

ÉRICA AGUIAR MORAES

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, QUALIDADE PROTEICA E POTENCIAL
FUNCIONAL DE GENÓTIPOS DE SORGO DISPONÍVEIS À ALIMENTAÇÃO
HUMANA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência da
Nutrição, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M827a
2011

Moraes, Érica Aguiar, 1986-

Atividade antioxidante, qualidade proteica e potencial funcional de genótipos de sorgo disponíveis à alimentação humana / Érica Aguiar Moraes. – Viçosa, MG, 2011.
xv, 104f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Hércia Stampini Duarte Martino.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 92-104.

1. *Sorghum bicolor* - Processamento. 2. Plantas - Efeito dos fenóis. 3. Filato. 4. Taninos. 5. Antocianinas. 6. Inflamação. 7. Stress oxidativo. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 664.72

ÉRICA AGUIAR MORAES

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, QUALIDADE PROTEICA E POTENCIAL
FUNCIONAL DE GENÓTIPOS DE SORGO DISPONÍVEIS À ALIMENTAÇÃO
HUMANA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência da
Nutrição, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 18 de julho de 2011.

Dr. Robert Eugene Schaffert

Profº. Dr. Sérgio Oliveira de Paula

Dr^a. Valéria Aparecida Viera Queiroz
(Coorientadora)

Prof^a. Dr^a Ana Vlândia Moreira
(Coorientadora)

Prof^a. Dr^a Hércia Stampini Duarte Martino
(Orientadora)

“Não me envergonho de corrigir e mudar as minhas opiniões, porque não me envergonho de raciocinar e aprender”

Alexandre Herculano

*Dedico esta dissertação aos meus amados pais José dos Santos e Hudilea, aos meus avôs e as minhas irmãs
Bruna e Cláudia com amor, carinho e gratidão.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais José dos Santos e Hudilea pelo apoio e amor incondicionais, e principalmente pelos exemplos de pessoas que vocês são para mim.

As minhas irmãs, pela compreensão e carinho.

Ao Tiago, pelo amor, companheirismo, incentivo, em todos estes anos de convivência.

À minha querida orientadora Professora Hércia, pelos ensinamentos, orientação, amizade e confiança. Muito obrigada por tudo!

À Dr^a Valéria, minha co-orientadora que acreditou integralmente neste trabalho.

À professora Sônia pela amizade, ensinamentos e valiosos conselhos.

À professora Ana Vlândia pelo carinho, ensinamentos e apoio de sempre.

Ao Robert pelo apóio ao desenvolvimento a esta pesquisa.

Ao professor Laércio e Sérgio pelo apoio, disponibilidade e co-orientação.

Ao professor Paulo Cecon pela ajuda nas análises estatísticas.

As estagiárias Dorina, Mariana, Vivian e Kellen por me ajudarem nos períodos de aperto.

Aos amigos do mestrado e doutorado, em especial Ana Cristina, Bárbara, Carlos, Cynthia, Damiana, Júlia, Leandro, Luciana, Roberta, Natália, Solange e Vânia pelo apoio, amizade e carinho.

Aos funcionários, membros e parceiros Laboratório de Nutrição Experimental (DNS), Laboratório de Análise de Alimentos (DNS) e Desenvolvimento de Novos Produtos (DNS) por toda atenção e apoio no período das análises.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuição científica ao avaliarem este trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição e Saúde, pela amizade e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e à Embrapa Milho e Sorgo pelo financiamento do projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. O sorgo	3
2.2. Composição química do sorgo	4
2.3. Fenólicos do sorgo.....	5
2.4. Atividade antioxidante do sorgo	9
2.5. Potencial funcional do sorgo	10
2.5.1. Estresse oxidativo e inflamação	10
2.5.2. Dislipidemias e doenças cardiovasculares	12
2.5.3. Diabetes mellitus	13
2.5.4. Obesidade.....	13
2.5.5. Câncer	14
2.6. Tecnologias de processamento do sorgo	15
2.7. Conclusão	17
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivo geral.....	19
3.2. Objetivos específicos	19
4. METODOLOGIA GERAL	20
4.1. Aquisição e elaboração das farinhas e pipocas de genótipos de sorgo	20
4.2. Caracterização química das farinhas de sorgo.....	22
4.2.1. Teor de água.....	22
4.2.2. Proteína.....	22
4.2.3. Lipídios.....	22
4.2.4. Cinzas	22
4.2.5. Carboidratos.....	22
4.2.6. Fibra alimentar	23
4.2.7. Conteúdo calórico	25
4.2.8. Fenólicos totais	25
4.2.9. Taninos condensados	25
4.2.10. Fitato	26

4.2.11. Antocianinas.....	27
4.2.12. Atividade antioxidante	29
4.3. Estudo da qualidade proteica de farinhas cruas e submetidas ao tratamento térmico	29
4.3.1. Animais e dietas experimentais	29
4.3.2. Coeficiente de eficiência alimentar	31
4.3.3. Coeficiente de eficiência protéica e razão protéica líquida	31
4.3.4. Digestibilidade verdadeira	32
4.3.5. Determinação e quantificação de aminoácidos.....	32
4.3.6. Escore químico e escore químico corrigido pela digestibilidade	34
4.4. Estudo de potencial funcional de grãos de genótipos de sorgo submetidos ao tratamento térmico	34
4.4.1. Animais e dietas experimentais	34
4.4.2. Parâmetros bioquímicos.....	37
4.4.3. Peroxidação de lipídios	39
4.4.4. Superóxido dismutase	40
4.4.5. Concentração de proteínas totais nos homogenados.....	40
4.4.6. Análise dos mediadores do processo inflamatório.....	41
4.4.7. Morfometria das vilosidades e criptas intestinais	43
4.5. Aspectos éticos.....	43
5. ARTIGO I	45
5.1. Introdução	47
5.2. Material e métodos.....	48
5.3. Resultados e Discussão.....	51
5.4. Conclusão	58
6. ARTIGO II	60
6.1. Introduction	61
6.2. Material and methods.....	62
6.3. Results and discussion.....	66
6.4. Conclusion	72
7. ARTIGO III	74
7.1. Introdução	76
7.2. Material e método	77
7.3. Resultados	81
7.4. Discussão	85
7.5. Conclusão	89
8. CONCUSÃO GERAL	90
9. ANEXO I	91

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
--------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Desenho experimental para seleção das farinhas de grãos de sorgo para os artigos I, II e III.....	21
Figura 2- Desenho experimental do estudo de qualidade protéica de farinhas cruas e submetidas ao tratamento térmico.	30
Figura 3- Desenho experimental do estudo de potencial funcional de genótipos de sorgo submetidos ao tratamento térmico.....	35
Figura 4- Atividade antioxidante em farinhas de grãos crus (FSC), submetidos ao tratamento térmico em estufa (FSTT) e pipoca (PS) de genótipos de sorgo.....	54
Figura 5- Concentração de fenólicos totais em farinhas de grãos crus (FSC), submetidos ao tratamento térmico em estufa (FSTT) e pipoca (PS) de genótipos de sorgo.....	55
Figura 6- Concentração de tanino em farinhas de grãos crus (FSC), submetidos ao tratamento térmico em estufa (FSTT) e pipoca (PS) de genótipos de sorgo.....	56
Figura 7- Concentração de fitato em farinhas de grãos crus (FSC), submetidos ao tratamento térmico em estufa (FSTT) e pipoca (PS) de genótipos de sorgo.....	58
Figura 8- Expressão de mRNA IL-8, IL-10 e TNF- α em tecido adiposo epididimário dos animais alimentados com as dietas AIN-93M, DHC, DHS 305, DHS 309 e DHS 310.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição das dietas experimentais aprotéica, com caseína e com farinha de sorgo dos genótipos BRS 305, BRS 309 e BRS 310 crus (FSC) e submetidos ao tratamento térmico seco (FSTT) (g.100g ⁻¹).....	31
Tabela 2- Composição das dietas experimentais (g.100g ⁻¹).....	36
Tabela 3- Composição química centesimal de grãos de sete genótipos de sorgo, destinados a alimentação humana (g.100g ⁻¹).	51
Tabela 4- Atividade antioxidante (AA), concentração de fenólicos totais (FT), taninos (TA) e fitato (FI) em farinhas de grãos crus (FSC), submetidos a tratamento térmico (FSTT) e pipoca (PS) de sete genótipos de sorgo.....	53
Table 5- Composition of experimental protein-free diet, with casein and with sorghum grain flours of genotypes BRS 305, BRS 309 and BRS 310 raw (RF) and subjected to heat treatment (HTF) (g.100g ⁻¹).	63
Table 6 - Caloric density of diets (CD), percentage of protein in diets (PD), feed efficiency ratio (FER), food intake (FI) and weight gain (WG) of diets with casein, sorghum grain flours of genotypes BRS 305, BRS 309 and BRS 310 raw (RF) and subjected to heat treatment (HTF).....	66
Table 7- Protein Efficiency Ratio (PER) and Net Protein Ratio (NPR) of diets with casein, sorghum grain flours of genotypes BRS 305, BRS 309 and BRS 310 raw (RF) and subjected to heat treatment (HTF).	67
Table 8- Nitrogen intake (NI), nitrogen excretion (NE) and true digestibility (TD) of diets with casein, sorghum grain flours of genotypes BRS 305, BRS 309 and BRS 310 raw (RF) and subjected to heat treatment (HTF).....	69
Table 9- Aminoacid contents (g/100g) of sorghum grain flours of genotypes BRS 305, BRS 309 and BRS 310 subjected to heat treatment (105°C/ 30 Minutes).	71
Table 10- Amino acid score (AAS) and protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS), according to FAO/WHO (2007) of sorghum	

grain flours of genotypes BRS 305, BRS 309 and BRS 310 subjected to heat treatment (105°C/ 30 Minutes).	72
Tabela 11- Composição das dietas experimentais (g.100g ⁻¹).	79
Tabela 12- Composição química das farinhas dos genótipos de sorgo BRS 305, BRS 309 e BRS 310 submetidos ao tratamento térmico (150°C/ 30 minutos).	82
Tabela 13- Consumo alimentar, consumo energético, ganho de peso, gordura epididimária, coeficiente de eficiência alimentar, consumo de lipídios e fitoquímicos dos animais alimentados com as dietas AIN-93M, DHC, DHS 305, DHS 309 e DHS 310.	82
Tabela 14- Parâmetros bioquímicos, peroxidação de lipídios e atividade da enzima superóxido dismutase dos animais alimentados com as dietas AIN-93M, DHC, DHS 305, DHS 309 e DHS 310.	83
Tabela 15- Medidas da altura das vilosidades, profundidade das criptas, espessura das camadas musculares externa e interna (µm) do jejuno dos animais alimentados com as dietas AIN-93M, DHC, DHS 305, DHS 309 e DHS 310.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

FAO.....	<i>Food and Agriculture Organization</i>
IBGE.....	<i>Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística</i>
NF- κ B.....	<i>Fatores de transcrição nuclear NF-κB</i>
TNF- α	<i>Fator de necrose tumoral alfa</i>
IL-1.....	<i>Interleucina-1</i>
IL-6.....	<i>Interleucina-6</i>
IL-8.....	<i>Interleucina-8</i>
IL-10.....	<i>Interleucina-10</i>
SOD.....	<i>Superóxido dismutase</i>
CAT.....	<i>Catalase</i>
GPx.....	<i>Glutathione peroxidase</i>
HDL colesterol.....	<i>Lipoproteína de alta densidade</i>
CEA.....	<i>Coeficiente de eficiência alimentar</i>
PER.....	<i>Coeficiente de eficiência protéica</i>
NPR.....	<i>Razão protéica líquida</i>
DV.....	<i>Digestibilidade verdadeira</i>
EQ.....	<i>Escore químico</i>
PDCAAS.....	<i>Escore químico corrigido pela digestibilidade</i>
HDL-Colesterol.....	<i>Lipoproteínas de alta densidade</i>
LDH.....	<i>Lactato desidrogenase</i>
NADH.....	<i>Nicotinamida adenina dinucleótido</i>
MDH.....	<i>Malato desidrogenase</i>

RESUMO

MORAES, Érica Aguiar, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Atividade antioxidante, qualidade proteica e potencial funcional de genótipos de sorgo disponíveis à alimentação humana.** Orientadora: Hércia Stampini Duarte Martino. Co-Orientadores: Valéria Aparecida Vieira Queiroz, Sônia Machado Rocha Ribeiro, Ana Vlândia Moreira e Neuza Maria Brunoro Costa.

O aumento das doenças crônicas não transmissíveis, relacionadas à má nutrição, demanda a exploração de fontes alternativas para a aquisição de hábitos alimentares saudáveis. Neste contexto, o sorgo apresenta-se como uma possibilidade de consumo aos cereais convencionais em função da elevada concentração de compostos fenólicos como, por exemplo, os ácidos fenólicos, antocianinas, taninos além do conteúdo de fibra alimentar. No entanto, para a viabilização do consumo de cereais pelos humanos exige-se que a matéria-prima passe pela exposição a algum tipo de processamento térmico, o que pode resultar em alterações na biodisponibilidade de nutrientes e compostos bioativos. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antioxidante, a qualidade protéica e o potencial funcional de genótipos de sorgo submetidos a processamentos térmicos. Foram realizados três experimentos. No primeiro, avaliou-se a atividade antioxidante, a concentração de fenólicos totais, taninos condensados e fitato em farinhas (FSC) e pipocas (SP) de grãos de sorgo crus e farinhas de grãos submetidos ao tratamento térmico em estufa (150°C/ 30 min) (FSTT) de sete genótipos de sorgo. O tratamento térmico em estufa aumentou a concentração de fenólicos totais, porém manteve a atividade antioxidante e as concentrações de taninos e fitato. Por outro lado a pipoca favoreceu a redução da atividade antioxidante e dos taninos em relação à farinha dos grãos crus. No segundo experimento, avaliou-se a qualidade protéica *in vivo* de FSC e FSTT dos genótipos de sorgo BRS 305, BRS 309 e BRS 310, selecionados, a partir do primeiro experimento, em função da elevada atividade antioxidante e diferença de pigmentação do pericarpo. Não houve diferença para o coeficiente de eficiência alimentar entre os grupos experimentais ($p \geq 0,05$). A FSTT do genótipo BRS 309 apresentou valores de coeficiente de eficiência protéica e razão protéica líquida superiores aos da FSC desse mesmo genótipo, FSC e FSTT do BRS 305 ($p < 0,05$) e não diferiu das FSC e FSTT do genótipo BRS 310 ($p \geq 0,05$). Não foi observado

efeito do tratamento térmico sobre a digestibilidade verdadeira entre as FSC e FSTT dos três genótipos ($p \geq 0,05$). A lisina foi o primeiro aminoácido limitante dos três genótipos. O BRS 305 FSTT apresentou o menor valor de escore químico corrigido pela digestibilidade verdadeira ($p < 0,05$). O tratamento térmico melhorou a qualidade protéica do genótipo BRS 309, no entanto, para os demais genótipos não houve diferença. No terceiro experimento, foi avaliada a resposta à inflamação, ao estresse oxidativo, a morfologia intestinal e parâmetros bioquímicos em dietas hiperlipídicas adicionados farinhas de grãos dos três genótipos de sorgo em ratos wistar, adultos. Os animais foram alimentados durante 4 semanas com dieta AIN-93M, hiperlipídica controle (DHS) e hiperlipídica adicionadas de farinha dos grãos dos genótipos BRS 305 (DHS 305), BRS 309 (DHS 309) e BRS 310 (DHS 310). A atividade antioxidante e antocianinas totais não diferiram entre os genótipos de sorgo ($p \geq 0,05$). Entretanto, os fenólicos totais, taninos condensados, luteolinidina e apigeninidina foram maiores no genótipo BRS 305 ($p < 0,05$). O consumo do grupo AIN-93M foi maior que nos grupos DHC, DHS 305 e DHS 310 ($p < 0,05$). O consumo calórico, peso final, ganho de peso corpóreo, gordura epididimária e o coeficiente de eficiência alimentar não diferiram entre os grupos experimentais ($p \geq 0,05$), assim com as concentrações de glicose, colesterol total, HDL-colesterol, triglicerídeos, enzimas hepáticas e superóxido dismutase ($p \geq 0,05$). O grupo DHS 310 apresentou menores concentrações de malondialdeído e TNF- α ($p < 0,05$). A altura das vilosidades do DHC, DHS 305, DHS 309 e DHS 310 não diferiram ($p \geq 0,05$). Pode-se inferir que o genótipo BRS 310 possui uma composição química e nutricional favorável ao consumo humano, tendo em vista a manutenção da elevada atividade antioxidante frente à exposição ao tratamento térmico em estufa, os melhores indicadores de índices biológicos de qualidade protéica, manutenção da morfologia intestinal, além da redução da inflamação subclínica e do estresse oxidativo.

ABSTRACT

MORAES, Érica Aguiar, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2011. **Antioxidant activity, protein quality and functional potential of sorghum genotypes available for human consumption.** Adviser: Hércia Stampini Duarte Martino Co-Advisers: Valéria Aparecida Vieira Queiroz, Sônia Machado Rocha Ribeiro, Ana Vlândia Moreira and Neuza Maria Brunoro Costa.

The increase in chronic diseases related to malnutrition demands the exploitation of alternative sources in order to develop healthy eating habits. In this context, sorghum is an alternative of consumption to conventional cereals due to its high concentration of phenolic compounds, such as phenolic acids, anthocyanins and condensed tannins, besides its dietary fiber content. However, enabling the consumption of cereals by humans demands the exposure of these cereals to some kind of thermal processing, which may result in changes to the bioavailability of nutrients and bioactive compounds. The aim of this study was to evaluate the antioxidant activity, the protein quality and functional potential of sorghum genotypes exposed to different kinds of thermal processing and for this evaluation, three experiments were performed. In the first one, the antioxidant activity and the concentration of total phenolics, condensed tannins and phytate were evaluated in seven sorghum genotypes. These analyses were carried out in flour (RF) and popcorn (SP) from raw sorghum grains and in flour from grains subjected to heat treatment in oven (HTF) (105°C/30min.). Heat treatment in oven increased total phenolic content. The antioxidant activity and concentration of tannin and phytate were preserved. On the other hand, popped sorghum reduced antioxidant activity and the tannin content, compared to the raw sorghum flour. In the second experiment, the *in vivo* protein quality of flours from both raw sorghum grains (RF) and heat-treated sorghum grains (HTF) were evaluated in the BRS 305, BRS 309 and BRS 310 genotypes. These were selected due to the high antioxidant activity and the difference in the pericarp pigmentation shown in the first experiment. No difference was found for FER among the experimental groups ($p \geq 0.05$). Heat-treated flour from BRS 309 and BRS 310 genotypes had higher PER and NPR values, however, they did not differ from the values found in the raw grain flour of BRS 310 genotype ($p < 0.05$). Heat treatment effect was observed in the BRS 309 genotype. The heat treatment had no effect on true

digestibility (TD) between RF and HTF of the three genotypes ($p \geq 0.05$). Lysine was the first limiting amino acid of the three sorghum genotypes. The HTF BRS 305 showed the lowest protein digestibility-corrected amino acid score value ($p < 0.05$). The heat treatment improved the protein quality of genotype BRS 309; however, there was no difference for the other genotypes. In the third experiment, the study evaluated the effect of adding flour of sorghum genotypes to high-fat diets upon the oxidative stress, response to inflammation and intestinal morphology in male adults Wistar rats. The animals were fed AIN-93M diet, high-fat diet control (DHC) and high-fat diet added with sorghum BRS 305 (DHS 305), BRS 309 (DHS 309) and BRS 310 (DHS 310) for four weeks. The antioxidant activity and total anthocyanins did not differ among sorghum genotypes ($p \geq 0.05$). However, total phenolics, condensed tannins, luteolinidin and apigeninidin were higher in BRS 305 ($p < 0.05$). The food consumption in the AIN-93M group was higher than in the DHC, DHS 305 and DHS 310 groups ($p < 0.05$). The energy consumption, final weight, body weight gain, epididymal fat, and food efficiency ratio were similar between the experimental groups, as well as the concentrations of glucose, fructosamine, total cholesterol and HDL cholesterol, triglycerides, liver enzymes and superoxide dismutase ($p \geq 0.05$). The DHS 310 group showed lower levels of malondialdehyde and expression of TNF- α ($p < 0.05$). The intestinal villi height in the DHC, DHS 305, DHS 309 and DHS 310 groups did not differ ($p \geq 0.05$). We can infer that the BRS 310 genotype has a favorable chemical and nutritional composition for human consumption due to the preservation of high antioxidant activity with the exposure to heat treatment in an oven, the best biological indices of protein quality, the maintenance of intestinal morphology, besides the reduction in low-grade inflammation and oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO

O sorgo destaca-se como o quinto cereal de maior produção no mundo e o quarto no ranking de produção brasileira. Por sua versatilidade e facilidade de produção, o sorgo tem sido utilizado como base alimentar de milhões de pessoas, principalmente na África e na Ásia chegando a suprir cerca de 70% da ingestão calórica diária. Nos demais países, o cereal tem sido utilizado basicamente na alimentação animal, com potencial a ser explorado também na alimentação humana.

O aumento das doenças crônicas não transmissíveis, relacionadas à má nutrição, demanda a exploração de fontes alternativas para a aquisição de hábitos alimentares saudáveis. O hábito de consumir alimentos que contenham concentrações significativas de fitoquímicos e fibra alimentar é correlacionado com benefícios à saúde. O sorgo apresenta-se como uma possibilidade de consumo aos cereais convencionais em função da elevada concentração de compostos fenólicos como, por exemplo, os ácidos fenólicos, antocianinas, taninos além do conteúdo de fibra alimentar.

A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos, provenientes do sorgo, tem sido comprovada em diversos estudos *in vitro*, sendo que seu consumo pode estar associado à redução do risco de doenças como as cardiovasculares, diabetes, obesidade e câncer. Embora a capacidade antioxidante dos fenólicos do sorgo ainda não seja elucidada na literatura por modelos experimentais *in vivo*, o prejuízo na absorção de proteínas, carboidratos e minerais é largamente evidenciado, principalmente, pela ingestão de taninos.

