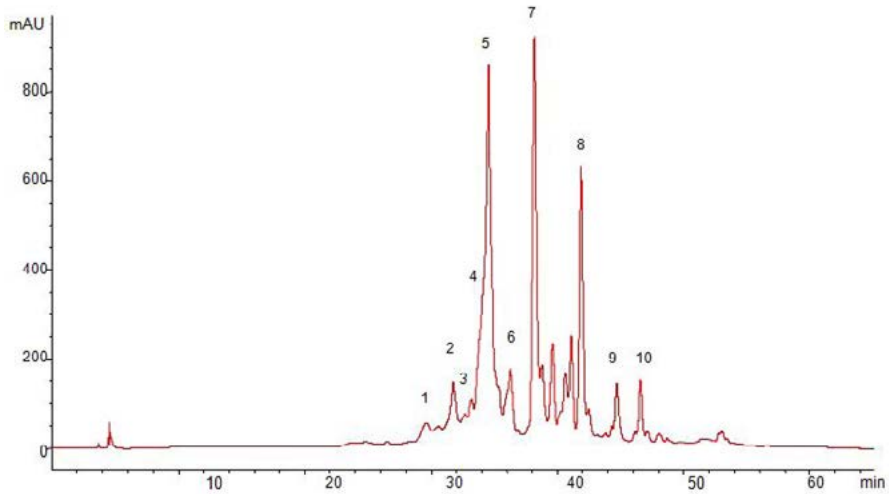


Figura 1. Cromatograma de teff blanco detectado a 370 nm. La identificación tentativa de estos picos está recogida en la tabla 1.

Los tiempos de retención (TR) de cada pico y los espectros de UV-visible se compararon con patrones para identificar tentativamente los compuestos.

A continuación, se recogen los datos analizados y la identificación asignada a cada pico del cromatograma (Tabla 1).

La bibliografía revisada describe los polifenoles presentes en *Eragrostis tef* como no flavonoides. En contraposición, en nuestro estudio hemos identificado flavonas. Kotásková *et al.* encontraron cantidades de polifenoles de 1,41-2,19 mg/g en teff por el método de folin-ciocalteu, siendo mayoritarios el ácido gálico, ferúlico, protocatéquico y cumárico (Kotásková *et al.*, 2016). Salawu *et al.* hallaron principalmente ácido *p*-hidroxibenzoico y ferúlico, además de agliconas de flavonas como luteolina y apigenina (Salawu *et al.*, 2014).

Tabla 1. Identificación tentativa de polifenoles del teff netch (<sup>n</sup>) y qey (<sup>q</sup>).

Pico	<sup>1</sup> TR (min)	<sup>2</sup> $\lambda_{max}$ UV-vis (nm)	<sup>3</sup> $[M - H]^{-}$ (m/z)	<sup>4</sup> MS <sup>2</sup> (m/z)	<sup>5</sup> Identificación tentativa
1 <sup>n</sup>	28,7	270-336	609	327-357-297-285-411-313-447	7-O-hex-8-C-hex-luteolina

Pico	<sup>1</sup> TR (min)	<sup>2</sup> λ <sub>max</sub> UV-vis (nm)	<sup>3</sup> [M - H] <sup>-</sup> (m/z)	<sup>4</sup> MS <sup>2</sup> (m/z)	<sup>5</sup> Identificación tentativa
2 <sup>n</sup>	30,4	270-336	609	327-357-297-411	4'-O-hex-6-C-hex-luteolina
3 <sup>n</sup>	31,4	270-342	609	327-357-297-411	4'-O-hex-8-C-hex-luteolina
4 <sup>n</sup>	33,1	270-336	593	311-283-341-323-295	2''-O-ramn-8-C-hex-luteolina
5 <sup>n</sup>	34,3	270-332	593	311-283-341-323-295	x-O-hex-x-C-hex-apigenina
6 <sup>n</sup>	36,1	270-328	563	353-383-325-473-297-443	7-O-pent-8-C-hex-apigenina
7 <sup>n</sup>	37,9	268-328	431	311-283-117-341	6-C-glucosa-apigenina
8 <sup>n</sup>	41,7	268-330	743	311-283-341-323-293	Derivado de apigenina
9 <sup>n</sup>	44,5	268-332	639	293-311-455-553-283-323-595-473-341	Derivado de apigenina
10 <sup>n</sup>	46,5	268-332	515	311-283-455-117-323-161-353-293-377	Derivado de apigenina
1 <sup>q</sup>	27,07	270-336	609	327-357-297-285-393-369	x-O-hex-x-C-hex-luteolina
2 <sup>q</sup>	29,23	270-348	609	327-357-297-311-285-393	x-O-hex-x-C-hex-luteolina
3 <sup>q</sup>	30,33	270-348	609	327-357-297-285-393-447	x-O-hex-x-C-hex-luteolina
4 <sup>q</sup>	31,41	270-336	609	327-357-447-299-285-411-369	x-O-hex-x-C-hex-luteolina
5 <sup>q</sup>	32,16	270-346	755	327-299-357-447-357-297-285	2''-O-ramn-6»-O-hexo-6C-hex-luteolina
6 <sup>q</sup>	34,38	270-336	593	311-283-341-323-279-251	x-C-hex-x-C-hex-apigenina