Para a viabilização do consumo de cereais pelos humanos exige-se que a matéria-prima passe pela exposição a algum tipo de processamento térmico, o que pode resultar em alterações na biodisponibilidade de nutrientes e compostos bioativos. Estudos são, ainda, controversos sobre o efeito do tratamento térmico na concentração de fenólicos. Alguns trabalhos relataram a destruição de fenólicos antioxidantes em altas temperaturas (HAMAMA e NAWAR, 1991). Entretanto, aumento da concentração destes compostos foi relatado após exposição da matéria-prima ao tratamento térmico (DEWANTO, WU e LIU, 2002). Os estudos de digestibilidade protéica, no entanto, são mais

elucidados. Muitos estudos demonstraram que o processo de cocção úmida do sorgo compromete o aproveitamento deste nutriente devido à formação de proteínas oligoméricas unidas por ponte de dissulfeto (HAMAKER, KIRLEIS, MERTZ, *et al.*, 1986; DUODU, TANG, GRANT, *et al.*, 2001; CORREIA, NUNES, BARROS, *et al.*, 2010). Deste modo, a investigação de novos processamentos tecnológicos, com a finalidade de produzir produtos que preservem suas características funcionais, é essencial para a inserção deste cereal na alimentação humana.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante, a qualidade protéica e o potencial funcional de genótipos de sorgo submetidos a processamentos térmicos. A hipótese do trabalho baseia-se na premissa de que o sorgo, após ter sido submetido ao processamento térmico, melhora a sua qualidade nutricional e funcional, e ao ser acrescido a uma dieta hiperlipídica para o desenvolvimento da obesidade em ratos wistar, exerce ação modulatória sobre os parâmetros fisiológicos relacionados à inflamação subclínica e defesa antioxidante.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O sorgo

Os cereais têm despertado interesse de pesquisadores por relacionarem o aumento do consumo destes alimentos integrais com a redução da incidência de doenças crônicas não transmissíveis. Este benefício pode ser associado, em parte, ao teor de compostos bioativos presentes nestes alimentos, destacando-se os fitoquímicos e as fibras alimentares (FARRAR, HARTLE, HARGROVE, *et al.*, 2008).

Neste contexto, o sorgo apresenta-se como uma cultura alternativa ao consumo dos cereais de maior produção como o arroz, milho, trigo e cevada. O cultivo desse cereal tem maior expressão em regiões tropicais e subtropicais do mundo como Ásia, África, Oriente Médio e América Central (SANCHEZ, 2003), onde há deficiência hídrica, irregularidade de chuvas, calor excessivo ou baixa fertilidade do solo, onde plantações de trigo e milho não apresentam boa produtividade (SILVA, BARROS, SILVA, *et al.*, 2009; MOKRANE, AMOURA, BELHANECH-BENSEMRA, *et al.*, 2010).

Embora largamente utilizado na alimentação animal (ÍTAVO, MORAIS, ÍTAVO, *et al.*, 2009; MENEZES, SEGABINAZZI, BRONDANI, *et al.*, 2009), o sorgo é considerado alimento básico para milhões de pessoas no mundo, suprimindo cerca de 70% da ingestão calórica diária (SOUZA, DANTAS, SILVA, *et al.*, 2005; TAYLOR, SCHOBBER e BEAN, 2006). O sorgo é utilizado na elaboração de mingaus, bebidas alcoólicas e produtos de panificação (ANGLANI, 1998; SANCHEZ, 2003; MÉNDEZ-ALBORES, MARTÍNEZ-BUSTOS, VÉLES-MEDINA, *et al.*, 2009) apresentando, desta forma, um excelente potencial no processamento e desenvolvimento de novos produtos.

Conforme dados de produção do ano de 2007, a Food and Agriculture Organization (FAO) demonstrou, como maiores produtores do cereal, os Estados Unidos da América, Nigéria e Índia (FAOSTAT, 2007). Na América Latina, a produção do sorgo apresenta algumas vantagens em relação a outros cereais como, por exemplo, sua adaptação às condições agrícolas variadas, permitindo o seu cultivo tanto em climas úmidos quanto em climas áridos, além do baixo custo de produção (MARTÍNEZ e PAU, 1992; SANCHEZ, 2003). No Brasil, a cultura compreende uma alternativa de plantio para diversas regiões.

Na região Nordeste do Brasil como, por exemplo, o uso do sorgo na alimentação humana tem grandes potencialidades e pode contribuir consideravelmente para economia de divisas, com a diminuição da importação do trigo (SOUZA, DANTAS, SILVA, *et al.*, 2005). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o sorgo foi o quarto cereal mais produzido no País no ano de 2009. O cereal obteve uma produção de 1.840.819 toneladas e rendimento médio de 2.338 kg.ha⁻¹, ficando atrás apenas da cultura do milho, arroz e trigo (IBGE., 2010).

2.2. Composição química do sorgo

Os carboidratos correspondem ao principal macronutriente do sorgo com, aproximadamente, 74,6% do cereal (USDA., 2010). O carboidrato deste cereal está presente, principalmente, na forma de amido, que corresponde ao polissacarídeo de reserva das plantas. Em trabalho sobre as propriedades físico-químicas e tecnológicas do amido de dois cultivares de sorgo, encontrou-se para o cultivar branco um teor de 66,8% e para o cultivar vermelho de 65,3%. Evidenciou-se, também, significativa diferença na concentração de amilose e amilopectina entre os cultivares. A concentração de amilose e amilopectina foi de 27,1% e 72,9%, respectivamente, observado no cultivar de coloração branca e de 24,8% e 75,2% no cultivar vermelho, destacando-se a influência genética e do ambiente no teor e qualidade deste nutriente (BOUDRIES, BELHANECHÉ, NADJEMI, *et al.*, 2009). Dos carboidratos do sorgo, o teor de fibra alimentar compreende aproximadamente 6,3% (USDA., 2010).

Os lipídios correspondem a cerca de 3% do cereal (USDA., 2010). Mehmood, Orhan, Ahsan, *et al.* (2008), identificaram teor de lipídio em 10 cultivares de 5% a 8,4%. A maioria dos cultivares apresentou maior teor de ácidos graxos poliinsaturados do que monoinsaturados. As concentrações dos principais ácidos graxos variaram de 31,1 a 48,9% para o ácido oléico; 0,4 a 0,6% de palmitoléico; 27,6 a 50,7% de linoléico; 1,7 a 3,9% de linolênico; 1,0 a 2,6% de esteárico e 11,7 a 20,2% de palmítico.

O teor de proteínas do sorgo corresponde a 11,3% (USDA., 2010), no entanto, este teor e o perfil de aminoácidos podem variar largamente em

função da característica genética e do local de plantio. Proteínas do sorgo são deficientes em arginina, lisina, glicina, tirosina e metionina. Este desequilíbrio de aminoácidos pode ocasionar efeitos negativos no aproveitamento da proteína (MACLEAN, ROMAÑA, PLACKO, *et al.*, 1981).

A baixa qualidade protéica do sorgo, também, pode ser associada aos compostos fenólicos como, por exemplo, os taninos. Estes compostos complexam-se com as proteínas impedindo sua digestão e subsequente, absorção (DYKES e ROONEY, 2006). No entanto, outros componentes do cereal, também são associados ao baixo aproveitamento das proteínas. Estudos demonstraram que as kafirinas, principal proteína de reserva, tornam-se menos solúveis e indigeríveis com a cocção úmida, em função da formação de ligações de dissulfeto (HAMAKER, KIRLEIS, MERTZ, *et al.*, 1986).

O grão de sorgo também pode ser considerado uma boa fonte de vitaminas lipossolúveis e do complexo B como tiamina, riboflavina e piridoxina. O cereal é fonte de minerais como o fósforo, o potássio e o zinco (DICKO, GRUPPEN, TRAORÉ, *et al.*, 2006). Tomaz, Queiroz, Martino, *et al.* (2009) relataram concentrações de minerais em mg.100g⁻¹ de fósforo, variando entre 135 a 250, de zinco entre 1,3 a 2,7, de magnésio entre 65,7 a 147,8, de enxofre entre 66,9 a 100,9 e de cobre entre 0,29 a 1,00.

A composição química do sorgo é semelhante à do milho e trigo, e as tecnologias de processamento para a obtenção de produtos alimentícios desses cereais são aplicáveis ao sorgo com a finalidade de explorar seu potencial como matéria-prima para a elaboração de diversos produtos de panificação, incluindo produtos sem glúten destinados aos portadores de doença celíaca (MARTÍNEZ e PAU, 1992; NEUMANN, RESTLE e BRONDANI, 2004; DICKO, GRUPPEN, TRAORÉ, *et al.*, 2006; CIACCI, MAIURI, CAPORASO, *et al.*, 2007; SOUZA, SANTOS, SANTANA, *et al.*, 2009).

2.3. Fenólicos do sorgo

O sorgo destaca-se no meio científico por apresentar concentração significativa de compostos fenólicos. Estes correspondem a produtos secundários do metabolismo das plantas ou integram os componentes celulares. O conteúdo de fitoquímicos no sorgo tem despertado interesse de profissionais de diversas áreas da saúde por exercerem atividade antioxidante

no organismo, contribuindo, assim, para a prevenção de doenças crônicas não transmissíveis como as cardiovasculares, diabetes, obesidade e câncer (AWIKA e ROONEY, 2004; BRALLEY, GREENSPAN, HARGROVE, *et al.*, 2008; FARRAR, HARTLE, HARGROVE, *et al.*, 2008; DYKES, SEITZ, ROONEY, *et al.*, 2009).

Os principais fenólicos, normalmente, encontrados em cultivares de sorgo compreendem os derivados do ácido hidrobenzóico e do ácido hidrocínamico; e os flavonóides, que englobam as antocianinas e os taninos (AWIKA e ROONEY, 2004).

O ácido fenólico hidrobenzóico é derivado do ácido benzóico que incluem o ácido gálico, *p*-hidroxibenzóico, vanílico, siringico e o ácido protocatequínico entre outros. O ácido hidroxicínamico possui uma estrutura C6-C3 e incluem o ácido cumárico, caféico, felúrico e sinápico. Estes ácidos fenólicos presentes no sorgo auxiliam as plantas na defesa contra pragas e fitopatógenos. Entretanto, estes compostos também apresentam elevada atividade antioxidante *in vitro* e podem contribuir significativamente com benefícios à saúde associado ao consumo do grão integral (KAMATH, CHANDRASHEKAR e RAJINI, 2004). No sorgo, as concentrações de ácidos fenólicos não são correlacionadas com a presença de outros compostos fenólicos como antocianinas e taninos. Geralmente, os níveis de ácidos fenólicos do sorgo são compatíveis com os demais cereais (AWIKA e ROONEY, 2004).

Dentre os flavonóides, a antocianina mais comumente encontrada em cultivares de sorgo é denominada de 3-deoxiantocianina, que compreendem as luteolinidinas e apigeninidinas. Estas antocianinas possuem baixa distribuição na natureza (CLIFFORD, 2000), apresentando-se distinta das demais antocianinas, devido à inexistência de uma molécula de oxigênio na posição C-3 (MAZZA e BROUILLARD, 1987). Esta conformação da molécula de antocianina atribui maior estabilidade quando comparada a outras antocianinas encontradas nas frutas e hortaliças (AWIKA, ROONEY e WANISKA, 2004b; AWIKA, 2008; DYKES, SEITZ, ROONEY, *et al.*, 2009).

O sorgo é a única fonte de 3-deoxiantocianina, no qual, está presente em grandes quantidades em alguns cultivares (SHIH, SIU, NG, *et al.*, 2006). Awika e Rooney (2004a) compararam o teor de antocianinas de cultivares de sorgo negro com as fontes atualmente disponíveis deste pigmento. Foi

quantificado que os cultivares de sorgo apresentaram concentrações de 4,0 a 9,8 mg.g⁻¹ enquanto, os demais alimentos, apresentaram concentrações entre 0,2 a 10mg.g⁻¹. Este fato possibilita a exploração comercial da antocianina do sorgo como fonte de corante natural para alimentos. Foi observado ainda, que, existe boa correlação entre os teores de antocianinas e a atividade antioxidante das amostras de sorgo, confirmando a maior contribuição das antocianinas para a atividade antioxidante.

Dykes, Seitz, Rooney *et al.* (2009) demonstraram o efeito do genótipo sobre a composição dos flavonóides de cultivares de sorgo. Foi verificado que os genótipos com coloração secundária de planta vermelha apresentaram maior proporção de apigeninidina, indicando que a coloração secundária da planta afetou a composição das 3-deoxiantocianinas. No entanto, as concentrações mais elevadas de 3-deoxiantocianinas foram encontrados nos genótipos de pericarpo negro. Sorgo com pericarpo vermelho e coloração secundária de planta palha obtiveram os maiores níveis de flavonas. As concentrações de flavanonas foram detectadas em todos os genótipos com pericarpo vermelho, e a coloração secundária de planta não afetou os níveis destes compostos.

O outro importante flavonóide do sorgo é o tanino do tipo condensado, conhecido como proantocianinas ou procianidinas. Ácidos tânico hidrolisáveis não foram identificados em cultivares de sorgo (DYKES e ROONEY, 2006). Estes compostos estão presentes em diversas bebidas como vinho tinto, cerveja, café, chá preto, chá verde e em muitos outros alimentos como banana, pêra, lentilhas, chocolates e também no sorgo (CHUNG, WONG, WEI, *et al.*, 1998). Compostos fenólicos são, conhecidamente, responsáveis pelo sabor amargo e adstringente de alguns alimentos (DREWNOWSKI e GOMEZ-CARNEROS, 2000). Kobue-Lekalake, Taylor e Kock (2007), em estudo sobre as propriedades sensoriais de cultivares de sorgo, verificaram que tanto os cultivares com tanino, quanto os sem tanino apresentaram sabor amargo e adstringência, embora estas características fossem mais perceptíveis nos cultivares com tanino.

Além das características sensoriais desagradáveis, os taninos podem, ainda, se ligar as moléculas protéicas e quelar minerais, dificultando a ação das enzimas e, por fim, reduzir a taxa de digestão de proteínas (DYKES e ROONEY, 2006). Como resultado, o tanino presente no sorgo reduz o valor

nutricional e calórico dos alimentos, diminui o consumo de ração por animais e leva a uma baixa eficiência alimentar (JAMBUNATHAN e MERTZ, 1973; AL-MAMARY, MOLHAM, ABDULWALI, *et al.*, 2001; RESTLE, FATURI, ALVES FILHO, *et al.*, 2004).

A concentração de taninos nos cultivares de sorgo variam largamente em função das características genéticas. Genótipos de sorgo que possuem a testa pigmentada apresentam taninos assim como maiores concentrações de fenólicos totais e, subsequentemente, maior atividade antioxidante (DLAMINI, TAYLOR e ROONEY, 2007). Dilamini, Taylor e Rooney (2007) demonstraram que o teor de taninos de três cultivares de sorgo com testa pigmentada variaram entre 33,6 a 49,1 mg equivalentes de catequina por grama, enquanto nos cultivares sem esta camada não foi possível a detecção deste fenólico (DYKES, ROONEY, WANISKA, *et al.*, 2005).

Numerosos genes controlam o tipo e quantidade de fenólicos do sorgo que variam de acordo com o cultivar (AWIKA e ROONEY, 2004; DYKES e ROONEY, 2006). A testa pigmentada, a qual determina a presença dos taninos, é controlado por ambos os genes dominantes, B₁ e B₂. A coloração do pericarpo, por exemplo, é controlada pelos genes R e Y. O cultivar apresenta pericarpo branco quando Y é homozigoto recessivo (rryy ou R_yy), a coloração amarelada ocorre na presença do gene R homozigoto recessivo e Y como homozigoto dominante (rrYY). Quando ambos os genes são dominantes (R_Y_), o pericarpo é vermelho. Alguns genótipos vermelhos podem se tornar negros em função da maturação em presença de luz solar (DYKES, ROONEY, WANISKA, *et al.*, 2005). Dykes, Seitz, Rooney, *et al.* (2009) sugerem a necessidade de uma nova classificação, em termos de pericarpo, para os cultivares negros, pois, embora possuam genes para pericarpo vermelho, produzem quantidades elevadas de 3-deoxiantocianina, diferentemente dos cultivares típicos.

A coloração da planta do sorgo é controlada pelos genes P e Q que produzem plantas de coloração palha, vermelho e púrpura. Plantas com gene P dominante são de cor púrpura (PPQQ) ou vermelha (PPqq), enquanto o gene p recessivo (ppqq ou ppQQ) é para coloração palha (DYKES, SEITZ, ROONEY, *et al.*, 2009). Dykes, Rooney, Waniska, *et al.* (2005) relataram que cultivares com coloração de planta púrpura ou vermelho possuíam maiores teores de fenólicos do que a planta palha.

A espessura do pericarpo é controlada pelo gene Z. O pericarpo é espesso quando o mesmo apresenta gene homozigoto recessivo (zz) e delgado quando o gene é dominante (Z_) (DYKES e ROONEY, 2006). Em estudo, sobre variabilidade genética e compostos fenólicos de cultivares de sorgo, foi demonstrado que cultivares que apresentavam coloração secundária de planta púrpura ou vermelha, pericarpo espesso de coloração negra ou vermelha e que possuíam a testa pigmentada apresentaram elevados concentrações de fenólicos e maior atividade antioxidante quando comparados com cultivares de outros genótipo (DYKES, ROONEY, WANISKA, *et al.*, 2005).

2.4. Atividade antioxidante do sorgo

Alguns estudos demonstraram que em comparação com o sorgo, outros cereais como, por exemplo, aveia, arroz e trigo, possuem menores concentrações de compostos fenólicos e de baixa atividade antioxidante (FARRAR, HARTLE, HARGROVE, *et al.*, 2008).

Diversos estudos *in vitro* têm sido conduzidos com a finalidade de relatarem a atividade antioxidante do sorgo (KAMATH, CHANDRASHEKAR e RAJINI, 2004; AWIKA, MCDONOUGH e ROONEY, 2005; AWIKA, YANG, BROWNING, *et al.*, 2009). Dlamini, Taylor e Rooney (2007) demonstraram correlação entre a atividade antioxidante de cultivares de sorgo com a presença de fenólicos totais e, também, de taninos, ou seja, cultivares que possuíam taninos apresentaram maior atividade antioxidante. Esta atividade dos taninos deve-se a proximidade de muitos anéis aromáticos e grupos hidroxila que impedem que este fenólico haja como pró-oxidante (HAGERMAN, RIEDL, JONES, *et al.*, 1998; AWIKA e ROONEY, 2004). Entretanto, uma preocupação é que taninos possam não ser eficazes biologicamente, em função do tamanho de sua molécula e sua tendência de se ligarem às moléculas dos alimentos formando compostos insolúveis (AWIKA e ROONEY, 2004). Contudo, Riedl e Hagerman (2001), demonstraram que mesmo complexados com proteínas, os taninos ainda possuíam pelo menos 50% de sua capacidade antioxidante.

Gülçin, Huyut, Elmastas, *et al.* (2010) demonstraram elevada e efetiva atividade antioxidante dos taninos, sugerindo, ainda, a utilização deste

composto para minimizar ou prevenir a oxidação lipídica em produtos alimentares, mantendo a qualidade nutricional, prolongando a vida de prateleira de alimentos, assim como componente nutracêutico da alimentação.

As antocianinas, também, contribuem de forma significativa para a atividade antioxidante apresentada pelos cultivares de sorgo. Estudo em cultivares de sorgo negro evidenciou uma elevada concentração de antocianinas, no qual, cerca de 50% deste composto correspondiam a luteolinidinas e apigeninidinas. Ressaltou-se, também, que os farelos destes cultivares apresentaram alta atividade antioxidante que variaram de 52 a 400 μmol equivalente de trolox por grama de amostra comparada a outros cereais, podendo oferecer benefícios à saúde humana quando incorporados aos alimentos (AWIKA, ROONEY e WANISKA, 2004a).

Embora diversos estudos *in vitro* sobre a atividade antioxidante do sorgo apresentem semelhança dos resultados, ressaltasse que são escassos os estudos na literatura desta atividade em modelos experimentais *in vivo*.

2.5. Potencial funcional do sorgo

2.5.1. Estresse oxidativo e inflamação

A instauração do processo de estresse oxidativo ocorre devido ao desequilíbrio entre o sistema oxidativo e os mecanismos antioxidantes, ou seja, entre a produção e remoção dos radicais livres como espécies reativas ao oxigênio e ao nitrogênio. Os radicais livres são naturalmente produzidos pelo metabolismo celular e possuem importante papel na sinalização celular, especialmente, no sistema imunológico. No entanto, elevados níveis de radicais livres levam a oxidação de biomoléculas com a consequente perda da função biológica (BARBOSA, BRESSAN, ZULET, *et al.*, 2008; BARBOSA, COSTA, ALFENAS, *et al.*, 2010).

O dano celular causado pelo desequilíbrio entre o sistema oxidativo e antioxidante pode levar a um estado pró-inflamatório (GILL, TSUNG e BILLIAR, 2010). Moléculas oxidantes regulam a produção de citocinas por meio da ativação de fatores transcrição nuclear NF- κ B. Estes fatores aumentam a transcrição de mRNA do Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6). Estas citocinas, pró-inflamatórias, são consideradas

mediadores do processo de inflamação que estimulam a síntese de outras citocinas como, por exemplo, a interleucina-8 (IL-8), a qual está relacionada a diversas doenças inflamatórias (GRIMBLE, 1998; GION, TAKETOMI, SHIRABE, *et al.*, 2010).

A produção, crônica e excessiva, dos radicais livres pode ser crucial no desenvolvimento de DCNT como, por exemplo, a obesidade, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, o diabetes e o câncer (LEE, PARK, ZUIDEMA, *et al.*, 2011), sendo que estas doenças são fortemente associadas ao processo de inflamação crônica (HOTAMISLIGIL, 2006).

Entretanto, os mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, podem auxiliar na defesa do organismo impedindo a formação de radicais livres, inibindo a ação dos mesmos ou favorecendo a recuperação e reconstituição das estruturas biológicas lesadas (LEE, PARK, ZUIDEMA, *et al.*, 2011). O sistema imunológico, também, conta com um mecanismo de proteção contra o processo inflamatório. A interleucina-10 (IL-10), por exemplo, é o principal inibidor da síntese das citocinas pró-inflamatórias e supressora da função dos macrófagos (ESPOSITO, NAPPO, GIUGLIANO, *et al.*, 2003).