Pico	<sup>1</sup> TR (min)	<sup>2</sup> λ <sub>max</sub> UV-vis (nm)	<sup>3</sup> [M - H] <sup>-</sup> (m/z)	<sup>4</sup> MS <sup>2</sup> (m/z)	<sup>5</sup> Identificación tentativa
7 <sup>a</sup>	35,37	268-344	447	327-357-297-285-133	8-C-glucosa-luteolina
8 <sup>a</sup>	36,02	268-346	447	327-357-297-285-133	6-C-glucosa-luteolina
9 <sup>a</sup>	38,34	268-344	593	283	X-C-rutinosido-luteolina
10 <sup>a</sup>	39,54	264-346	759	327-357-299-339	Derivado de luteolina

Hex: hexosa; ramn: ramnosa; pent: pentosa; <sup>1</sup>TR (min): tiempo de retención de cada compuesto; <sup>2</sup>λ<sub>max</sub> UV-vis (nm): longitudes de onda máximas de los picos; <sup>3</sup>[M - H]<sup>-</sup>(m/z): ion molecular, relación masa/carga del compuesto; <sup>4</sup>MS<sup>2</sup> (m/z): masas de los fragmentos del compuesto; <sup>5</sup>Identificación tentativa: identificación final asignada en función de los parámetros expuestos, de los espectros UV-visible, de los espectros de masas y del orden de elución descrito por Ferreres *et al.*, 2007.

Los fragmentos característicos de las flavonas O-glicosiladas y/o C-glicosiladas han sido determinantes para establecer en qué posición están unidos los azúcares. Así pues, fragmentos como 311 y 341 m/z, repetidos en numerosos picos, corresponden con la aglicona (apigenina, 270 uma) +41 y +71 respectivamente, representativo de flavonas C-glicosiladas. En los derivados de luteolina también observamos estas rupturas de aglicon (286 uma) +41 y +71, 327 y 357 m/z respectivamente (Ferreres *et al.*, 2007).

Asimismo nos apoyamos en el orden de elución establecido por Ferreres *et al.*, destacando que la intensidad del fragmento +71 es mayor en el isómero C-6 que en el C-8.

#### 4.2. Cuantificación de los polifenoles del teff

En la tabla 2 se recogen los resultados obtenidos por las áreas integradas y cuantificadas mediante la recta de calibrado de apigenina.

Tabla 2. Cuantificación compuestos fenólicos del teff netch.

Pico	Identificación netch	$^1\mu\text{g}$ Apigenina/ g teff seco	Pico	Identificación qey	$^1\mu\text{g}$ Apigenina/ g teff seco
1	7-O-hex-8-C-hex-luteo- lina	11,3	1	x-O-hex-x-C-hex- luteolina	46,0
2	4'-O-hex-6-C-hex-luteo- lina	20,4	2	x-O-hex-x-C-hex- luteolina	168,5
3	4'-O-hex-8-C-hex-luteo- lina	7,0	3	x-O-hex-x-C-hex- luteolina	127,2
4	2''-O-ramn-8-C-hex- luteolina	77,0	4	x-O-hex-x-C-hex- luteolina	172,9
5	x-O-hex-x-C-hex-apige- nina	357,2	5	2''-O-ramn-6''-O- hex-6C-Hex-luteo- lina	16,8
6	7-O-pent-8-C-hex-apige- nina	44,9	6	x-C-hex-x-C-hex- apigenina	51,0
7	6-C-glucosa-apigenina	220,8	7	8-C-glucosa-luteolina	72,1
8	Derivado de apigenina	184,9	8	6-C-glucosa-luteolina	190,5
9	Derivado de apigenina	26,4	9	X-C-rutinósido- luteolina	105,7
10	Derivado de apigenina	23,4	10	Derivado de luteolina	200,6
APIGENINA TOTAL		973,3	APIGENINA TOTAL		1.151,3

Luteolina: todos los compuestos se cuantificaron con apigenina debido a la no disponibilidad de patrón de luteolina. Ambos compuestos son flavonas con parecido coeficiente de extinción molar;  $1\mu\text{g}$  Apigenina/g teff seco: los resultados se expresan en contenido seco de teff. La variedad blanca mostró en nuestro estudio un 4,9% de humedad. La variedad roja mostró en nuestro estudio un 5,7% de humedad.

## 5. CONCLUSIONES

El atractivo del teff radica en su completo perfil nutricional, siendo además un cereal libre de gluten. En comparación con otras gramíneas, destacan sus altos niveles de fibra, minerales y polifenoles,

En nuestro estudio, hemos analizado los compuestos fenólicos del teff mediante HPLC-DAD-MS. El contenido total de polifenoles hallados es similar al descrito por Kotásková *et al.* y Salawu *et al.* Este es mayor en la variedad roja, 1.151,3 µg apigenina/g teff seco, que en la blanca, 973,3 µg apigenina/g teff seco.

Sin embargo, los resultados obtenidos en cuanto al perfil polifenólico difieren en gran parte a los descritos en dichos estudios, realizados con técnicas menos sensibles, ya que en nuestro trabajo hemos encontrado grandes cantidades de flavonas. Salawu *et al.* hallaron la presencia de agliconas de apigenina y luteolina.

El número de flavonas tentativamente identificadas en este trabajo ha sido de 10, casi todas ellas identificadas por primera vez.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abebe Y *et al.* Phytate, zinc, iron and calcium content of selected raw and prepared foods consumed in rural Sidama, Southern Ethiopia, and implications for bioavailability. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2007; 20(3): 161-168.
- Arguedas P. TEFF. Survey on the nutritional and health aspects of Teff (*Eragrostis tef*). Memorias, Red-Alfa Lagrotech, Comunidad Europea, Cartagena. 2008.
- Assefa K *et al.* Genetic Diversity in Tef [*Eragrostis Tef* (Zucc.) Trotter]. *Frontiers in Plant Science*. 2015; 6: 177.
- Baye K. Teff: nutrient composition and health benefits. International Food Policy Research Institute (IFPRI) and Ethiopian Development Research Institute (EDRI). 2014; 67.
- Callejo MJ, Tesfaye W, Rodriguez M. El teff (*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter): nuevas posibilidades para un nuevo cereal. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*. 2012; 433: 84-87.
- Cheng A *et al.* Diversifying crops for food and nutrition security—a case of teff. *Biological Reviews*, 2017; 92: 188-198.
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural product reports*. 2009; 26(8): 1001-1043.
- Ferreres F *et al.* Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatograph*. 2007; 1161(1): 214-223.
- Gebremariam MM, Zarnkow M, Becker T. Teff (*Eragrostis tef*) as a raw material for malting, brewing and manufacturing of gluten-free foods and beverages: a review. *Journal of Food Science and Technology*. 2014; 51(11): 2881-2895.

- Hager A, Wolter A, Jacob F, Zannini E, Adrendt E. Nutritional properties and ultra-structure of commercial gluten free flours from different botanical sources compared to wheat flours. *Journal of Cereal Science*. 2012; 56(2): 239-247.
- Kotásková E, Sumczynski D, Mlček J, Valášek P. Determination of free and bound phenolics using HPLC-DAD, antioxidant activity and in vitro digestibility of Eragrostis tef. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2016; 46: 15-21.
- Li A *et al.* Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*. 2014; 6(12): 6020-6047.
- Salawu SO, Bester MJ, Duodo KG. Phenolic composition and bioactive properties of cell wall preparations and whole grains of selected cereals and legumes. *Journal of Food Biochemistry*. 2014; 38(1): 62-72.
- Santos-Buelga C, González-Paramás AM. Strategies in the analysis of plant flavonoids. *Handbook of Chemical and Biological Plant Analytical Methods*. 2014; 543-569.
- Shumoy H, Gabaza M, Vandeveld J, Raes K. Soluble and bound phenolic contents and antioxidant capacity of tef injera as affected by traditional fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2017; 58: 52-59.