O mecanismo enzimático de defesa antioxidante inclui a produção das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutational peroxidase (GPx) (YEH, CHING e YEN, 2009). O sistema não enzimático abrange, especialmente, os antioxidantes de origem dietética, dentre os quais se destacam as vitaminas, os minerais e os compostos fenólicos (BARBOSA, COSTA, ALFENAS, *et al.*, 2010). Padrões dietéticos com elevado consumo de carboidratos refinados, gorduras trans e saturadas, e pobres em antioxidantes e fibra alimentar provenientes de frutas, hortaliças e cereais integrais podem causar a ativação do sistema imunológico, provavelmente por uma produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias associadas à redução da produção de citocinas anti-inflamatórias (GIUGLIANO, CERIELLO e ESPOSITO, 2006).

Neste contexto, Fardet, Rock e Rémésy (2008), destacam forte evidência entre o consumo de cereais integrais e a proteção contra DCNT. Este efeito pode ser relacionado à concentração de fibra alimentar e dos micronutrientes na camada externa do grão e do interior do germe, agindo em conjunto para combater o estresse oxidativo e a inflamação. Estes autores destacaram que uma alimentação rica em sorgo pode prevenir doenças as quais sejam relacionados à produção de radicais livres, em função do teor de

polifenóis, taninos, antocianinas e capacidade antioxidante do cereal (FARDET, ROCK e RÉMÉSY, 2008).

2.5.2. Dislipidemias e doenças cardiovasculares

Poucos estudos relatam os efeitos da adição do sorgo sobre as doenças cardiovasculares. No entanto, Klopfenstein, Varriano-Marston e Hosney (1981) demonstraram redução das concentrações plasmáticas de colesterol em porcos da Índia alimentados com adição de 58% de sorgo com baixo teor de taninos, ressaltando, ainda, que este efeito foi maior que o encontrado nas dietas a base de outros cereais como trigo integral, aveia e milho. Uma possível explicação para a ocorrência deste efeito sobre os níveis plasmáticos de colesterol é devido à capacidade das fibras alimentares reduzirem a absorção de colesterol e reabsorção dos ácidos biliares no lúmen intestinal (ERKKILA e LICHTENSTEIN, 2006). A fermentação das fibras no intestino resulta na produção de ácidos graxos de cadeia curta como, por exemplo, acetato, propionato e butirato. Estes ácidos são absorvidos no cólon e, principalmente o propionato, inibe a síntese hepática de colesterol (WONG, SOUZA, KENDALL, *et al.*, 2006).

Carr, Weller, Schlegel, *et al.* (2005) propuseram outro mecanismo para o benefício do sorgo nas doenças cardiovasculares, concentrando seus estudos na extração lipídica do cereal. Camundongos foram alimentados durante um período de quatro semanas com dietas AIN- 93M suplementadas com 0,5; 1,0 e 5,0% de lipídios extraídos do sorgo. O estudo demonstrou redução significativa, dose-dependente, nas concentrações plasmáticas de colesterol não HDL, lipídios hepáticos e manutenção da concentração de HDL-colesterol. Os autores afirmaram que a redução nos níveis de colesterol não HDL ocorreu, provavelmente, em função da concentração de fitoesteróis e policosanóis no extrato lipídico, confirmados por meio das metodologias de cromatografia de camada delgada e gás líquido, destacando a capacidade destes compostos de reduzirem a inflamação, a oxidação da HDL, melhorar a função endotelial e inibir a agregação plaquetária, fatores que auxiliam no tratamento e prevenção das doenças cardíacas.

2.5.3. Diabetes mellitus

Cultivares de sorgo com tanino são digeridos lentamente pelo organismo. Algumas tribos da África consomem preferencialmente, sorgo com tanino por contribuir para um maior período de saciedade e plenitude gástrica em comparação com outros cereais (AWIKA e ROONEY, 2004). Esta característica pode ser potencialmente, aplicada a alimentos destinados à pacientes portadores de diabetes (DYKES e ROONEY, 2006) no qual, o retardo do esvaziamento gástrico permite mais lenta absorção de glicose.

O sorgo integral como um alimento rico em fibra alimentar, pode contribuir para ingestão de amido resistente, tendo em vista as vantagens fisiológicas desse nutriente sobre a resposta glicêmica. Niba e Hoffman (2003) encontraram teor de $6,46\text{g}.100\text{g}^{-1}$ de amido resistente em um cultivar de sorgo. Sendo que esta concentração pode aumentar até $10,1\text{g}.100\text{g}^{-1}$ com a imersão dos grãos em água a 37°C . Este é um teor significativo tendo em vista que grãos especialmente desenvolvidos como o milho com alto teor de amido resistente contêm $16,5\text{g}.100\text{g}^{-1}$ (FERGUSON, TASMAN-JONES, ENGLYST, *et al.*, 2000).

Lakshmi e Vimala (1996) demonstraram que a ingestão de receitas típicas indianas, por indivíduos diabéticos, acrescidas de sorgo integral, proporcionou redução dos níveis séricos de glicose quando comparadas a ingestão das receitas padrão ou com sorgo decorticado. Os autores relacionaram a redução do pico de glicemia com o maior conteúdo de fibra alimentar das receitas a base de sorgo integral, em função do prolongamento de esvaziamento gástrico, reduzindo a taxa de digestão e utilização dos carboidratos.

2.5.4. Obesidade

A incorporação do sorgo na alimentação humana pode, também, servir de estratégia para o controle da obesidade (AWIKA e ROONEY, 2004). Estudos conduzidos em ratos (JAMBUNATHAN e MERTZ, 1973) e porcos (AL-MAMARY, MOLHAM, ABDULWALI, *et al.*, 2001) demonstraram menor ganho de peso dos animais alimentados com dietas a base de sorgo que continham elevados teores de tanino. Maclean, Romaña, Placko *et al.* (1981) em estudo sobre a qualidade protéica do sorgo em crianças de idade pré-escolar verificaram que o ganho de peso durante o período de consumo do sorgo foi de

1,0g.kg⁻¹ de peso dia, enquanto o grupo controle de caseína obteve ganho de peso de 4,9g.kg⁻¹ de peso dia. Desta forma, o sorgo foi associado a um drástico retardo no ganho de peso em crianças. O mecanismo pelo qual o sorgo pode ser associado ao menor ganho de peso deve-se a formação de complexos insolúveis de tanino com as proteínas (DUODU, NUNES, DELGADILLO, *et al.*, 2002; ALI, EL TINAY, ELKHALIFA, *et al.*, 2009).

2.5.5. Câncer

Propriedades anti-carcinogênicas também estão sendo atribuídas a alguns nutrientes constituintes do sorgo. Estudo *in vitro* demonstrou que o sorgo de pericarpo negro induziu enzimas detoxificantes e, aqueles com teores mais elevados de taninos, inibiram a proliferação de células de câncer de esôfago e cólon. Os extratos de sorgo apresentaram forte potencial quimopreventivo, independente da sua atividade antioxidante (AWIKA, YANG, BROWNING, *et al.*, 2009).

Turner, Diaz, Taddeo *et al.* (2006) demonstraram redução de câncer de colón em ratos alimentados com cultivares de sorgo negro com tanino. Foi relatado que ratos alimentados com este tipo de sorgo apresentaram menores alterações nas criptas intestinais quando comparado com ratos alimentados com celulose ou sorgo branco. Esta redução foi atribuída à atividade antioxidante desse cultivar de sorgo.

Em estudo *in vitro* de cultura de células, com extrato de cultivares de sorgo negro, vermelho e branco contendo 3-deoxiantocianina, verificou-se que os extratos do sorgo negro foram mais eficientes ao induzirem a atividade da enzima de fase II por meio do ensaio NAD(P)H: quinase oxidoreductase, na inibição do crescimento de células humana de câncer de colón. A atividade da enzima de fase II é um indicador de proteção de células animais contra carcinogênese (YANG, BROWNING e AWIKA, 2009).

Gómez-Cordovés, Bartolomeé, Vieira *et al.* (2001) analisaram o efeito dos taninos condensados extraídos de cultivar de sorgo sobre melanogênese das células normais e crescimento de células de melanoma humano. Os taninos do sorgo aumentaram a atividade melanogênica, no entanto, não houve modificação na concentração de melanina total. Ademais, a incubação de células de melanoma humano com este fenólico reduziu a formação de

colônias. Estes resultados sugerem potencial efeito terapêutico destes compostos em auxiliar no tratamento de melanoma humano. No entanto, ainda são necessárias pesquisas que possam determinar quais componentes deste cereal são responsáveis por estes benefícios.

2.6. Tecnologias de processamento do sorgo

Embora a concentração de compostos fenólicos do sorgo seja determinada por fatores genéticos, métodos de processamento da matéria-prima podem alterar essas concentrações. Estudos são, ainda, controversos sobre o efeito do tratamento térmico sobre a concentração de fenólicos nas matérias-primas. Hamama e Nawar (1991) relataram a destruição de fenólicos antioxidantes em altas temperaturas. Entretanto, aumentos das concentrações destes compostos foram relatados com a exposição da matéria-prima após tratamento térmico (DEWANTO, WU e LIU, 2002).

Processamentos como a extrusão e o preparo de mingau fermentado ou não fermentado, utilizando-se grão de sorgo, geralmente, reduzem os compostos fenólicos e a atividade antioxidante apresentada por este cereal. A redução desta atividade pelo processamento do sorgo com tanino pode ser atribuída à forte interação dos taninos com as prolaminas. A desnaturação protéica gerada pelo processo de cocção abre as estruturas protéicas no qual facilitam a interação entre as mesmas e os taninos (DLAMINI, TAYLOR e ROONEY, 2007).

O efeito do processamento térmico sobre a estabilidade antioxidante de cultivar de sorgo marrom foi demonstrado na elaboração de produtos de panificação. Pães e biscoitos preparados com farelo deste cultivar mantiveram 60 e 78%, respectivamente, da atividade antioxidante inicial do farelo após o tratamento. Além disso, o produto extrusado de cultivar com tanino manteve 21% do teor deste fenólico, e 89% de sua atividade antioxidante. Este fato ressalta que, processamentos podem alterar a estrutura do tanino sem prejudicar o potencial antioxidante (AWIKA, 2003).

Compostos fenólicos podem ser encontrados no sorgo na forma livre ou em associação com outros componentes como, por exemplo, os aminoácidos e carboidratos (DYKES e ROONEY, 2006). Segundo Dewanto,

Wu e Lius (2002) o processamento térmico pode liberar estes compostos fenólicos associados, com o rompimento dos constituintes celulares. Embora a destruição das paredes celulares libere, na maioria das vezes, enzimas oxidativas e hidrolíticas que degradam os antioxidantes, o processamento térmico pode desativar essas enzimas, evitando-se assim, a perda dos compostos fenólicos.

Dlamini, Taylor, Rooney (2007) demonstraram que a decorticação reduz a atividade antioxidante de cultivares com e sem tanino em cerca de 83% devido a remoção do pericarpo e da testa, onde concentram-se os fenólicos. Redução em até 95% no teor de fenólicos totais de sorgo decorticado foi relatada por Martínez e Pau (1992). Mesmo que a decorticação reduza os fenólicos e as fibras alimentares do sorgo, este processo melhora suas características sensoriais como adstringência e, também, a digestibilidade (DLAMINI, TAYLOR e ROONEY, 2007). No entanto, esta fração retirada do grão de sorgo pode ser utilizada como ingrediente em diversas preparações funcionais e conferir desejáveis atributos sem afetar as outras propriedades sensoriais em alimentos como biscoito, pão e salgadinhos extrusados (MITRE-DIESTE, GORDON, AWIKA, *et al.*, 2000; ACOSTA, BARRON, RIAZ, *et al.*, 2003).

Além dos processamentos afetarem o conteúdo fenólico e atividade antioxidante do sorgo, eles podem, ainda, alterar a qualidade protéica deste cereal. O cozimento de sorgo para a elaboração de mingau é o processamento mais comumente utilizado em países da África e Ásia (DUODU, TAYLOR, BELTON, *et al.*, 2003). No entanto, estudos *in vitro* demonstraram que o cozimento do sorgo faz com que sua digestibilidade seja menor quando comparada a de outros cereais (MERTZ, HASSEN, CAIRNS-WHITTERN, *et al.*, 1984; HAMAKER, KIRLEIS, MERTZ, *et al.*, 1986). Os resultados de estudos *in vitro* foram confirmados *in vivo* (MACLEAN, ROMANA, PLACKO, *et al.*, 1981).

A explicação mais aceita para a qualidade protéica inferior deste cereal cozido é em função da polimerização das proteínas de reserva do sorgo, kafirinas e prolaminas, por meio da ligação de dissulfeto (HAMAKER, KIRLEIS, MERTZ, *et al.*, 1986; DUODU, NUNES, DELGADILLO, *et al.*, 2002) que também, ocasionam mudanças na estrutura secundária da proteína, da forma α -helicoidal para β -laminar (EMMAMBUX e TAYLOR, 2009).

Ali, El Tinay, Elkhalfa *et al.* (2009), propuseram um pré-tratamento com hidróxido de sódio a concentrações de 0,05; 0,1 e 0,2% em imersão de água durante oito horas, seguindo para cocção em água em ebulição por 20 minutos. A imersão em 0,2% combinada com a cocção reduziu o teor de taninos em 84% e gerou um aumento nas frações de albumina e globulina, acompanhada de redução significativa da glutelina. Os autores inferiram que este reajuste nas frações protéicas poderia ocasionar melhora na qualidade de proteínas do sorgo.

Os efeitos de diferentes tipos de processamento foram estudados sobre a digestibilidade *in vitro* das proteínas do sorgo. O cozimento em ebulição foi, mais uma vez, responsável pela redução da digestibilidade. A aplicação de calor seco reduziu em apenas 4%, e não afetou a extração das proteínas. A pipoca não alterou a digestibilidade das proteínas. No entanto, a fermentação e a germinação promoveram aumento em 39,6 e 20,8%, respectivamente. Desta forma, verificou-se que o calor seco manteve a digestibilidade como nas amostras não processadas e, a utilização da água de cocção reduz a qualidade protéica do cereal (CORREIA, NUNES, BARROS, *et al.*, 2010).

2.7. Conclusão

O sorgo apresenta-se como uma cultura alternativa ao consumo dos cereais convencionais. A concentração de fibra alimentar, a quantidade e a qualidade dos compostos fenólicos permitem relacionar o consumo do sorgo à redução dos riscos de doenças como a obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares e câncer. O processamento viabiliza o consumo de cereais pelos humanos. Entretanto, a aplicação de térmico úmido ou seco, a decorticação e elaboração de produtos de panificação reduzem a concentração de fenólicos totais e a atividade antioxidante do sorgo. Além disso, a qualidade proteica do sorgo é largamente prejudicada pela cocção úmida devido à formação de pontes de dissulfeto em suas proteínas de reserva. No entanto, a digestibilidade não foi alterada significativamente com o calor seco e aumentou com a germinação e fermentação dos grãos. Estudos que avaliem e desenvolvam processamentos capazes de manter as características

nutricionais são imprescindíveis para o incentivo da inserção do sorgo na alimentação humana.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antioxidante, a qualidade protéica e o potencial funcional de genótipos de sorgo submetidos a processamentos térmicos.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Elaborar farinha e pipoca a partir de grãos de genótipos de sorgo crus e farinha dos grãos submetidos ao tratamento térmico.
- ✓ Determinar a composição química, capacidade antioxidante e qualidade protéica das farinhas dos genótipos de sorgo.
- ✓ Avaliar o efeito da adição dos genótipos de sorgo em dietas experimentais obesogênicas sobre o perfil de lipídios e glicemia séricos em ratos wistar.
- ✓ Avaliar o efeito da adição dos genótipos de sorgo em dietas experimentais em parâmetros antioxidantes, anti-inflamatórios e sobre a morfologia intestinal de ratos Wistar adultos.

4. METODOLOGIA GERAL

O presente estudo foi desenvolvido nos laboratórios de Desenvolvimento de Novos Produtos e Análise Sensorial, Análise de Alimentos, Bioquímica Nutricional, Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde, Laboratório de Biologia de Peixes, do Departamento de Veterinária e Laboratório de Imunologia, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Viçosa.

4.1. Aquisição e elaboração das farinhas e pipocas de genótipos de sorgo

Foram analisados sete genótipos de sorgo desenvolvidos e fornecidos pela Embrapa Milho e Sorgo - Sete Lagoas – MG, Brasil: CMSXS 136, BRS 309 e BR 501 grãos de pericarpo branco; BR 506 grãos de pericarpo cinza; BR 700 grãos de pericarpo marrom; BRS 305 grãos de pericarpo marrom claro e BRS 310 grãos de pericarpo vermelho. O cultivo dos genótipos de sorgo foi conduzido utilizando espaçamento de 0,70 m entre fileiras, densidade média de 140.000 plantas por hectare. A adubação do plantio foi de 350 kg.ha⁻¹ da fórmula 08-28-16 + 0.5% Zn. A adubação de cobertura foi 100 kg.ha⁻¹ de uréia aplicada aos 40 dias após a germinação. O plantio foi efetuado em Sete Lagoas, MG, Brasil, em fevereiro de 2009.

Os grãos de sorgo foram selecionados manualmente e submetidos à peneiragem, para remoção de sujidades e impurezas. Para obtenção das farinhas submetidas ao tratamento térmico, os grãos dos três genótipos foram expostos a temperatura de 105°C em estufa com circulação de ar (Nova Ética®, modelo 400/6ND, Vargem Grande Paulista, São Paulo), segundo proposto por Souza, Dantas, Silva *et al.* (2005), com modificação do tempo de exposição para 30 minutos. Em seguida, os grãos crus e os submetidos ao tratamento térmico foram moídos com pericarpo, em moinho de facas (C.W. Brasender®, Dusburg, Alemanha), para a obtenção das farinhas com granulometria de 850 µm.

Para obtenção da pipoca foram pesados 20 g de grãos de cada genótipo de sorgo e submetidos a um processo de extrusão doméstica. A extrusão foi realizada em panela de aço inoxidável aquecida em fogão

doméstico em chama direta até a extrusão dos grãos, por aproximadamente 2 minutos. Para as análises foram selecionados apenas os grãos extrusados. A seleção dos grãos para as análises está apresentada na figura 1.

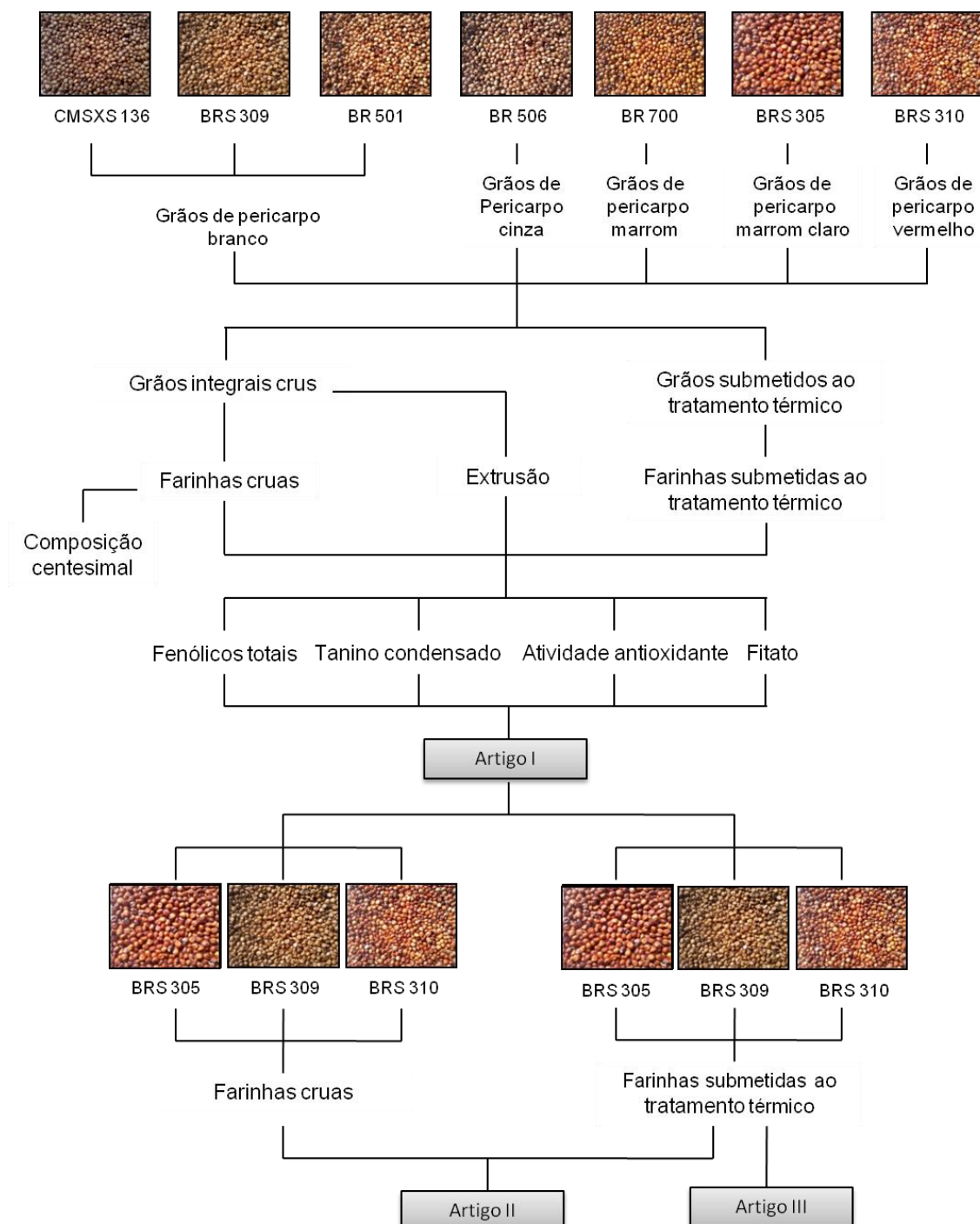


Figura 1- Desenho experimental para seleção das farinhas de grãos de sorgo para os artigos I, II e III.

4.2. Caracterização química das farinhas de sorgo

4.2.1. Teor de água

O teor de água foi determinado a 105°C, em placas de petri previamente taradas e submetidas a aquecimento em estufa com circulação forçada de ar (Marconi®, modelo MA 035, Piracicaba, Brasil) até peso constante, conforme o procedimento descrito pela AOAC (2002) (Método Ba 2a-38). Após secagem, as amostras foram resfriadas em dessecador com sílica e gel, pesadas em balança analítica digital, com precisão de 0,0001 g. O teor de água foi calculado pela diferença de massa entre a amostra úmida e seca.

4.2.2. Proteína

A determinação de proteínas foi realizada segundo o método micro Kjeldahl, para a quantificação de nitrogênio total, descrito pela AOAC (2002) (Método Ba 4a-38), utilizando-se fator de conversão igual a 6,25.

4.2.3. Lipídios

A determinação de lipídios foi realizada por extração em aparelho Soxhlet, utilizando éter de etílico como extrator, por 8 horas, sob refluxo, de acordo com a AOAC (2002) (Método Ba 3-38).

4.2.4. Cinzas

Para a determinação do teor de cinzas, as amostras foram pesadas em cadinhos de porcelana previamente secos, pesados e submetidos à calcinação em mufla (Quimis®, modelo 318, Diadema, Brasil) à 550° C. Posteriormente, os cadinhos com as amostras foram resfriados em dessecador com sílica e gel, novamente pesados em balança analítica digital. O teor de cinzas foi determinado pela diferença de massa antes e após a calcinação, segundo descrito pela AOAC (2002) (Método Ba 5a-49).

4.2.5. Carboidratos

O teor de carboidratos foi obtido pela diferença entre o total da amostra (100%) e os teores de proteínas, lipídios, fibra alimentar, teor de água e cinzas.

4.2.6. Fibra alimentar

A determinação dos teores de fibra alimentar total (FAT), solúvel (FAS) e insolúvel (FAI) das farinhas de sorgo foi realizada por meio do método enzimático gravimétrico (Método Ba 6-84) (AOAC, 2002). Utilizou-se para a hidrólise enzimática α -amilase termoresistente, protease e amiloglicosidase (Total dietary fiber assay kit, Sigma[®]) com modificações. Para a filtração utilizou-se cadinhos de vidro com placa de vidro sintetizado com porosidade n^o2 (ASTM 40-60mesh) e celite como auxiliar de filtração. A fibra alimentar total foi obtida por soma entre fibra alimentar solúvel e insolúvel.

4.2.6.1. Preparo de cadinhos

Os cadinhos foram deixados de molho com detergente neutro (Chemco[®]) a 20% durante 24 horas. Foram enxaguados com água destilada e com vácuo e no sentido oposto. Foram secos em estufa (Marconi[®], modelo MA-035/5, Piracicaba, Brasil) a 105°C por 1 hora e incinerados em mufla (Quimis[®], modelo 318, Diadema, Brasil) a 525°C por 5 horas. Em seguida foram resfriados a 105°C em mufla. Os cadinhos foram lavados 5 vezes com 20 mL de HCl 0,5N e, posteriormente, enxaguados três vezes com 20 mL de água destilada no sentido oposto. Os cadinhos foram secos em estufa a 105°C por 12 horas e pesados. Foi pesado 1 g de celite e adicionado aos cadinhos, que foram secos novamente a 105°C por 12 horas e, posteriormente, pesados.

4.2.6.2. Obtenção do hidrolisado

Foi pesado, em duplicata, 1 g de amostra, com precisão de 0,1mg, previamente desengordurada, em béquer de 600 mL. Foi adicionada, em cada béquer, 50 mL de tampão fosfato pH 6,0. O pH foi ajustado para $6,0 \pm 0,2$, adicionando, se necessário, NaOH 0,275 ou HCl 0,325 N. Na solução foi adicionado 0,1 mL de α -amilase termoresistente. O bequer foi tampado com folha de papel alumínio e aquecido em banho-maria (Marconi[®], modelo MA 093, Piracicaba, Brasil) em ebulição por 30 minutos, com agitação a cada 5 minutos. As amostras foram resfriadas em temperatura ambiente. O pH foi ajustado para $7,5 \pm 0,1$ e adicionado em torno de 10 mL de NaOH 0,275N. Em seguida, foi adicionado 0,1 mL de protease ($5 \text{ mg} \cdot 0,1 \text{ mL}^{-1}$) na solução pré-digerida e o béquer novamente tampado com folha de alumínio e incubado à 60°C por 30 minutos, com agitação horizontal (100 rpm). Após o hidrolizado ser

resfriado à temperatura ambiente, foi adicionado em torno de 10 mL de HCl 0,325 N com a finalidade de ajustar o pH em $4,3 \pm 0,3$. Finalmente, foi adicionado 0,1 mL de amiloglicosidase na solução e o béquer foi novamente tampado com folha de alumínio e incubado a 60°C por 30 minutos com agitação horizontal (100 rpm), para obtenção do hidrolisado final. O mesmo procedimento foi realizado em duplicata para obtenção do branco.

4.2.6.3. Fibra Insolúvel

Inicialmente com auxílio da bomba de vácuo (Marconi®, modelo MA-058, Piracicaba, Brasil), filtrou-se o hidrolisado em cadinho. Em seguida lavou-se o resíduo do cadinho com 10 ml de água destilada, repetindo o procedimento três vezes. O volume filtrado no kitasato foi transferido para um béquer de 600 mL, utilizando-se 320 mL de álcool 98% aquecido a 60°C para lavar o kitasato, sendo este material reservado para análise de fibra solúvel. Os cadinhos foram, em seguida, lavados duas vezes com o volume de 20 mL de etanol a 95%, e duas vezes com 20 mL acetona. Os cadinhos foram secos em estufa a 105°C durante 12 horas. Posteriormente, realizou-se análise de proteína e cinzas nos resíduos do cadinho (AOAC, 2002).

4.2.6.4. Fibra Solúvel

O volume reservado na etapa filtração da fibra insolúvel foi deixado em repouso em temperatura ambiente durante 1 hora para precipitação. Os cadinhos foram lavados com auxílio da bomba de vácuo com 20 mL etanol a 78%. Em seguida, o conteúdo reservado foi filtrado no cadinho com auxílio de bomba de vácuo. Estes foram lavados consecutivamente três vezes com volume de 20 mL de etanol a 78%, duas vezes com 20 ml de etanol a 95% e duas vezes com 20 mL de acetona. Posteriormente, o resíduo do cadinho foi seco em estufa a 105°C durante 12 horas e prosseguiu-se para análise de proteínas e cinzas dos resíduos conforme descrito anteriormente.

4.2.6.5. Fibra total

A determinação de fibra alimentar total foi realizada pela soma das fibras solúvel e insolúvel.

4.2.7. Conteúdo calórico

O conteúdo calórico foi determinado de acordo com a composição de alimento em termos de proteínas, carboidratos e lipídios, onde foram utilizados fatores de conversão 4, 4, e 9 kcal.g⁻¹ de alimento, respectivamente (FRARY e JOHNSON, 2005).

4.2.8. Fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos nas amostras foi realizada, em triplicata, utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. Em ambiente alcalino, este reagente oxida os compostos fenólicos e reduzem o fosfomolibdato, presente no reagente, formando um composto de coloração azul com leitura em uma faixa de 720 a 765 nm, conforme descrito por Singleton, Orthofer, Lamuela-Raventós *et al.* (1999).

O extrato foi preparado com 5 g das farinhas dos grãos de cada genótipo adicionados de 20 mL (1:10) de solução de metanol:água (6:4), homogeneizados em agitador automático a 180 rpm, durante 8 horas em temperatura ambiente.

Foi utilizada uma alíquota de 500 µL de cada um dos extratos, adicionado de 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (diluído em água a 20%) e 0,5 mL de solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 7,5%, seguido de agitação em vórtex e incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. Por fim, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu UV-VIS[®], Kyoto, Japan) no comprimento de onda de 765 nm. Uma curva analítica de ácido gálico, nas concentrações de 0,01 a 0,1 g.L⁻¹ foi elaborada, por meio da equação de regressão ($y = 30,763x + 0,0818$; $R^2 = 0,9964$) para expressar os resultados em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra.

4.2.9. Taninos condensados

A determinação da concentração de taninos foi realizada pelo método de reação vanilina/HCl, segundo Burns (1971) com modificações de Maxson e Rooney (1972) e Price, Van Scoyoc e Butler (1978). Foram suspensas 0,2 g das farinhas em 10 mL de solução a 1% de HCl em metanol. Os tubos foram colocados em agitador automático a 80 rpm durante 20 minutos para a extração dos taninos. Em seguida, foram centrifugados a 3.000 rpm, por 20

minutos. Alíquotas de 1 mL do sobrenadante foram adicionadas a 2,5 mL de solução a 1% de vanilina em metanol e 2,5 mL de solução a 8% de HCl em metanol. Os tubos foram mantidos em repouso por 20 minutos e as absorbâncias foram medidas a 500 nm contra o branco. Foi subtraída das leituras das amostras a absorbância do branco, onde a solução de vanilina foi omitida.

Foi construída uma curva analítica de catequina onde 200 mg do composto foram diluídas em metanol, sendo o volume ajustado em balão volumétrico de 200 mL. Alíquotas de 5, 10, 20, 25 e 50 foram retiradas da solução concentrada e o volume foi ajustado para 100 mL em balão volumétrico com metanol. Em seguida, as absorbâncias foram medidas a 500 nm contra o branco reagente. Uma curva-padrão de catequina ($y = 0,4753x + 0,0094$; $R^2=0,9885$) foi utilizada para expressar os resultados em miligrama equivalente de catequina por grama de amostra.

4.2.10. Fitato

O teor de fitato foi determinado por cromatografia de troca iônica e espectrofotometria, segundo método de Latta e Eskin (1980), com modificações por Ellis e Morris (1986). Para a extração dos fitatos foi pesado cerca de 0,1 g de farinha e adicionado 5 mL de HCl 2,4%, permanecendo sob agitação horizontal durante 12 horas a 250 rpm. O extrato contendo ácido fítico foi centrifugado a 3.000 rpm durante 15 minutos, sendo o sobrenadante filtrado a vácuo em funil de büchner e purificado utilizando coluna de troca iônica, com fase estacionária constituída por resina Dowex- AGX-4. A coluna foi pré-condicionada com NaCl 2 M e o extrato obtido das etapas anteriores foi aplicado cuidadosamente à mesma. Os fósforos inorgânicos foram eluídos com NaCl 0,05 M, seguida da eluição dos fitatos retidos com NaCl 2 M. O fitato foi determinado colorimetricamente, com base na coloração rósea do reagente de Wade que é formada a partir da reação entre o íon férrico e o ácido sulfosalicílico, que exibe absorbância máxima a 500 nm. Na presença de fitato, o ferro é seqüestrado e indisponível para reagir com o ácido sulfosalicílico, resultando em uma redução da intensidade da cor. Uma curva analítica de ácido fítico (Sigma[®]), com concentrações de 10 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi elaborada, por meio da equação de regressão linear ($y = -0,0038x + 0,4963$; $R^2=0,9938$)

para expressar o teor de fitatos em miligrama de ácido fítico por grama de farinha.

4.2.11. Antocianinas

4.2.11.1. Extração de antocianinas

Foram suspensas 1 g da farinha de cada genótipo em 10 mL de solução de 1% HCl em metanol (v:v). Os erlenmeyers foram colocados em agitador automático durante 20 minutos para extração das antocianinas. Em seguida, a solução foi centrifugada a 2790g durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado a - 20°C (DYKES, SEITZ, ROONEY, *et al.*, 2009). A partir destes extratos foram realizadas as análises de antocianinas totais e identificação e quantificação da luteolinidina e apigeninidina.

4.2.11.2. Determinação das antocianinas totais

A concentração de antocianinas totais foi realizada pelo método de pH diferencial segundo Fuleki e Francis (1968) e Giusti e Wrolstad (2001) com modificações. Duas alíquotas de 100 µL de extrato foram diluídos em 2,9 mL de tampão cloreto de potássio 0,025 mol.L⁻¹ em pH=1, e a outra em 2,9 mL de tampão acetato de sódio 0,4 mol.L⁻¹ pH=4,5. A absorbância foi medida em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 300 e 700 nm. As antocianinas totais foram determinadas no tampão cloreto de potássio pH=1 de acordo com AWIKA, ROONEY e WANISKA (2004b).

4.2.11.3. Identificação e quantificação de luteolinidina e apigeninidina

A identificação qualitativa dos compostos foi realizada injetando-se uma mistura de padrões de antocianinas, luteolinidina (Extrasynthese®) e apigeninidina (Sigma®), e comparando-se os tempos de retenção obtidos para os padrões e para as amostras analisados sob as mesmas condições. Além disso, os isômeros de antocianinas foram identificados pela comparação dos espectros de absorção do padrão e dos picos de interesse nas amostras, utilizando-se o detector de arranjo de diodos (DAD).

Para a quantificação dos compostos, foram utilizadas curvas de padronização externas. Foram realizadas diluições apropriadas das soluções

dos padrões a fim de se obter concentrações comparáveis aos teores encontrados nos genótipos de sorgo.

A construção das curvas analíticas foi realizada por meio de injeção, em duplicata, de cinco volumes crescentes de soluções dos padrões na faixa de 0,026 e 1,321 µg para luteolinidina e de 0,036 e 3,6 µg para apigeninidina. Desse modo, foi feita uma correlação linear entre as áreas dos picos e as concentrações injetadas de cada composto.

A quantificação dos compostos nos frutos foi realizada a partir das curvas analíticas e equações de regressão obtidas para luteolinidina ($y = 1.539.540,4092x - 30.191,3468$; $R^2 = 0,9994$) e apigeninidina ($y = 334.031,7686x + 34.626,5681$; $R^2 = 0,9972$). A concentração real foi obtida por cálculos a partir das diluições realizadas.

4.2.11.4. Condição cromatográfica (CLAE)

Os extratos foram analisados em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu, SCL 10AT VP) constituído de bomba de alta pressão (LC-10AT VP), injetor automático com alça de amostragem de 50 µL (SIL-10AF) e detector de arranjo de diodos (DAD) (SPD-M10A). O sistema CLAE foi controlado pelo software Multi System, Class Vp 6.12. As condições cromatográficas foram: coluna cromatográfica RP-18 Phenomenex Gemini, 250 x 4,6 mm, 5 µm, munida de coluna de guarda Phenomenex ODS (C18), 4 mm x 3 mm, fase móvel composta por gradiente binário, contendo água ultra pura (pH ajustado para 2 com ácido fórmico) como eluente A; e mistura acetonitrila: água (5:4, com pH ajustado para 2 com ácido fórmico). O gradiente realizado foi: 0–3 min, 12% B isocrático; 3–10 min, 12–30% B; 10–15 min, 30% B isocrático; 15–20 min, 30–40% B; 20–30 min, 40% B isocrático; 30–40 min, 40–100% B; 40–60 min, 100% B isocrático; e 60–63 min, 100–12% B; 63–75 min, 12% B isocrático. O fluxo na fase móvel foi de 0,5 mL.min⁻¹ e os cromatogramas foram obtidos a 470 nm. Utilizou-se sistema de degaseificação da fase móvel com gás hélio antes e durante as corridas cromatográficas, sendo a fase móvel degaseificada por 15 min a 100 kpa antes do início das análises e a 50 kpa ao longo das corridas (AWIKA, ROONEY e WANISKA, 2004a).

4.2.12. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi realizada pelo método do DPPH (radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila) em triplicata (BLOOR e LESTER, 2001). Os extratos foram preparados com 5 g das farinhas dos grãos de cada cultivar adicionados de 20 mL (1:10) de solução de metanol:água (6:4) os quais foram homogeneizados em agitador automático a 180 rpm durante 8 horas em temperatura ambiente. Alíquotas de 100 µL de cada extrato foram adicionadas a tubos de ensaios, devidamente protegidos de luz, onde acrescentou-se 1,5 mL de solução metanólica de DPPH 0,1 mM, seguido de agitação manual por 1 minuto. Após 30 minutos de repouso, a absorbância das soluções foi lida em espectrofotômetro (Shimadzu UV-VIS[®], Kyoto, Japan) no comprimento de onda de 517 nm. A equação utilizada para o cálculo da capacidade antioxidante foi:

$$\text{AAR (\%)} = \frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) \times 100}{A_{\text{controle}}}$$

4.3. Estudo da qualidade proteica de farinhas cruas e submetidas ao tratamento térmico

4.3.1. Animais e dietas experimentais

Foram utilizados 48 ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade albinus, classe Rodentia), linhagem Wistar, recém desmamados, com média de 23 dias de idade, com peso corporal variando entre 51 a 60 g, provenientes do biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. O desenho experimental do estudo está demonstrado na figura 2.

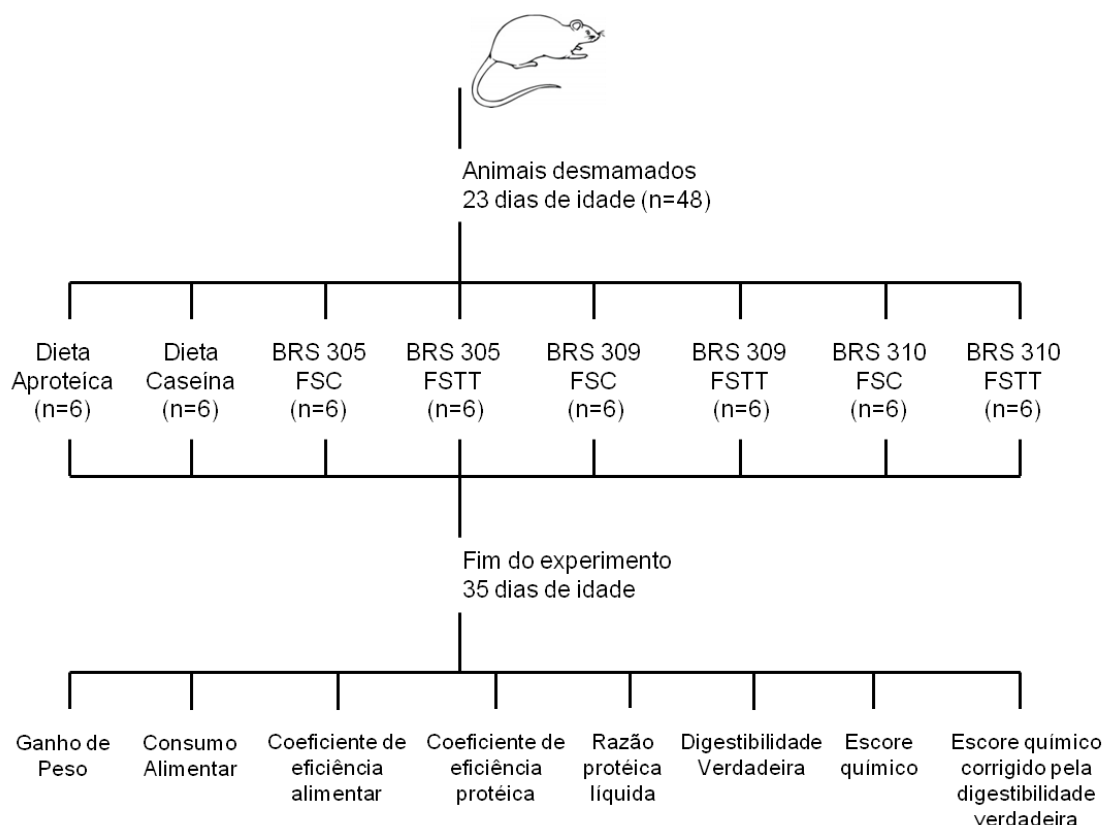


Figura 2- Desenho experimental do estudo de qualidade protéica de farinhas cruas e submetidas ao tratamento térmico.

Os animais foram divididos em oito grupos de seis animais, de forma sistemática, de modo que a diferença entre as médias dos pesos não excedesse 2,2 g, atendendo a recomendação da AOAC (1997). Os ratos foram alocados em gaiolas individuais, de aço inoxidável e mantidos em condições de temperatura de $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas.

Para avaliação da qualidade protéica entre as farinhas de grãos crus e submetidos ao tratamento térmico foram selecionados os genótipos BRS 305, BRS 309 e BRS 310, em função atividade antioxidante, a coloração de pericarpo e o teor de taninos de cada amostra, conforme resultados obtidos no estudo I. Desta forma, a composição das dietas foi baseada na AIN-93G, segundo Reeves, Nielsen e Fahey (1993) com o teor de proteínas alterado para 9% a 10%. Os grupos de animais receberam as seguintes dietas: aprotéica, caseína e farinhas integrais de sorgo dos genótipos BRS 305, BRS 309 e BRS 310 provenientes de grãos crus (FSC) ou submetidos ao tratamento térmico (FSTT) (Tabela 1). Durante o período de 14 dias os animais receberam as dietas experimentais e água deionizada *ad libitum*.

Tabela 1- Composição das dietas experimentais aprotéica, com caseína e com farinha de sorgo dos genótipos BRS 305, BRS 309 e BRS 310 crus (FSC) e submetidos ao tratamento térmico seco (FSTT) (g.100g⁻¹).

Ingredientes	Dietas experimentais							
	AP ^A	CAS ^B	BRS 305 FSC	BRS 305 FSTT	BRS 309 FSC	BRS 309 FSTT	BRS 310 FSC	BRS 310 FSTT
BRS 305 FSC	0	0	89.0	0	0	0	0	0
BRS 305 FSTT	0	0	0	89.0	0	0	0	0
BRS 309 FSC	0	0	0	0	75.2	0	0	0
BRS 309 FSTT	0	0	0	0	0	75.2	0	0
BRS 310 FSC	0	0	0	0	0	0	77.65	0
BRS 310 FSTT	0	0	0	0	0	0	0	77.65
Caseína	0	11	0	0	0	0	0	0
Maltodextrina	13.2	12.5	0	0	9.4	9.4	7.7	7.7
Sacarose	10	9.5	1.2	1.2	0	0	0	0
Óleo de soja	7	7	4.7	4.7	4.8	4.8	4.6	4.6
Celulose	10.2	10.2	0	0	3.3	3.3	2.6	2.6
Mix mineral	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Mix vitamina	1	1	1	1	1	1	1	1
L-cistina	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Bitartarato de colina	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Amido de milho	54.6	45.0	0.3	0.3	2.5	2.5	2.6	2.6

^AAP= Dieta aprotéica; ^BCAS= Dieta de caseína.

4.3.2. Coeficiente de eficiência alimentar (CEA)

No período experimental os animais foram pesados no 1º, 7º e 14º dias e determinou-se o CEA que representa a relação entre o ganho de peso (g) e o consumo total de dieta pelos animais (g).

4.3.3. Coeficiente de eficiência proteica (PER) e razão protéica líquida (NPR)

O PER foi determinado por meio do método de Hegsted (1977), modificado, para 14 dias de experimento (MORAES, CARRARO, DANTAS, *et al.*, 2010), que relaciona o ganho de peso dos animais (g) com o consumo de proteína (g). O coeficiente de eficiência proteica relativo (PER-R) foi determinado considerando como 100% o resultado de PER da dieta de caseína.

O NPR foi determinado, de acordo com Bender e Doell (1957), levando-se em consideração o ganho de peso do grupo-teste (g), mais a perda de peso do grupo com dieta aprotéica (g), em relação ao consumo de proteína do grupo-teste (g). A razão protéica líquida relativa (NPR-R) foi determinada considerando como 100% o resultado de NPR da dieta de caseína.

4.3.4. Digestibilidade verdadeira (DV)

Para a determinação da DV as dietas foram marcadas com corante índigo carmim na concentração de 0,2%. Estas dietas foram oferecidas aos animais no 8° e 11° dias. As fezes marcadas foram coletadas no 9° dia, bem como a totalidade das fezes no 10° e 11° dias e as fezes não marcadas no 12° dia. As fezes coletadas foram armazenadas em recipientes individuais para cada animal e mantidas sob refrigeração. Posteriormente, as fezes foram secas em estufa (Marconi®, modelo MA-035/5, Piracicaba, Brasil) a 105°C durante 24 h. Em seguida, foram resfriadas, pesadas e trituradas em multiprocessador (Arno®) para determinação da concentração de nitrogênio, pelo método de semimicro Kjeldahl (AOAC., 1997), com amostras em triplicata. A DV foi calculada medindo-se a quantidade de nitrogênio ingerido na dieta, excretado nas fezes e a perda metabólica nas fezes, que correspondeu ao nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica.

4.3.5. Determinação e quantificação de aminoácido

4.3.5.1. Hidrólise Ácido em Solução

A hidrólise ácida de proteínas e peptídeos foi realizada para se quantificar os aminoácidos: cisteína, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, tirosina, valina, alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, prolina e serina.

Alíquotas de amostras contendo cerca de 20 a 60 nmoles em proteína, ou 5 a 10 mg de sólidos previamente desengordurados, foram transferidas para ampolas de borossilicato de 10 x 150 mm (Pyrex®) que foram previamente pirolisadas a 400°C por 8 horas. Nos casos em que o volume da solução foi maior que 0,1 mL, as amostras foram concentradas em condensador rotatório (Savant®, modelo SpeedVac AS 290 ou AS 160). Foram adicionadas 0,5 mL de solução aquosa de ácido clorídrico 6 N bidestiladas a 104°C, contendo 0,1% de fenol (m/v). Cada ampola contendo amostra e HCl foi selada, sob vácuo. Estas ampolas foram colocadas em mufla a 110°C, por 24 horas (SPACKMAN, STEIN e MOORE, 1958). Variações de tempo como 48 e 72 horas também foram realizadas para verificar a liberação de aminoácidos hidrofóbicos. Após a hidrólise ácida em solução, a amostra foi seca em concentrador rotatório e ressuspensa em solução tampão de citrato de sódio 0,17 M, pH 2,2, contendo polietilenoglicol 400 a 15% (v/v) e tiodiglicol 0,4% (v/v).

4.3.5.2. Hidrólise alcalina

Para a quantificação de triptofano foi necessário fazer uma hidrólise alcalina com hidróxido de lítio 4 N, segundo técnica descrita por Lucas e Sotelo (1980).

Amostras contendo aproximadamente 40 a 80 nmoles de proteína (10 a 20 mg de sólidos) foram transferidas para ampolas de borossilicato de 10 x 150 mm (Pyrex®) que foram previamente pirolisadas a 400°C por 8 horas. Nos casos em que o volume da solução foi maior que 0,1 mL, as amostras foram concentradas em condensador rotatório (Savant®, modelo SpeedVac AS 290 ou AS 160). Foram adicionadas de 0,5 mL de solução aquosa de hidróxido de lítio de 4 N. Cada ampola contendo a amostra e LiOH foi selada sendo, anteriormente, feito vácuo na mesma. Estas ampolas foram colocadas em mufla a 110°C, por 24 horas.

Após hidrólise alcalina, a amostra foi neutralizada com 0,12 mL de ácido ortofosfórico e filtrada em membrana de 0,45 µm, para eliminar precipitados. Na amostra foi adicionado polietilenoglicol 400 para 15% (v:v) e uma solução tampão de citrato de sódio 0,17 M, pH 2,2 contendo tiodiglicol 0,4% (v:v) para completar o volume em balão volumétrico para 5,0 mL.

4.3.5.3. Quantificação dos aminoácidos

O analisador de aminoácidos, Nicolas V (Construído no Centro de Química de Proteínas), consiste de duas colunas de troca iônica, sendo uma longa, que separa aminoácidos ácidos e neutros, e a outra que separa aminoácido básicos e triptofano. Alíquotas entre 0,01 e 0,9 mL foram aplicadas nas colunas de troca catiônica (Resina: PC 6ª Amin acid Analysis Resin Pierce) e eluídas por diferenças de pH e força iônica (coluna curta pH 5,28; coluna longa pH 3,25 e posteriormente 4,25) (SPACKMAN, STEIN e MOORE, 1958).

Após separação cromatográfica, os aminoácidos eluídos da coluna reagiram com ninidrina a uma temperatura de aproximadamente 100°C (banho de água em ebulição), por 15 minutos e os produtos desta reação foram detectados colorimetricamente em dois comprimentos de onda: 440 nm para o prolina (cubeta de 6 mm de caminho óptico) e 570 nm para os demais aminoácidos (em uma cubeta de caminho óptico de 12 nm).

A identificação dos picos foi realizada com base nos tempos de retenção de cada resíduo. O aparelho foi padronizado com uma solução padrão de aminoácidos que continha 40 nmoles de cada resíduo injetado. A

altura do pico foi utilizada para calcular o fator, assumindo-se que cada pico apresenta uma forma gaussiana. Estas medidas foram realizadas manualmente (ALONZO e HIRS, 1968) e os dados de linha de base e altura máxima foram processados por uma planilha desenvolvida no próprio Nicolas V. Este aparelho estava otimizado para operar em uma faixa linear de 30 a 60 nmoles, dependendo do resíduo considerado e para cálculos realizados com base na altura dos picos.

4.3.6. Escore químico (EQ) e escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS)

Para o cálculo do EQ e do PDCAAS, os valores do conteúdo de aminoácidos foram expressos em miligrama de aminoácido por grama de proteína e comparados com o padrão da FAO/WHO (2007). Utilizaram-se os dados obtidos na determinação dos teores de nitrogênio, proteína, aminoácidos essenciais, escore de aminoácidos e digestibilidade verdadeira.

Para o cálculo do PDCAAS, tomou-se por base o valor do escore químico do aminoácido essencial mais limitante, menor que 1,0, de cada fonte de proteína.

4.4. Estudo de potencial funcional de grãos de genótipos de sorgo submetidos ao tratamento térmico

4.4.1. Animais e dietas experimentais

Foram utilizados 50 ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade albinus, classe Rodentia), linhagem Wistar, recém desmamados, com média de 23 dias de idade, com peso corporal variando entre 51 a 60 g, provenientes do biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

Durante o período de 30 dias os animais foram mantidos em caixas de polietileno para crescimento e adaptação. Neste período os animais receberam dieta comercial e água *ad libitum*.

Aos 53 dias de idade os animais foram divididos em cinco grupos de dez animais, de forma sistemática, de modo a não haver diferença entre as médias dos pesos entre os grupos ($199 \text{ g} \pm 4,8$). Os ratos foram alocados em gaiolas individuais, de aço inoxidável e mantidos em condições de temperatura de $22 \pm$

3°C, com fotoperíodo de 12 horas. O desenho experimental do estudo está demonstrado na figura 3.

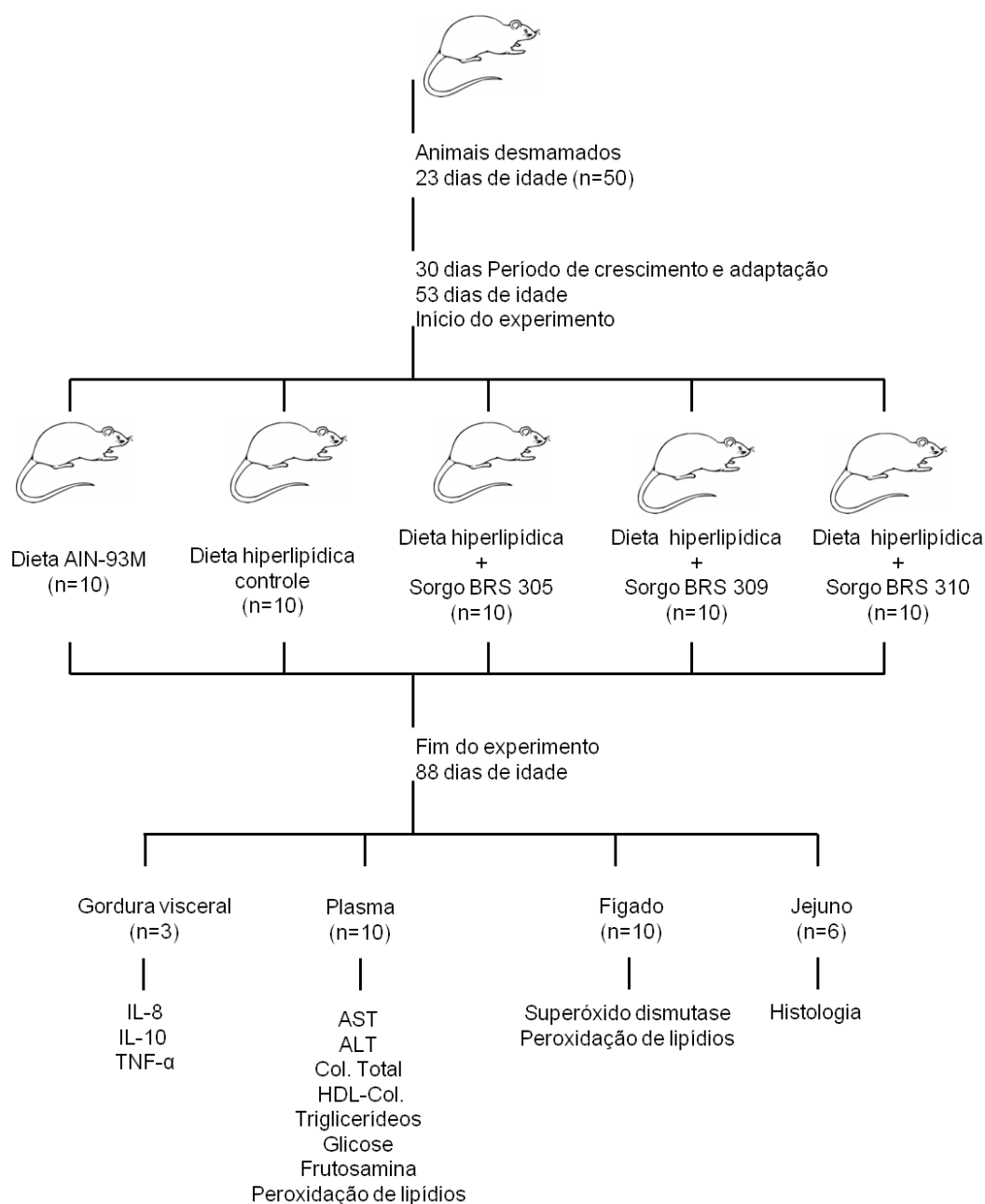


Figura 3- Desenho experimental do estudo de potencial funcional de genótipos de sorgo submetidos ao tratamento térmico

Conforme resultados obtidos nos estudos I e II as farinhas dos grãos dos genótipos BRS 305, BRS 309 e BRS 310 submetidos ao tratamento térmico foram selecionado para avaliação do potencial funcional. Deste modo, os grupos de animais receberam as seguintes dietas: AIN-93M, dieta hiperlipídica controle (DHC), dieta hiperlipídica com farinha integral de grãos sorgo do genótipo BRS 305 submetido ao tratamento térmico (DHS 305), dieta

hiperlipídica com farinha integral de grãos de sorgo do genótipo BRS 309 submetido ao tratamento térmico (DHS 309) e dieta hiperlipídica com farinha integral de grãos de sorgo do genótipo BRS 310 submetido ao tratamento térmico (DHS 310) (Tabela 2). Durante o período de 35 dias os animais receberam as dietas experimentais e água deionizada *ad libitum*.

A dieta hiperlipídica foi baseada na composição da ração comercial D12079B (Research Diets®) (THORNTON-JONES, KENNETT, BENWELL, *et al.*, 2006) adaptada para a dieta AIN-93M. As farinhas dos grãos de sorgo foram acrescentadas às dietas em quantidade suficiente para fornecer 50% do teor de fibra alimentar, de acordo com a recomendação de dieta para roedores AIN-93M, o restante da fibra foi fornecido na forma de celulose.

Tabela 2- Composição das dietas experimentais (g.100g⁻¹).

Ingredientes	Dietas Experimentais				
	AIN 93-M	DHC	DHS 305	DHS 309	DHS 310
Caseína	14	14	11,79	10,74	11,01
Maltodextrina	15,5	15,5	4,9	0,86	2,2
Amido de milho	46,6	5,32	0	0	0
Sacarose	10	34,1	34,1	34,1	34,1
Óleo de milho	4	1	0,43	0,32	0,33
Manteiga	0	20	20	20	20
Sorgo 305 com tratamento térmico	0	0	21,2	0	0
Sorgo 309 com tratamento térmico	0	0	0	26,4	0
Sorgo 310 com tratamento térmico	0	0	0	0	24,8
Celulose	5	5	2,5	2,5	2,5
Mix de mineral	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mix de vitamina	1	1	1	1	1
Bitartarato de Colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
L- cisina	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Colesterol	0	0,15	0,15	0,15	0,15
Kcal.g ⁻¹	3,8	4,6	4,5	4,5	4,5
Fibra alimentar ^A	-	-	11,4	9,2	9,7

^A= Teor de fibra alimentar das farinhas dos genótipos de sorgo BRS 305, BRS 309 e BS 310 utilizados para o cálculo das dietas, determinado pelo método enzimático-gravimétrico (AOAC, 2002).

No 34° dia de experimento os animais foram colocados em jejum por 10 horas durante o período noturno. No 35° dia, aos 88 dias de idade, os animais foram anestesiados (isoflurano, Isoforine, Cristália®) e eutanaziados por punção cardíaca para coleta de amostras sanguíneas. O sangue coletado em tubo heparinizado foi centrifugado durante 10 minutos a 3.000 rpm para separação do plasma. O fígado e o tecido adiposo epididimal dos animais foram retirados, pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Todos os materiais coletados foram armazenados em ultrafreezer a temperatura de - 80°C até o

início das análises. Após ensaio com a enzima superóxido dismutase o fígado dos animais foram liofilizados para a análise de peroxidação de lipídios.

4.4.2. Parâmetros bioquímicos

4.4.2.1. Glicose

A concentração de glicose foi determinada no plasma dos animais por método colorimétrico, utilizando-se kit de glicose monoreagente (Bioclin®). A realização das análises seguiu as orientações recomendadas pelo fabricante. O método se baseia na oxidação enzimática da glicose formando peróxido de hidrogênio que reage com a 4 aminoantipirina e fenol, formando um cromógeno vermelho cuja intensidade da cor é proporcional a concentração a glicose. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 490-550 nm em analisador químico clínico (Clinical Chemistry Analyzer Mindray®, modelo BS 200). A concentração de glicose sérica foi expressa em mg.dL^{-1} .

4.4.2.2. Frutosamina

A concentração de frutosamina foi determinada no plasma dos animais por meio de método colorimétrico, utilizando-se kit de frutosamina (Labtest®). A realização das análises seguiu as orientações recomendadas pelo fabricante. O método baseia-se na ligação da glicose aos grupamentos das proteínas formando uma base de Schiff (aldimina) que após rearranjo molecular, transforma-se em uma cetoamina estável denominada frutosamina. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 510-550 nm em analisador químico clínico (Clinical Chemistry Analyzer Mindray®, modelo BS 200). A concentração de frutosamina foi expressa em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

4.4.2.3. Colesterol Total

A concentração de colesterol total foi determinada no plasma dos animais por meio de método colorimétrico, utilizando-se kit de colesterol monoreagente (Bioclin®). A realização das análises seguiu as orientações recomendadas pelo fabricante. O método se baseia na reação do peróxido de hidrogênio com a p-clorofenol originando um composto de cor cereja, cuja intensidade de cor é proporcional a concentração de colesterol. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 490-550 nm em analisador químico

clínico (Clinical Chemistry Analyzer Mindray[®], modelo BS 200). A concentração de colesterol total foi expressa em mg.dL⁻¹.

4.4.2.4. HDL-Colesterol (*Lipoproteínas de alta densidade*)

A concentração de HDL-colesterol foi determinada no plasma dos animais por meio de método colorimétrico, utilizando-se kit de colesterol HDL direto (Bioclin[®]). A realização das análises seguiu as orientações recomendadas pelo fabricante. O método baseia-se na estabilização das lipoproteínas de baixa densidade, muito baixa densidade e dos quilomicrons pela adsorção de poliânion. Nesta condição a HDL se solubiliza pela ação de um detergente, e permite ação enzimática sobre o colesterol ligado a ela. Desta forma, a intensidade da coloração formada é proporcional à concentração de colesterol HDL na amostra. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 540-560 nm em analisador químico clínico (Clinical Chemistry Analyzer Mindray[®], modelo BS 200). A concentração de HDL-colesterol foi expressa em mg.dL⁻¹.

4.4.2.5. Triglicerídeos

Os teores de triglicerídeos foram determinados no plasma dos animais por meio de método colorimétrico, utilizando-se kit de triglicérides líquidos estáveis (Bioclin[®]). A realização das análises seguiu as orientações recomendadas pelo fabricante. O método baseia-se na reação do peróxido de hidrogênio com a 4-aminoantipiorina originando um composto de cor cereja, cuja intensidade de cor é proporcional a concentração de triglicerídeos. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 490-550 nm em analisador químico clínico (Clinical Chemistry Analyzer Mindray[®], modelo BS 200). A concentração de triglicerídeos foi expressa em mg.dL⁻¹.

4.4.2.6. Alanina amino transferase (ALT)

A concentração de alanina amino transferase (ALT) foi determinada no plasma dos animais pelo método colorimétrico utilizando-se kit transferase ALT cinético (Bioclin[®]). A realização das análises seguiu as orientações recomendadas pelo fabricante. O método se baseia na transferência do grupamento amina da alanina para o alfaetoglutarato levando a formação de piruvato e glutamato. O piruvato é reduzido a lactato em presença do lactato

desidrogenase (LDH) formando NAD^+ . A velocidade de oxidação da nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) é proporcional a atividade da ALT da amostra. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 340 nm em analisador químico clínico (Clinical Chemistry Analyzer Mindray®, modelo BS 200). A concentração de ALT foi expressa em U.L^{-1} .

4.4.2.7. Aspartato amino transferase (AST)

A concentração de aspartato amino transferase (AST) foi determinada no plasma dos animais pelo método colorimétrico utilizando-se kit transferase AST cinético (Bioclin®). A realização das análises seguiu as orientações recomendadas pelo fabricante. O método se baseia na transferência do grupamento amina do aspartato para o alfacetoglutarato levando a formação de oxaloacetato e glutamato. O oxaloacetato é reduzido a malato em presença do malato desidrogenase (MDH) e o NADH é oxidado a NAD^+ . A velocidade de oxidação é proporcional a atividade da AST da amostra. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 340 nm em analisador químico clínico (Clinical Chemistry Analyzer Mindray®, modelo BS 200). A concentração de AST foi expressa em U.L^{-1} .

4.4.3. Peroxidação de lipídios

A peroxidação de lipídios foi estimada no plasma e em homogenados de fígado liofilizado, por meio do Teste de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com metodologia descrita por Buege e Aust (1978).

Para obtenção dos homogenados, os tecidos liofilizados foram ressuspensos em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, na proporção 1:10 (m:v).

Alíquotas de 0,5 mL do soro e dos homogenados dos tecidos foram adicionados em tubos contendo solução de TBARS constituída de 15% de ácido tricloroacético e 0,375% ácido tiobarbitúrico dissolvidos em HCL 0,25N. A mistura da reação permaneceu em banho-maria a 90°C por 15 min. Após a incubação a mistura foi resfriada e centrifugada a 1000 g. O sobrenadante foi utilizado para leitura de absorbância em 535 nm em espectrofotômetro (Shimadzu®, modelo UV – 1601). Os resultados foram expressos em nmol de equivalentes de malondialdeído-MDA por miligrama de proteína nas amostras

de homogenados e em nmol.mL^{-1} nas amostras de soro, utilizando-se o coeficiente de extinção molar $=1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (BUEGE e AUST., 1978).

4.4.4. Superóxido dismutase (SOD)

A determinação da atividade da SOD foi realizada segundo método modificado por Dieterich, Bielick, Beulich *et al.* (2000). A técnica baseia-se na habilidade da enzima superóxido dismutase de exaurir o oxigênio, diminuindo a razão de auto-oxidação de pirogalol.

Alíquotas de 100 mg de fígado foram pesados em *eppendorf*. O tecido foi macerado e homogeneizado com 0,5 mL de solução tampão fosfato de sódio refrigerado a 8°C com auxílio de bastão de vidro. O homogenato foi centrifugado a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Foram utilizados o sobrenadante do centrifugado. As amostras foram mantidas sob refrigeração durante a análise.

Para obtenção dos brancos acrescentou-se, em triplicata, nos poços da placa de ELISA, 144 μL de solução tampão e 6 μL de brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difeniltetrazolium (MTT) a 1,25 mM; para o padrão, acrescentou-se 129 μL de tampão, 6 μL de MTT e 15 μL de pirogalol (100 μM); nas amostras, acrescentou-se 30 μL de sobrenadante, 99 μL de solução tampão, 6 μL de MTT e 15 μL de pirogalol. Após pipetar todas as amostras em placa de Elisa, acondicionou-se a mesma em estufa a 37°C, durante 5 minutos. Em seguida, com auxílio de pipeta automática multicanal, a reação foi interrompida com a adição de 150 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). A placa foi lida em leitor de ELISA (ASYS®, UVM 340) em comprimento de onda de 570 nm.

4.4.5. Concentração de proteínas totais nos homogenados

Para a determinação de proteínas totais nos homogenados do fígado foi empregado o método de biureto, utilizando-se kit comercial (Proteínas Totais - Bioclin®). Para a realização da análise foram seguidas as orientações recomendadas pelo fabricante. A leitura de absorbância foi realizada em 545 nm, utilizando-se espectrofotômetro (Shimadzu®, modelo UV – 1601). A concentração de proteína foi expressa em g.dL^{-1} .

4.4.6. Análise dos mediadores do processo inflamatório

A quantificação dos marcadores inflamatórios foi realizada por meio da técnica quantitativa *Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real* (RT-PCR).

4.4.6.1. Extração de RNA

O RNA mensageiro (mRNA) total das amostras foram extraídos a partir de 150 mg de tecido adiposo epididimal utilizando-se trizol (Sigma) conforme orientações fornecidas pelo fabricante. Foram adicionados 750 μL de trizol à amostra, a qual foi agitada por 15 segundos em vórtex e incubada em temperatura ambiente por 5 minutos. Logo após, foram adicionados 200 μL de clorofórmio, seguido de agitação manual e intercalada por 15 minutos. Após a centrifugação, 14.000 g por 15 minutos a 4°C, a fase aquosa foi transferida para um novo *ependorf* de 2 mL, no qual foram adicionados 500 μL de isopropanol. A amostra foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente, centrifugada a 12000 g por 10 minutos a 4°C para precipitação do pellet de RNA. Após esta etapa, desprezou-se cuidadosamente o sobrenadante, e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% e mantido a - 70°C por 12 horas. Posteriormente, a amostra foi centrifugada (7500 g por 10 minutos a 20°C), desprezando-se cuidadosamente o sobrenadante e secando-se o precipitado em estufa a 37°C. Por fim, a amostra foi suspensa em 40 μL de água ultrapura e incubada por 10 minutos a 35°C, para solubilização do RNA extraído.

Nesta etapa, foi realizado o teste de concentração, para quantificar o RNA extraído e avaliar sua pureza. Em *ependorf*, 5 μL de RNA extraídos foram diluídos em 295 μL de água MilliQ®, e a leitura realizada nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm para os ácidos nucléico e a proteínas, respectivamente. A pureza foi determinada pela razão entre as absorbâncias, sendo considerada faixa ideal 1,8 a 2,1.

4.4.6.2. Confeção do DNA complementar

O DNA complementar (cDNA) foi confeccionado utilizando-se 2 μL de mRNA extraído a uma concentração de 200 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ ao qual foi adicionado 1 μL do primer randômico (Promega®). Em seguida adicionou-se água ultrapura para completar o volume de 13 mL. A solução foi aquecida a 70°C por 5

minutos em banho-maria, colocada em banho de gelo por 2 minutos e centrifugada a 1300 rpm por 1 minuto. Foram acrescentados 4 μ L do tampão de reação (Fermentas[®]), 2 μ L do dNTP (desoxirribonucleotídeos fosfatados) (Fermentas[®]). Adicionou-se então, 1 μ L da enzima M-MuLV Transcriptase Reversa (Fermentas[®]). As amostras foram incubadas por 10 minutos a 25°C seguido por 42°C por 60 minutos, posteriormente a 70°C por 10 minutos e armazenadas em freezer a - 20°C até a quantificação dos marcadores.

4.4.6.3. Análise quantitativa dos genes alvo

A quantificação dos genes alvo foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR) no equipamento ABI Prism 5700 *Sequence Detection System*, utilizando o sistema de quantificação por fluorescência SYBR-Green. O ciclo da PCR envolveu uma desnaturação inicial de 95°C (10 minutos) e então 40 ciclos, com 1 minuto de desnaturação (94°C), 1 minuto de anelamento (56°C) e 2 minutos de alongamento (72°C), seguidos da curva padrão de dissociação.

As seqüências dos “primers” (Choma Biotechnologies[®]) utilizados e suas propriedades de reação foram: TNF sense: 5` tct caa aac tcg agt gac aag c 3`; TNF anti-sense: 5` ggt tgt ctt tga gat cca tgc 3`; IL-10 sense: 5` gag aga agc tga aga ccc tct g 3`; IL-10 anti-sense: 5` tca ttc atg gcc ttg tag aca c3`; IL-8 sense: 5`cac ttc aag aac atc cag agt ttg a 3` e IL-8 anti-sense: 5`cca ttc ttg agt gtg gct atg act 3`. As condições de PCR foram otimizadas considerando a concentração do “primers”, ausência de formação de dímeros, eficiência na amplificação dos genes alvo e controle dos genes constituintes.

Para cada reação foram utilizados 10 μ L de β -actina (1000 nM), 10 μ L de “primers” (2000 nM), 2,5 μ L de cDNA e 12,5 μ L de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Os cálculos para determinação do nível relativo de expressão do gene foram feitos de acordo com instruções do usuário - User's Bulletin from Applied Biosystems – com referência a β -actina da amostra, usando o método “cycle threshold” (Ct). O Ct é o ponto onde um aumento exponencial significativo na quantidade de amplificado (fluorescência) é primeiramente detectado (geralmente 10 vezes o valor inicial). As médias dos valores de Ct das mensurações em duplicata foram usadas para calcular a expressão do gene alvo, com a normalização do controle interno (β -actina).

4.4.7. Morfometria das vilosidades e criptas intestinais

Fragmentos do jejuno foram coletados de seis animais de cada grupo experimental, fixados em líquido de Bouin por um período de 24 horas. Após este período os fragmentos foram transferidos para solução de álcool 70% e preservados até o processamento. Em seguida, os fragmentos foram transferidos para solução de álcool 95% por quatro horas, seguido por imersão em solução de álcool 95% e resina glicolmetacrilato (Leica, Histoiresin[®]) na proporção de 1:1 por 12 horas, seguida de resina pura por 24 horas, e posterior inclusão. Foram obtidos cortes histológicos semi-seriados com 3 µm de espessura em micrótomo automático (Reichert-Jung[®]) utilizando-se navalha de vidro, e submetidos à coloração pela técnica de Hematoxilina/Eosina. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck[®]), analisadas em microscópio de luz CX31 Olympus, e as imagens foram obtidas em câmera digital SC 020 por meio do software Analysis GETIT, Olympus, para posterior visualização e medição das alturas das vilosidades, profundidades das criptas e espessuras das camadas musculares internas e externas.

Para medir as alturas das vilosidades foram selecionados 10 campos aleatórios por animal. Foram medidas no mínimo 60 vilosidades por grupo experimental. Apenas as vilosidades com epitélio definido e conjuntivo visível foram utilizadas. Para a profundidade das criptas foram tomadas as medidas de 10 campos por animal, onde era possível visualizar a base e o ápice (abertura) da cripta. Foram medidas, no mínimo, 60 criptas por grupo experimental. Para a espessura das camadas musculares internas e externas foram tomadas as medidas de 10 campos por animal. Foram medidas 60 musculares por grupo experimental.

As imagens das secções histológicas foram capturadas com objetiva de 10X e 40X. As medidas foram tomadas com auxílio do aplicativo Image Pro-Plus[®] versão 4.5 (Media Cybernetics).

4.5. Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso de Animais (CEUA/UFV) da Universidade Federal de Viçosa, MG, processo no 28/2010,

sendo o experimento conduzido de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal (Anexo I).

5. ARTIGO I

Tratamento térmico aumenta a concentração de fenólicos totais e mantém a atividade antioxidante de genótipos de sorgo

RESUMO

O Sorgo (*Sorghum bicolor* (L). Moench) é um cereal que pode contribuir de maneira significativa para o consumo de ácidos fenólicos, taninos e fitato. O tipo e a quantidade de compostos fenólicos dependem do genótipo de cada planta. No entanto, métodos de processamento da matéria-prima podem alterar essas concentrações. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do tratamento térmico em sete genótipos de sorgo sobre a atividade antioxidante, concentração de fenólicos totais, taninos e fitato. Estas análises foram realizadas em farinha de grãos crus, farinha de grãos submetidos a tratamento térmico em estufa e pipoca de sorgo. A atividade antioxidante das farinhas dos grãos crus e os tratados termicamente foi preservada, exceto no genótipo BRS 506 que reduziu. A pipoca reduziu esta atividade em até 80%. O tratamento térmico em estufa aumentou a concentração de fenólicos em relação às farinhas cruas, exceto nos genótipos BRS 506, CMSXS 136 e BRS 309. As pipocas apresentaram redução do teor de taninos, exceto no BR 700. Os genótipos BRS 506, BRS 305, BR 700 e CMSXS 136 mantiveram a concentração de fitato nos processamentos. O tratamento térmico em estufa aumentou a concentração de fenólicos totais e manteve a atividade antioxidante e as concentrações de tanino e fitato enquanto, a pipoca favoreceu a redução da atividade antioxidante e dos taninos em relação à farinha de grão de sorgo cru.

Palavras-chave: *Sorghum bicolor* (L). Moench, farinha, tratamento térmico, pipoca, compostos fenólicos, tanino, fitato.

Heat treatment increases the concentration of total phenolics and maintains the antioxidant activity in sorghum genotypes

ABSTRACT

Sorghum may contribute significantly to the phenolic acids, tannin and phytate intake. The amount of phenolic compounds and their type are dependent on the genotype of each plant. However, processing methods of raw material could change these concentrations. The objective of this study was to evaluate the effect of heat treatment in seven sorghum genotypes concerning the antioxidant activity and the concentration of total phenolics, tannins and phytate. These analyses were carried out in flour from raw sorghum grains, flour from grains subjected to heat treatment in an oven (105°C/30 min.) and sorghum popcorn. The antioxidant activity in the raw grain flours and in the heat-treated grain flours was preserved, except in the BRS 506 genotype where it was decreased. Popped sorghum decreased the antioxidant activity by 80%. Flour from heat-treated grains increased the total phenolics content compared to the raw grain flours, except in the BRS 506, CMSXS 136 and BRS 309 genotypes. Except for the BR 700 genotype, popped sorghum decreased tannin content. The phytate content was maintained in all processing of BRS 506, BRS 305, BR 700 and CMSXS 136 genotypes. The flours from heat-treated grains increased the total phenolics and maintained the antioxidant activity and the concentration of tannin and phytate. On the other hand, popped sorghum reduced both the antioxidant activity and the tannin content, compared to the flour from raw sorghum grains.

Keywords: *Sorghum bicolor* (L.) Moench, flour, popcorn, heat treatment, phenolic compound, tannins, phytate.

5.1. Introdução

Evidências epidemiológicas demonstram que dietas ricas em cereais integrais reduzem o risco de doenças crônicas não transmissíveis incluindo as doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes tipo 2 e muitos tipos de câncer (MCKEOWN, TROY, JACQUES, *et al.*; SLAVIN, 2004; FARRAR, HARTLE, HARGROVE, *et al.*, 2008). Estes benefícios são frequentemente relacionados aos componentes das matrizes alimentares como a fibra alimentar, ácidos fenólicos, lignanas, fitoestrógenos e fitoquímicos (RIEDL e HAGERMAN, 2001; ENRIGHT e SLAVIN, 2010; KUMAR, SINHA, MAKKAR, *et al.*, 2010).

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) é um cereal utilizado na alimentação tradicional de países da África, Índia e Oriente Médio que, além do aporte calórico-protéico, contribui de maneira significativa com o fornecimento de ácidos fenólicos, antocianinas, taninos e fitato, podendo auxiliar na prevenção das doenças crônicas não transmissíveis (SANCHEZ, 2003; DYKES e ROONEY, 2006; O'KENNEDY, GROOTBOOM e SHEWRY, 2006).

A concentração e o tipo de compostos fitoquímicos do sorgo dependem do genótipo de cada planta (DYKES e ROONEY, 2006). Por exemplo, cultivares que apresentam os genes dominantes B₁ e B₂ possuem testa pigmentada, indicando a presença dos taninos condensados, que por vez, apresentam maiores concentrações de fenólicos totais e, subsequentemente, maior atividade antioxidante (DLAMINI, TAYLOR e ROONEY, 2007). Entretanto, métodos de processamento da matéria-prima podem alterar essas concentrações. Hamama e Nawar (1991) relataram a destruição de fenólicos antioxidantes em altas temperaturas. Entretanto, Dewanto, Wu e Liu (2002), demonstraram maior conteúdo de fenólicos totais em milho doce após tratamento térmico, aumentando tanto o tempo de exposição ao calor, quanto à temperatura. Contudo, estes efeitos podem ser relacionados às condições de aquecimento, tipo de composto e, também da matéria-prima (LARRAURI, RUPÉREZ e SAURA-CALIXTO, 1997).

Diante da variabilidade genética do sorgo e a incoerência da estabilidade dos compostos fenólicos quando expostos às altas temperaturas, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento térmico em sete genótipos de sorgo sobre a atividade antioxidante, concentração de compostos

fenólicos totais, taninos e fitato de farinhas e pipocas de grãos de sorgo crus e farinhas de grãos submetidos ao tratamento térmico em estufa.

5.2. Material e métodos

Genótipos de sorgo

Foram analisados os grãos de sete genótipos de sorgo desenvolvidos e fornecidos pela Embrapa Milho e Sorgo - Sete Lagoas – MG, Brasil: CMSXS 136, BRS 309 e BR 501 grãos de pericarpo branco e sem testa pigmentada; BR 506 grãos de pericarpo cinza e sem testa pigmentada; BR 700 grãos de pericarpo marrom; BRS 305 grãos de pericarpo marrom claro e com testa pigmentada; BRS 310 grãos de pericarpo vermelho e sem testa pigmentada. O cultivo dos genótipos de sorgo foi conduzido utilizando espaçamento de 0,70 m entre fileiras, densidade média de 140.000 plantas por hectare. A adubação de plantio foi de 350 kg.ha⁻¹ da fórmula 08-28-16 + 0.5% Zn. A adubação de cobertura foi 100 kg.ha⁻¹ de uréia aplicada aos 40 dias após a germinação. O plantio foi efetuado em Sete Lagoas, MG, Brasil, em fevereiro de 2009.

Composição centesimal

A determinação do teor de água, proteínas, lipídios e cinzas das amostras dos grãos dos sete genótipos de sorgo integrais foram realizadas em triplicata conforme as metodologias recomendadas pela AOAC (2002). A determinação de fibra alimentar solúvel e insolúvel foi realizada por método enzimático gravimétrico (AOAC, 2002). A fibra alimentar total foi obtida por soma entre fibra alimentar solúvel e insolúvel. O teor de carboidratos foi calculado pela diferença utilizando-se a equação: 100 – (teor de água + lipídios + proteínas + cinzas + fibra alimentar). O valor calórico das farinhas foi calculado segundo os fatores de conversão de: 9 kcal por grama de lipídios, 4 kcal por grama de carboidrato e 4 kcal por grama de proteína. A composição centesimal foi realizada nas farinhas dos grãos crus dos sete genótipos.

Preparo das farinhas e pipoca de sorgo

Os grãos de sorgo foram selecionados manualmente e submetidos à peneiragem, para remoção de sujidades e impurezas. Para obtenção das farinhas submetidas ao tratamento térmico, os grãos dos sete genótipos foram expostos à temperatura de 105°C em estufa com circulação de ar (Nova

Ética®, modelo 400/6ND, Vargem Grande Paulista, São Paulo), segundo proposto por Souza, Dantas, Silva *et al.* (2005), com modificação do tempo de exposição para 30 minutos. Em seguida, os grãos crus e os submetidos ao tratamento térmico foram moídos com pericarpo, em moinho de facas (C.W. Brander®, Dusburg, Alemanha), para a obtenção das farinhas com granulometria de 850 µm.

Para obtenção da pipoca foram pesados 20 g de grãos de cada genótipo de sorgo e submetidos ao processo de extrusão doméstica. A extrusão foi realizada em panela de aço inoxidável aquecida em fogão doméstico em chama direta até a extrusão dos grãos, por aproximadamente 2 minutos. Para as análises foram selecionados apenas os grãos extrusados.

Obtenção dos extratos

Após processamento de todas as amostras, 5 g de cada genótipo foram adicionados ao volume de 20 mL (1:10) de solução de metanol:água (60:40) e, em seguida, homogeneizadas em agitador automático a 180 rpm durante 8 horas a temperatura ambiente para obtenção dos extratos.

Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi realizada pelo método do DPPH (radical 1,1-Difenil-2-perilhidrazil) (BLOOR e LESTER, 2001). Alíquotas de 100 µL de cada extrato foram adicionadas a tubos de ensaio, devidamente protegidos de luz. Acrescentou-se 1,5 mL de uma solução metanólica de DPPH 0,1 mM, seguido de agitação manual por 1 minuto. Após 30 minutos de repouso, a absorbância das soluções foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu UV-VIS®, Kyoto, Japan) no comprimento de onda de 517 nm. A capacidade antioxidante foi obtida por meio da equação:

$$\text{AAR (\%)} = \frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) \times 100}{A_{\text{controle}}}$$

Fenólicos totais

Foi utilizada uma alíquota de 500 µL do extrato, adicionado de 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (20% em água) e 0,5 mL de solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 7,5%, seguido de agitação em vótex e incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. Por fim, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu UV-VIS®, Kyoto,

Japão) em comprimento de onda de 765 nm (SINGLETON, RUDOLF, LAMUELA-RAVENTÓS, *et al.*, 1999). Uma curva-padrão de ácido gálico (Sigma®) ($y = 30,763x + 0,0818$; $R^2 = 0,9964$) foi usada para expressar os resultados em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra.

Taninos condensados

A determinação da concentração de taninos foi realizada pelo método de reação de vanilina, segundo Burns (1971) com modificações de Maxson e Rooney (1972) e Price, Van Scoyoc e Butler (1978). Foram suspensas 0,2 g das farinhas em 10 mL de solução a 1% de HCl em metanol. Os *erlenmeyers* foram colocados em agitador automático a 80 rpm durante 20 minutos para a extração dos taninos. Em seguida, foram centrifugados a 3.000 rpm, por 20 minutos. Alíquotas de 1 mL do sobrenadante foram adicionadas a 2,5 mL de solução de vanilina 1% em metanol e 2,5 mL de solução de HCl 8% em metanol. Os tubos foram mantidos em repouso por 20 minutos e as absorbâncias foram medidas a 500 nm contra o branco. Foi subtraída das leituras das amostras a absorbância do branco, onde a solução de vanilina foi omitida. Uma curva-padrão de catequina (Sigma®) ($y = 0,4753x + 0,0094$; $R^2 = 0,9885$) foi usada para expressar os resultados em miligrama equivalente de catequina por grama de amostra.

Fitato

O teor de fitato foi determinado por cromatografia de troca iônica e espectrofotometria, segundo método de Latta e Eskin (1980), com modificações por Ellis e Morris (1986). Para a quantificação de fitato foi pesado 0,1 g de amostra e adicionados 5 mL de HCl 2,4% para extração de 12 horas em agitador horizontal a 250 rpm. O extrato contendo ácido fítico foi centrifugado a 3.000 rpm durante 15 minutos, sendo o sobrenadante filtrado a vácuo em funil de büchner e purificado utilizando coluna de troca iônica, com fase estacionária constituída por resina Dowex-AGX-4. A coluna foi pré-condicionada com NaCl 2 M e o extrato obtido das etapas anteriores foi aplicado cuidadosamente à mesma. Os fósforos inorgânicos foram eluídos com NaCl 0,05 M, seguindo de eluição dos fitatos retidos com NaCl 2 M. O fitato foi determinado colorimetricamente, com base na coloração rósea do reagente de

Wade que é formada a partir da reação entre o íon férrico e o ácido sulfosalicílico, que exibe absorvância máxima a 500 nm. Uma curva-padrão de ácido fítico (Sigma®) ($y = -0,0038x + 0,4963$; $R^2=0,9938$) foi usada para expressar os resultados de fitato em miligrama por grama de amostra.

Análise estatística

O experimento foi instalado em esquema de parcelas subdivididas, tendo nas parcelas os processamentos e nas sub-parcelas os genótipos de sorgo, em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições e 3 replicatas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), as médias foram comparadas utilizando-se teste de Tukey e Correlação de Pearson ao nível de 5% de probabilidade. A dispersão dos dados foi expressa em média e desvio-padrão. As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software Sistema para Análises Estatísticas (SAEG), versão 9.1*, licenciado para a Universidade Federal de Viçosa, MG.

5.3. Resultados e Discussão

O teor protéico dos grãos dos genótipos variou entre 8,5% e 11,9%, a concentração de lipídios de 1,2% a 3,0%, carboidratos de 57,3% a 64,7% e fibra total de 9,1% a 15,0% (Tabela 3).

Tabela 3- Composição química centesimal de grãos de sete genótipos de sorgo, destinados a alimentação humana (g.100g^{-1}).

Nutrientes	Genótipos						
	BRS 310	BRS 506	BRS 305	BR 501	BR 700	CMSXS 136	BRS 309
Proteínas	11,5	11,4	10,1	9,9	8,5	10,9	11,9
Lipídios	2,6	2,3	2,6	3,0	1,9	1,2	2,4
Carboidratos	61,8	57,3	62,0	62,7	64,7	64,5	63,7
Fibra Solúvel	0,70	0,63	0,15	0,17	0,83	0,28	0,88
Fibra Insolúvel	9,0	14,4	11,2	11,0	10,8	8,8	8,3
Fibra Total	9,7	15,0	11,4	11,1	11,6	9,1	9,1
Cinzas	1,4	1,9	1,3	1,5	1,2	1,4	1,3
Água	12,8	11,8	12,4	11,5	11,8	12,5	11,2
Kcal.g ⁻¹	317,0	296,1	312,2	318,2	310,5	313,4	325,2

As composições químicas das amostras avaliadas corroboram com os valores descritos na literatura (RAGAE, ABDEL-AAL e NOAMAN, 2006;

ANTUNES, RODRIGUEZ, GONÇALVES, *et al.*, 2007; ELIAS, DIONELLO, FORLIN, *et al.*, 2008.). O teor de fibra total no BRS 506 foi em média 30% maior, destacando este genótipo para utilização na alimentação humana, especialmente devido à recomendação para aumento do consumo de fibras por meio de cereais integrais.

Nas farinhas dos grãos de sorgo crus a atividade antioxidante dos genótipos variou de 66,5% (CMSXS 136) a 92,9% (BRS 310 e BR 700) ($p < 0,05$). A concentração de fenólicos totais e taninos foram maiores para o genótipo BRS 305, o qual apresentou valores de 4,5 mgEAG.g⁻¹ e 59,5 mgEC.g⁻¹, respectivamente ($p < 0,05$). Não houve diferença na concentração de fitato entre os genótipos neste processamento, com média de 4,6 mg.g⁻¹ ($p \geq 0,05$) (Tabela 4).

Nas farinhas dos grãos submetidos ao tratamento térmico em estufa os genótipos BRS 310, BRS 305, BR 700, e BRS 309 apresentaram maior atividade antioxidante, aproximadamente 90% ($p < 0,05$). O genótipo BRS 305 apresentou maiores concentrações de fenólicos totais e tanino, 6,8 mgEAG.g⁻¹ e 66,8 mgEC.g⁻¹, respectivamente ($p < 0,05$). O teor de fitato variou de 3,6 mg.g⁻¹ (BR 506) a 6,95 mg.g⁻¹ (BRS 309) ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Na pipoca, o genótipo CMSXS 136 apresentou a maior atividade antioxidante ($p < 0,05$). A concentração de fenólicos totais variou de 0,44 mgEAG.g⁻¹ (CMSXS 136) a 2,12 mgEAG.g⁻¹ (BRS 305) ($p < 0,05$). O teor de fitato variou de 2,16 mg.g⁻¹ (BRS 310) a 7,77 mg.g⁻¹ (BR 501) ($p < 0,05$). A concentração de taninos foi maior para os genótipos BRS 305 e BR 700 ($p < 0,05$) (Tabela 4). A maior concentração de tanino nos genótipos BRS 305 e BR 700 devem-se a presença da testa pigmentada, corroborando aos dados de literatura (DYKES, ROONEY, WANISKA, *et al.*, 2005).

Todavia, ressalta-se, que o método colorimétrico vanilina/HCl, largamente utilizado para determinação dos taninos condensado (procianidinas), reage com este composto, mas também com outros fenólicos, superestimando as concentrações dos taninos (PRICE, VAN SCOYOC e BUTLER, 1978; ANGELO e JORGE, 2006). Este comportamento foi observado por Dykes, Rooney, Waniska (2005) que demonstraram baixos níveis de absorvância em genótipos de sorgo sem a testa pigmentada, resultando na presença de taninos condensados em níveis não significativos.

Tabela 4- Atividade antioxidante (AA), concentração de fenólicos totais (FT), taninos (TA) e fitato (FI) em farinhas de grãos crus (FSC), submetidos a tratamento térmico (FSTT) e pipoca (PS) de sete genótipos de sorgo.

Genótipos	FSC				FSTT				PS			
	AA	FT	TA	FI	AA	FT	TA	FI	AA	FT	TA	FI
BRS 310	92,9 ^a ±0,56	0,69 ^c ±0,00	11,5 ^c ±1,04	5,63 ^a ±0,04	89,3 ^a ±1,13	0,96 ^c ±0,00	12,5 ^d ±2,04	5,53 ^{ab} ±0,09	16,7 ^c ±2,61	0,88 ^b ±0,00	4,2 ^{cd} ±1,00	2,16 ^c ±0,06
BRS 506	85,1 ^{bc} ±4,98	0,26 ^d ±0,00	33,7 ^b ±2,80	4,64 ^a ±0,03	78,3 ^b ±0,61	0,48 ^d ±0,00	42,6 ^b ±2,93	3,60 ^b ±0,06	14,9 ^c ±3,26	0,77 ^{bc} ±0,00	21,1 ^b ±6,39	4,84 ^b ±0,24
BRS 305	92,3 ^a ±0,44	4,50 ^a ±0,01	59,5 ^a ±0,39	3,40 ^a ±0,19	91,4 ^a ±0,53	6,83 ^a ±0,01	66,8 ^a ±1,71	3,78 ^b ±0,08	15,9 ^c ±3,16	2,12 ^a ±0,00	31,9 ^a ±3,68	2,24 ^c ±0,03
BR 501	81,3 ^c ±1,15	0,26 ^d ±0,00	14,3 ^c ±0,95	5,66 ^a ±0,01	79,0 ^b ±1,00	0,78 ^c ±0,00	15,0 ^d ±1,37	3,80 ^b ±0,05	41,4 ^b ±6,49	0,59 ^{bc} ±0,00	2,8 ^{cd} ±0,24	7,77 ^a ±0,19
BR 700	92,9 ^a ±0,32	3,17 ^b ±0,00	33,2 ^b ±1,28	4,00 ^a ±0,07	91,5 ^a ±0,50	3,85 ^b ±0,01	36,4 ^c ±1,35	4,14 ^b ±0,038	14,7 ^c ±3,70	2,10 ^a ±0,00	31,5 ^a ±1,86	3,67 ^{bc} ±0,17
CMSXS 136	66,5 ^d ±2,95	0,26 ^d ±0,00	10,8 ^c ±0,53	5,34 ^a ±0,05	69,5 ^c ±0,50	0,36 ^d ±0,00	10,6 ^d ±0,52	5,21 ^{ab} ±0,07	59,4 ^a ±3,93	0,44 ^c ±0,00	1,26 ^{cd} ±0,47	5,17 ^b ±0,09
BRS 309	90,6 ^{ab} ±2,06	0,75 ^c ±0,00	12,5 ^c ±0,53	4,30 ^a ±0,01	91,0 ^a ±1,00	0,84 ^c ±0,00	2,91 ^e ±0,13	6,95 ^a ±0,06	44,2 ^b ±1,25	0,61 ^{bc} ±0,00	0,86 ^d ±0,19	2,95 ^{bc} ±0,03

As médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Atividade antioxidante (%), teor de fenólicos totais (mgEAG.g⁻¹), taninos (mgEC.g⁻¹) e fitato (mg.g⁻¹).

Avaliando-se o efeito dos processamentos sobre a atividade antioxidante, as farinhas de grãos crus e tratados termicamente preservaram esta atividade, exceto o genótipo BRS 506 que reduziu ($p \geq 0,05$). No entanto, todos os genótipos de sorgo pipoca apresentaram redução da atividade antioxidante em até 80% ($p < 0,05$) (Figura 4).

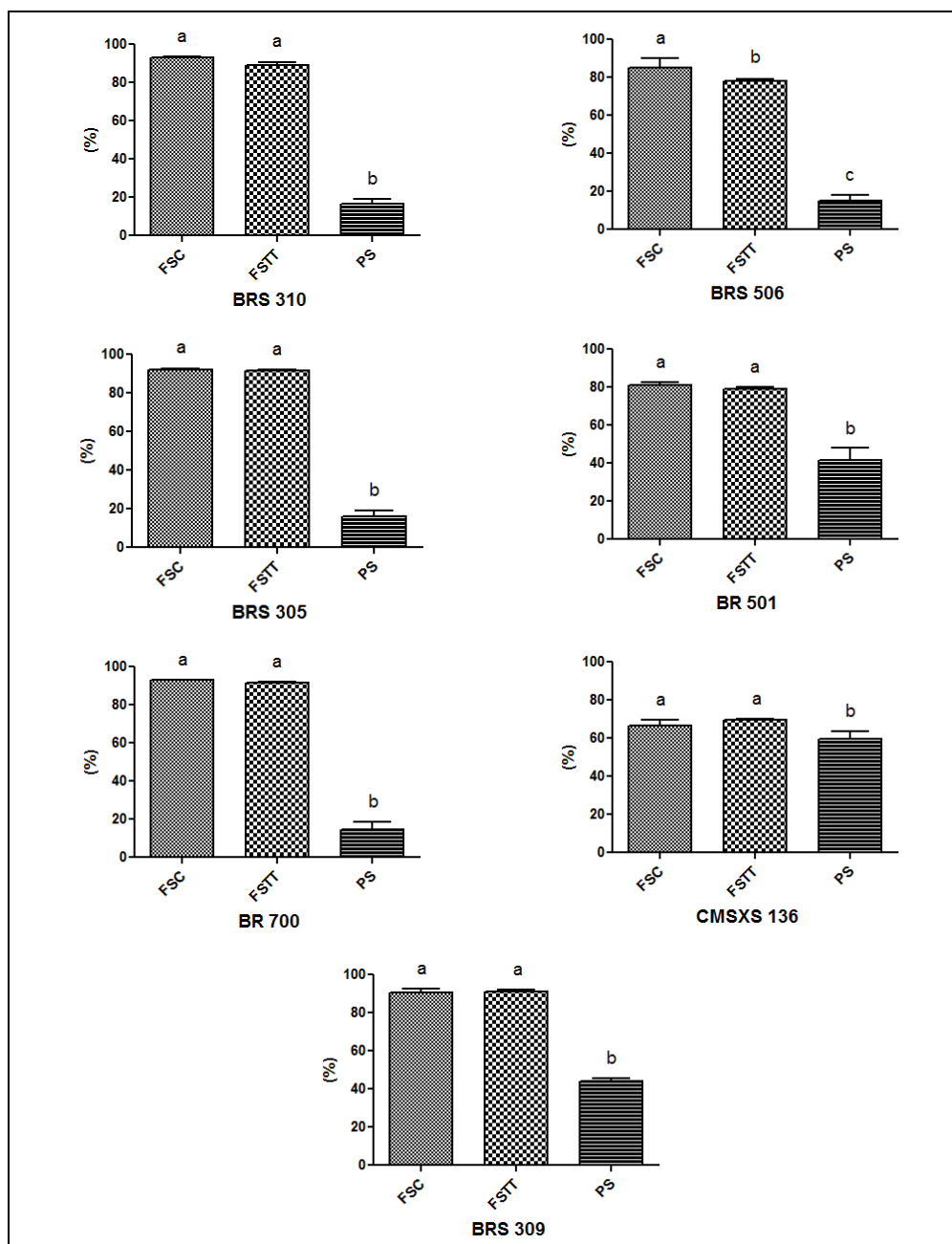


Figura 4- Atividade antioxidante em farinhas de grãos crus (FSC), submetidos ao tratamento térmico em estufa (FSTT) e pipoca (PS) de genótipos de sorgo.

O tratamento térmico em estufa proporcionou aumento da concentração de fenólicos totais em relação às farinhas dos grãos crus, com exceção dos genótipos BRS 506, CMSXS 136 e BRS 309 ($p < 0,05$). Os genótipos BRS 305

e BR 700 apresentaram maiores concentrações de fenólicos nas farinhas dos grãos crus comparadas à pipoca ($p<0,05$) (Figura 5).

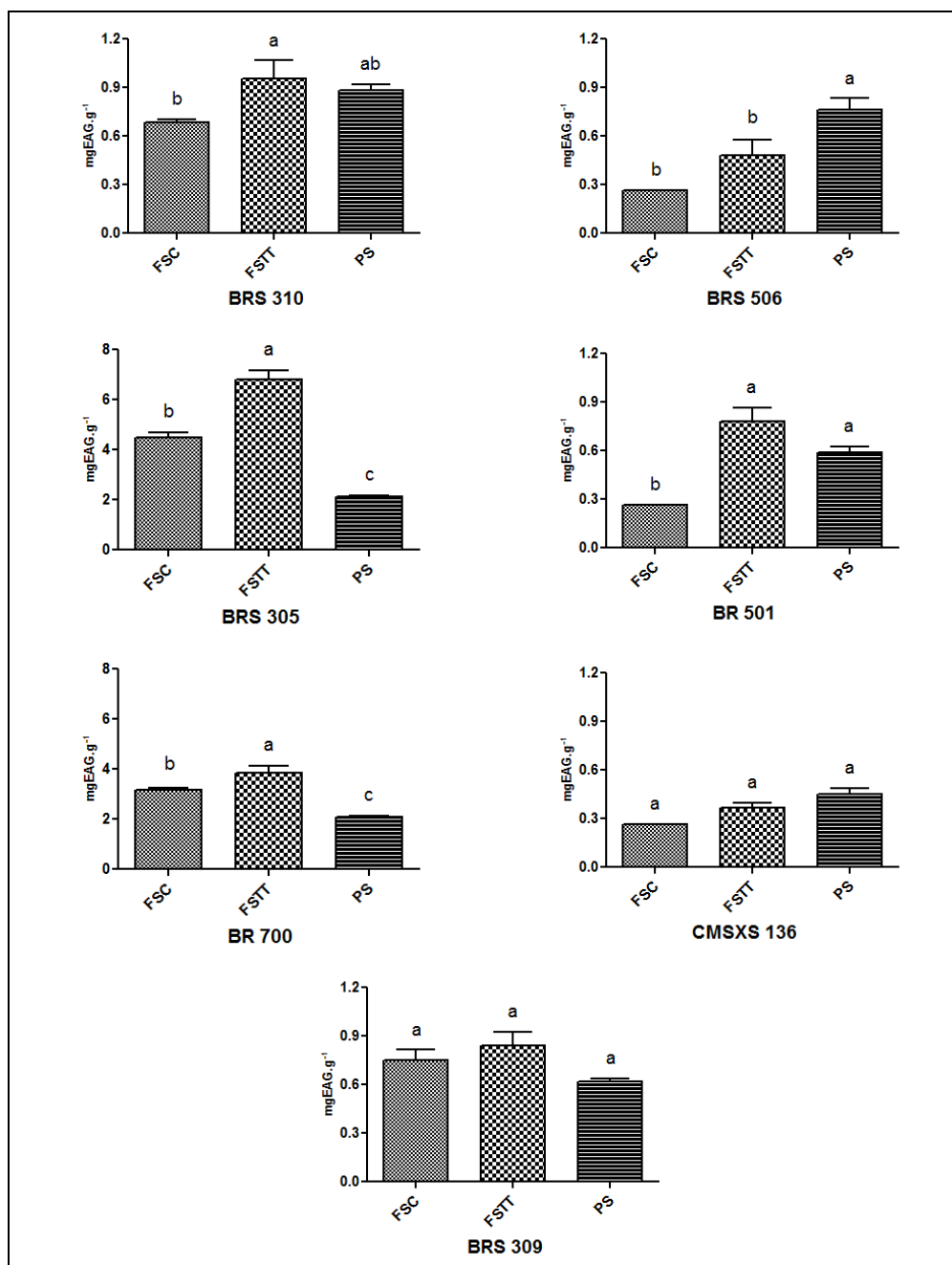


Figura 5- Concentração de fenólicos totais em farinhas de grãos crus (FSC), submetidos ao tratamento térmico em estufa (FSTT) e pipoca (PS) de genótipos de sorgo.

Farrar, Hartle, Hargrove, *et al.* (2008) demonstraram que cereais como aveia, arroz e trigo, possuem baixas concentrações de compostos fenólicos e baixa atividade antioxidante em comparação com o sorgo. A alta atividade antioxidante deste cereal pode ser comprovada no presente estudo, no qual esta foi de aproximadamente 90%.

A concentração de taninos dos genótipos BRS 310, BR 501, BR 700 e CMSXS 136 foram semelhantes entre as farinhas dos grãos crus e as dos grãos submetidos ao tratamento térmico em estufa ($p \geq 0,05$). No entanto, as pipocas de todos os genótipos de sorgo apresentaram redução do teor de taninos, em torno de 36 a 86% ($p < 0,05$) (Figura 6).

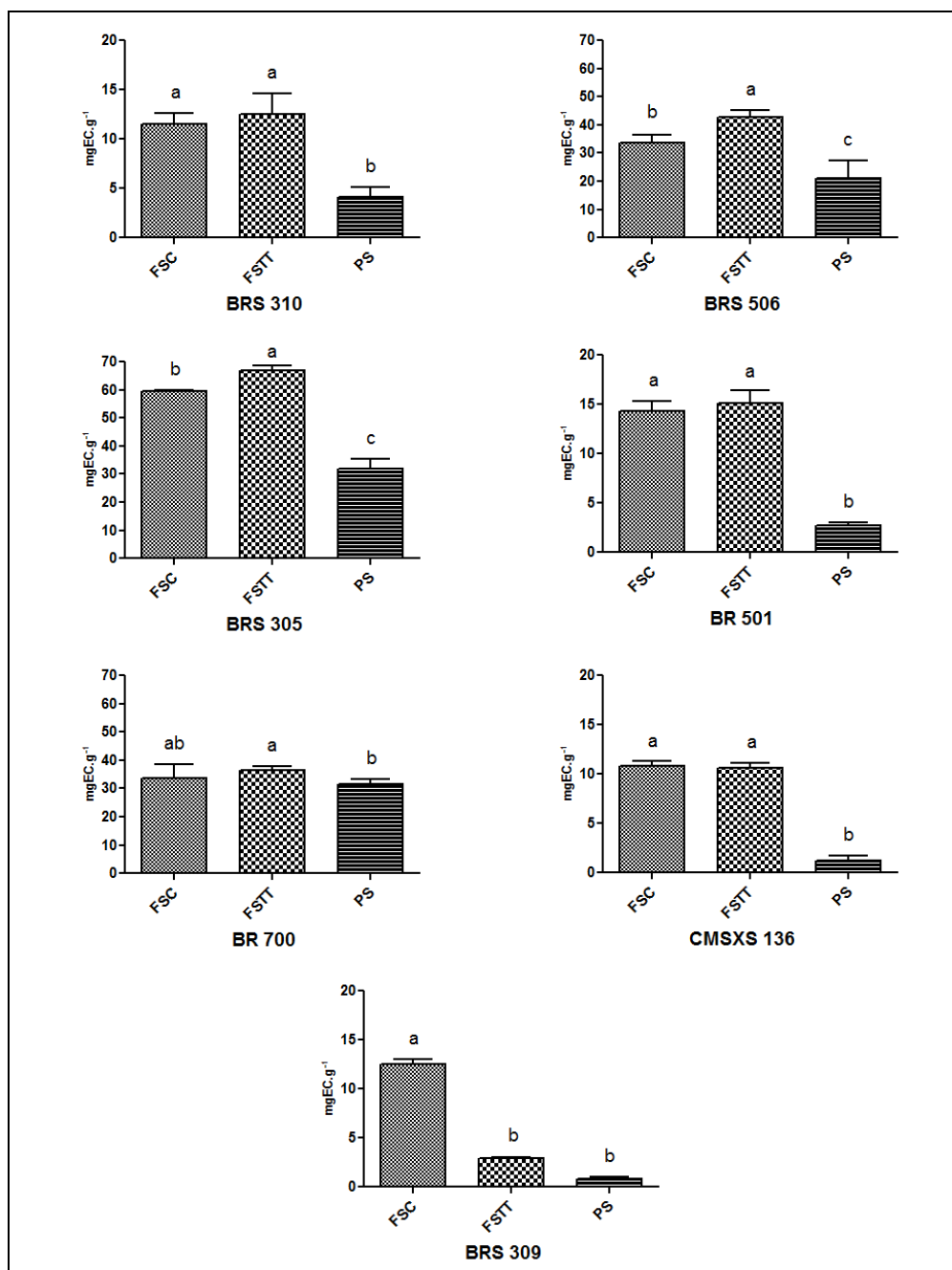


Figura 6- Concentração de tanino em farinhas de grãos crus (FSC), submetidos ao tratamento térmico em estufa (FSTT) e pipoca (PS) de genótipos de sorgo.

Modificação na concentração de taninos condensados também pode ser observada, devido à natureza altamente reativa desta molécula (DLAMINI,

DYKES, ROONEY, *et al.*, 2009). Procianidinas com alto grau de polimerização podem interagir com as proteínas e carboidratos durante o processamento (MEHANSHO, BUTLER e CARLSON, 1987). Estes complexos dificultam a extração do tanino, reduzindo a sua detecção por meio de métodos corriqueiros como o método vanilina/HCl. Awika, Dykes, Gu, *et al.* (2003), demonstraram redução de 73% das procianidinas em produtos extrusados de sorgo, corroborando aos resultados de presente estudo.

Os genótipos BRS 506, BRS 305, BR 700 e CMSXS 136 mantiveram a concentração de fitato após os processamentos aplicados ($p \geq 0,05$). Contudo, o genótipo BR 501 apresentou aumento de fitato para o sorgo pipoca ($p < 0,05$), enquanto, o BRS 310 apresentou redução em relação à farinha dos grãos crus e submetidos ao tratamento térmico ($p < 0,05$) (Figura 7).

Segundo Deshpande e Damodaran (1990) o fitato pode ser considerado bastante estável ao calor. No entanto, Mahgoub e Elhag (1998) verificaram que a trituração, a maceração, a maltagem, o tratamento térmico e a fermentação reduziram a concentração de fitato em quatro cultivares de sorgo. Os autores demonstraram ainda que, os métodos enzimáticos (maltagem e fermentação) foram mais eficazes na redução do que os métodos físicos (trituração, maceração e tratamento térmico).

A atividade antioxidante apresentou correlação positiva com as concentrações de fenólicos totais ($r=0,233$; $p=0,022$), taninos ($r=0,326$; $p=0,001$) e fitato ($r=0,287$; $p=0,006$), resultados que estão em conformidade com os apresentados por Dlamini, Taylor e Rooney (2007) que também demonstraram correlação positiva entre a atividade antioxidante de cultivares de sorgo e a presença de fenólicos totais e taninos. Quanto ao fitato alguns autores, relatam que este pode agir como antioxidante devido à posição dos grupos fosfatos presente no fitato que conferem à molécula a habilidade de quelar íons oxidativos, corroborando aos resultados do presente estudo (FILGUEIRAS, SOARES, SHIMOKOMAKI, *et al.*, 2009; KUMAR, SINHA, MAKAR, *et al.*, 2010).

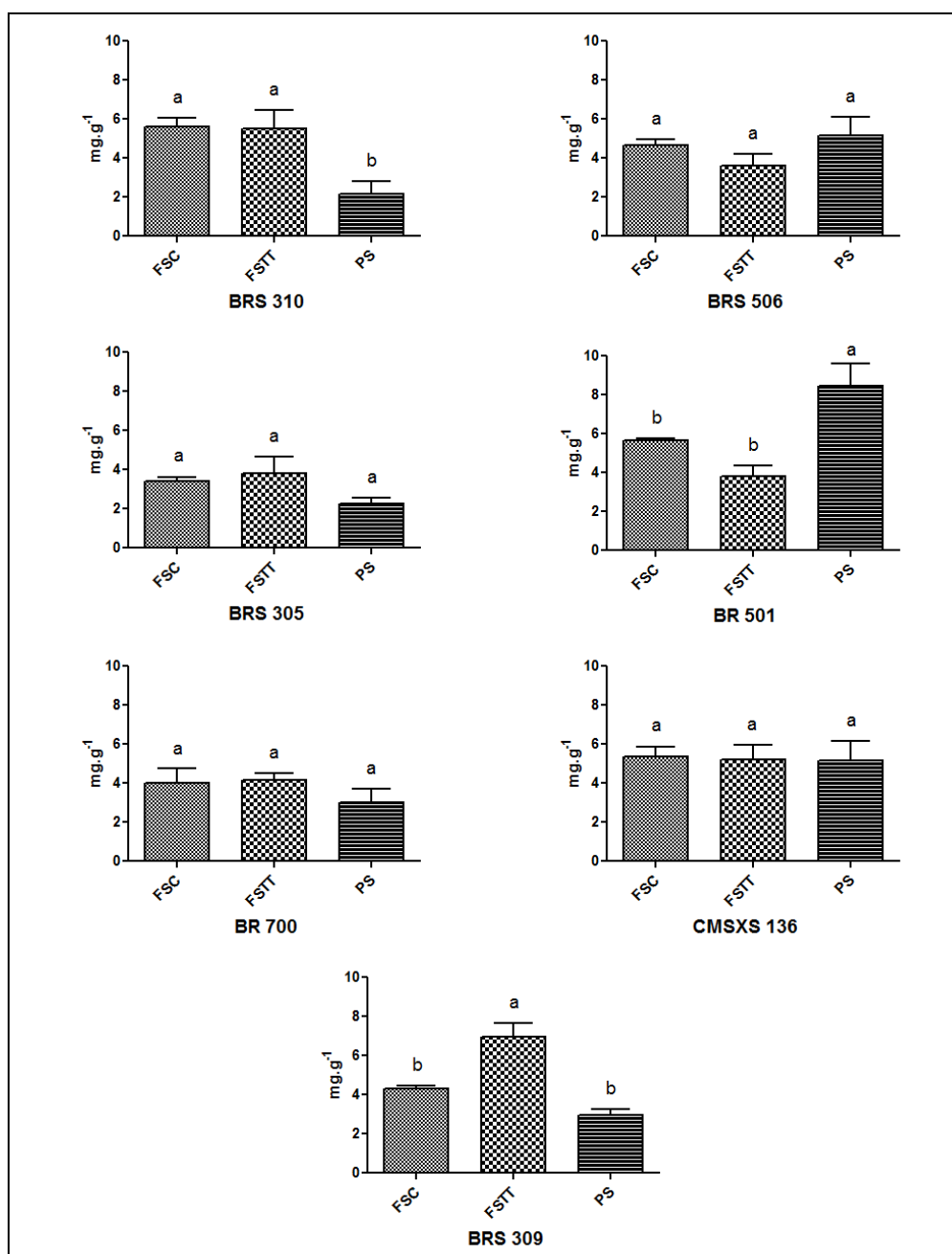


Figura 7- Concentração de fitato em farinhas de grãos crus (FSC), submetidos ao tratamento térmico em estufa (FSTT) e pipoca (PS) de genótipos de sorgo.

5.4. Conclusão

O tratamento térmico em estufa aplicado aos grãos aumentou o teor de fenólicos totais e manteve a atividade antioxidante e as concentrações de tanino e fitato em farinhas de sorgo. A extrusão favoreceu a redução da atividade antioxidante e a concentração de taninos em relação à farinha de grãos de sorgo cru.

Correlação positiva foi demonstrada entre a atividade antioxidante dos genótipos de sorgo com as concentrações de fenólicos totais, tanino e fitato. Os genótipos de sorgo sem tanino e com menores concentrações de fenólicos apresentaram atividade antioxidante semelhante aos com tanino.

Os genótipos de sorgo avaliados demonstraram elevada atividade antioxidante tornando-os promissores para utilização na alimentação humana. Assim, novos estudos deverão ser realizados para avaliar a atividade antioxidante desses compostos, em produtos elaborados a base de sorgo integral.

6. ARTIGO II

***In vivo* protein quality of new sorghum genotypes for human consumption**

ABSTRACT

The *in vivo* protein quality of flours from raw sorghum grains (RF) and flours from sorghum grains subjected to heat treatment in oven (HTF) were evaluated in BRS 305, BRS 309 and BRS 310 genotypes. No difference was found for feed efficiency ratio among experimental groups ($p \geq 0.05$). Heat-treated flour from BRS 309 and BRS 310 genotypes had higher protein efficiency ratio and net protein ratio values, however, they did not differ to flour from raw grain of BRS 310 genotype ($p < 0.05$). Heat treatment effect was observed in BRS 309 genotype. The heat treatment made no difference on true digestibility between RF and HTF of the three genotypes ($p \geq 0.05$). Lysine was the first limiting amino acid of the three sorghum genotypes. The HTF BRS 305 showed the lowest protein digestibility-corrected amino acid score value ($p < 0.05$). The heat treatment improved the protein quality of genotype BRS 309, however, there was no difference for other genotypes.

Key-words: *Sorghum bicolor* (L) Moench, amino acid profile, digestibility, PDCAAS, heat treatment.

6.1. Introduction

Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) is the largest source of calories and protein for millions of individuals, mainly in Africa and Asia (DICKO, GRUPPEN, TRAORÉ, *et al.*, 2006; MOHAMMED, MOHAMED e BABIKER, 2010). It is used to make porridges, beverages, bakery products, among other traditional foods (ANGLANI, 1998; SANCHEZ, 2003; MÉNDEZ-ALBORES, MARTÍNEZ-BUSTOS, VÉLES-MEDINA, *et al.*, 2009).

The protein content of sorghum corresponds to approximately 11.3% of the grain (USDA., 2010). The quality of its proteins and its amino acid composition can vary widely depending on both genetics and planting location (DEYOE e SHELLENBERGER, 1965).

The protein quality of sorghum can be linked to phenolic compounds, such as tannins. These compounds are complexed to proteins, preventing their digestion and subsequent absorption (DYKES e ROONEY, 2006). Cyanogenic compounds, such as dhuririn, show toxic potential when hydrolyzed by their glucosidases (MORANT, JØRGENSEN, JØRGENSEN, *et al.*, 2008) and could impair the animal growth.

Another determinant of the protein quality of the cereal is the technique of food processing. The cooking of sorghum for the production of porridge is the most commonly used one (DUODU, TAYLOR, BELTON, *et al.*, 2003). *In vitro* studies have shown that wet cooking reduces the digestibility of sorghum compared to other cereals (MERTZ, HASSEN, CAIRNS-WHITTERN, *et al.*, 1984; HAMAKER, KIRLEIS, MERTZ, *et al.*, 1986). According to some authors, the lower protein quality of this cereal when cooked is due to polymerization of sorghum storage proteins, prolamins and kafirin through the disulfide bond (HAMAKER, KIRLEIS, MERTZ, *et al.*, 1986; DUODU, TAYLOR, BELTON, *et al.*, 2003), which also causes changes in protein secondary structure, from α -helical to β -laminar (EMMAMBUX e TAYLOR, 2009). However, very few studies investigate the effect of dry heat treatment on the quality of sorghum protein. Recently, Correia, Nunes, Barros & Delgadillo (2010) observed in *in vitro* model that thermal processing methods, such as wet cooking, reduce the digestibility of sorghum and that dry heat and extrusion do not cause any effect.

Considering the feeding potential of sorghum, Embrapa Maize and Sorghum has been developing research in order to characterize genotypes with

superior technological and nutritional quality, aiming at encouraging the use of sorghum in human feeding. The aim of this study was to evaluate the *in vivo* protein quality of flours from raw sorghum grains (RF) and flour from sorghum grains subjected to heat treatment in oven (HTF).

6.2. Material and methods

Sorghum genotypes samples

Three sorghum genotypes were analyzed in this study, all of them developed and supplied by Embrapa Maize and Sorghum - Sete Lagoas - MG, Brazil: BRS 305 (light brown pericarp, with testa), BRS 309 (white pericarp, without testa) and BRS 310 (red pericarp, without testa). The cultivation of sorghum genotypes was conducted using spacing between rows of 0.70 m, mean density of 140,000 plants per hectare. Fertilization after planting was 350 kg.ha⁻¹ of the formula 08-28-16 + 0.5% Zn. Fertilization was 100 kg.ha⁻¹ of urea applied 40 days after germination. The planting was in Sete Lagoas, MG, Brazil, in February 2009.

Flour preparation of sorghum genotypes

The sorghum grains were manually selected and sifted to remove dirt and impurities. To prepare the flours from grains subjected to heat treatment, the grains of the three sorghum genotypes were exposed to 105°C in an oven with air circulation (Nova Ética®, model 400/6ND, Vargem Grande Paulista, São Paulo), as proposed by Souza, Dantas, Silva, Souza, Almeida & Silva (2005), but modifying the exposure time to 30 minutes. Afterwards, raw and heat-treated grains were ground with pericarp in knives mill (C.W. Brasender®, Dusburg, Germany) in order to obtain flour with a particle size of 850 µm.

Biologic Assay

Diet composition was based on AIN-93G, according to Reeves, Nielsen & Fahey (1993), with modification in the protein content to 9%. The diets were homogenized in industrial mixer (Lieme®). After preparation, the protein content was determined for each diet by semimicro Kjeldahl method, according to

AOAC (2002). The diets were packed in plastic bags, properly labeled and stored in refrigerator.

All experimental diets were formulated so that they all presented the same energy density. The cellulose concentration was changed to 10.2% depending on the fiber content of sorghum genotypes, equaling the concentration of this nutrient among all diets (Table 5).

Table 5- Composition of experimental protein-free diet, with casein and with sorghum grain flours of genotypes BRS 305, BRS 309 and BRS 310 raw (RF) and subjected to heat treatment (HTF) (g.100g⁻¹).

Ingredients	Experimental diets							
	Protein-free	Casein	BRS 305 RF	BRS 305 HTF	BRS 309 RF	BRS 309 HTF	BRS 310 RF	BRS 310 HTF
BRS 305 RF	0	0	89.0	0	0	0	0	0
BRS 305 HTF	0	0	0	89.0	0	0	0	0
BRS 309 RF	0	0	0	0	75.2	0	0	0
BRS 309 HTF	0	0	0	0	0	75.2	0	0
BRS 310 RF	0	0	0	0	0	0	77.7	0
BRS 310 HTF	0	0	0	0	0	0	0	77.7
Casein	0	11	0	0	0	0	0	0
Maltodextrin	13.2	12.5	0	0	9.4	9.4	7.7	7.7
Sucrose	10	9.5	1.2	1.2	0	0	0	0
Soybean oil	7	7	4.7	4.7	4.8	4.8	4.6	4.6
Cellulose	10.2	10.2	0	0	3.3	3.3	2.6	2.6
Mineral mix	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mix	1	1	1	1	1	1	1	1
L-cystine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Corn starch	54.6	45.1	0.3	0.3	2.5	2.5	2.6	2.6

Animals

The experiment was carried out with forty-eight male rats (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia mammalia), Wistar, recently weaned, 23 days of age and weighing between 51-60 g, from the vivarium of the Center for Biological Sciences and Health, of the Federal University of Viçosa.

The animals were randomly divided into eight groups of six animals, so that the difference between mean weights did not exceed 2.2g, as recommended by AOAC (2002). The rats were kept in individual stainless steel cages and maintained at 22 ± 3°C and 12 h light/dark cycle.

The animal groups were fed the following diets: protein-free diet, casein, and diets with flour from raw sorghum (RF) and flour from heat-treated grains (HTF) of the genotypes BRS 305, BRS 309 e BRS 310 (Table 5). During the 14 days, animals received the experimental diets and deionized water *ad libitum*.

The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Veterinary Department, Federal University of Viçosa, Brazil (Protocol nº28/2010).

Feed efficiency ratio

During the experimental period, animals were weighed at the 1st, 7th and 14th days and the feed efficiency ratio (FER) was determined, which represents relationship between weight gain (g) and diet intake by animals (g).

Protein efficiency ratio and net protein ratio

The protein efficiency ratio (PER) was determined by Hegsted method (1977), which relates the weight gain of animals (g) with the protein intake (g), but modified for 14 days of experiment. The relative protein efficiency ratio (R-PER) was determined considering the PER result of casein diet as 100%.

Net protein ratio (NPR) was calculated according to Bender & Doell (1957), taking into account the weight gain of test group (g) and the weight loss of non-protein diet group (g) in relation to test group's protein consumption (g). The relative net protein ratio (R-NPR) was determined considering the NPR result of casein diet as 100%.

True Digestibility

In order to determine the true digestibility (TD), diets were stained with indigo carmine dye 0.2%. These diets were offered to animals on the 8th and 11th days. The stained feces were collected at the 9th day, as well as all the feces at the 10th and 11th days and the unstained feces on the 12th day. The feces collected were stored in individual containers for each animal and kept under refrigeration. Subsequently, the feces were dried in an oven (Marconi®, model MA 035, Piracicaba, Brazil) at 105°C for 24 h, then they were cooled, weighed and crushed in multiprocessor (Arno®) for determining the nitrogen concentration by semimicro Kjeldahl method (AOAC, 1997), with samples in triplicate.

TD was calculated by measuring the amount of nitrogen ingested in the diet excreted on feces and metabolic fecal loss, which corresponded to the fecal nitrogen of the of protein-free diet group.

Amino acid composition

Previously defatted sorghum flours were hydrolyzed by hydrochloric acid for 24 h at $110 \pm 1^\circ\text{C}$ and again hydrolyzed by alkaline with 4 M lithium hydroxide, to quantify tryptophan. Samples were filtered and aliquots were inserted into cationic exchange columns of the analyzer (short column for basic aminoacids and tryptophan, and long column for acid and neutral aminoacids) and eluted by pH difference and ionic force (short column pH 5.28 and long column pH 3.25 and later 4.25). Amino acid was detected by eluted aminoacid in the column, reacting with ninhydrine, and quantified by spectrophotometry (PG Instrumental, model T70+ UV/visible spectrometer, Leics, United Kingdom) at 440 nm for proline and 570 nm for others amino acids (SPACKMAN, STEIN e MOORE, 1958). Amino acid composition was presented as g.100g^{-1} of sample.

The amino acid composition and subsequent calculation of chemical score and chemical score corrected by digestibility were determined in heat-treated sorghum flours at 105°C for 30 minutes.

Amino acid score and protein digestibility-corrected amino acid score

To calculate amino acid score (AAS) and the protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS), the amino acid content values were expressed as milligrams of amino acid per gram of protein and compared with those of FAO/WHO (2007). The obtained data were used in the determination of nitrogen, protein, essential amino acids, amino acid score and true digestibility.

The calculation of PDCAAS took as basis the amino acid score value of the most limiting essential amino acid (AAS lower than 1.0) of each protein source. PDCAAS was calculated by multiplying the essential amino acid lowest score by the true digestibility of protein. Protein with PDCAAS ≥ 100 was considered of good quality (HENLEY e KUSTER, 1994).

Statistical analysis

Experimental treatments were arranged in blocks of six repetitions, so that the average initial weights of animals were similar.

The results were analyzed by ANOVA ($\alpha=5\%$). For significant "F", *post hoc* Dunnett test at 5% probability was used to compare each test group with casein group (control). Duncan test was performed with a probability of 5% in order to compare the averages achieved when evaluating the effect of heat

treatment, both on protein quality of raw and heat-treated sorghum flours and on the amino acid content and PDCAAS of flours undergoing treatment. The mean dispersion was expressed as standard deviation.

Statistical analysis was performed using SAEG program for statistical analysis, version 9.1, licensed for use by the Federal University of Viçosa, MG.

6.3. Results and discussion

Feed efficiency ratio

The diets were isocaloric and isoproteic, ranging between 3.0 and 3.8 kcal.g⁻¹ and between 9.0 and 9.9% ($p \geq 0.05$) respectively, as planned (Table 6). There was no difference in FER between casein and test groups, nor between groups fed by raw and heat-treated flours diets ($p \geq 0.05$). The similarity between the FER values indicated that diets were isocaloric and the weight gain difference was due to protein quality of raw materials (Table 6).

Table 6 - Caloric density of diets (CD), percentage of protein in diets (PD), feed efficiency ratio (FER), food intake (FI) and weight gain (WG) of diets with casein, sorghum grain flours of genotypes BRS 305, BRS 309 and BRS 310 raw (RF) and subjected to heat treatment (HTF).

Diet	CD	PD (%)*	FER**	FI (g)	WG (g)
Casein	3.8	9.0 ^A ± 0.45	0.26 ^A ± 0.03	151.87 ^A ± 17.78	39.33 ^A ± 8.45
BRS 305 RF	3.0	9.5 ^A ± 0.69	0.05 ^{Aa} ± 0.01	100.69 ^{Ba} ± 6.03	4.66 ^{Bbc} ± 1.63
BRS 305 HTF	3.0	9.5 ^A ± 0.05	0.03 ^{Aa} ± 0.02	89.54 ^{Ba} ± 10.00	3.00 ^{Bc} ± 2.28
BRS 309 RF	3.4	8.8 ^A ± 0.09	0.05 ^{Aa} ± 0.02	96.50 ^{Ba} ± 5.59	5.00 ^{Bbc} ± 2.66
BRS 309 HTF	3.4	9.3 ^A ± 0.08	0.10 ^{Aa} ± 0.02	97.58 ^{Ba} ± 7.20	9.66 ^{Ba} ± 2.25
BRS 310 RF	3.3	9.3 ^A ± 0.78	0.08 ^{Aa} ± 0.05	104.19 ^{Ba} ± 18.79	8.50 ^{Bab} ± 5.79
BRS 310 HTF	3.3	9.9 ^A ± 0.22	0.09 ^{Aa} ± 0.02	103.42 ^{Ba} ± 12.37	10.00 ^{Ba} ± 3.03

Means do not differ from each other according to ANOVA * ($p = 0.317$) ** ($p = 0.059$); Means followed by the same capital letters in columns do not differ from each other according to Dunnett test ($p < 0.05$). Means followed by the same small letters in columns do not differ from each other according to Duncan test ($p < 0.05$).

Food intake and body weight gain of casein-fed animals were higher in relation to test groups ($p < 0.05$). The quality of the standard protein (animal origin) and the proteins from test diets (vegetable origin) justifies the differences between parameters (Table 6).

The heat treatment did not affect food intake in groups fed on flours from raw and heat-treated grains diets ($p \geq 0.05$). However, the weight gain in the animals fed on flour from heat-treated grains of BRS 309 genotype was

approximately twice higher than in the animals fed on raw grain flour of the same genotype ($p < 0.05$). The treatment had no effect on the weight gain of animals fed by flours from raw and heat-treated grains of genotypes BRS 305 and BRS 310 ($p \geq 0.05$) (Table 6).

Protein efficiency ratio and Net protein ratio

The PER and NPR of the casein-fed animals were higher compared to the experimental groups ($p < 0.05$) as observed in the animal weight gain (Table 7).

Heat-treated flour from BRS 309 and BRS 310 genotypes had higher PER and NPR values, however, they did not differ from raw grain flour of BRS 310 genotype ($p < 0.05$). Heat treatment effect was observed at BRS 309 genotype. Heat-treated flour from BRS 309 had higher PER and NPR values than the raw flour ($p \geq 0.05$) (Table 7).

Table 7- Protein Efficiency Ratio (PER) and Net Protein Ratio (NPR) of diets with casein, sorghum grain flours of genotypes BRS 305, BRS 309 and BRS 310 raw (RF) and subjected to heat treatment (HTF).

Diet	PER	R-PER (%)	NPR	R-NPR (%)
Casein	2.87 ^A $\pm$ 0.33	100.00	3.44 ^A $\pm$ 0.29	100.00
BRS 305 RF	0.49 ^{Bbc} $\pm$ 0.15	16.97	1.30 ^{Bc} $\pm$ 0.13	37.68
BRS 305 HTF	0.35 ^{Bc} $\pm$ 0.28	12.11	1.28 ^{Bc} $\pm$ 0.23	37.33
BRS 309 RF	0.58 ^{Bbc} $\pm$ 0.26	17.42	1.49 ^{Bbc} $\pm$ 0.22	43.36
BRS 309 HTF	1.06 ^{Ba} $\pm$ 0.23	37.15	1.91 ^{Ba} $\pm$ 0.23	55.71
BRS 310 RF	0.83 ^{Bab} $\pm$ 0.49	29.06	1.64 ^{Bab} $\pm$ 0.42	47.96
BRS 310 HTF	0.98 ^{Ba} $\pm$ 0.21	34.34	1.76 ^{Bab} $\pm$ 0.14	51.29

Means followed by the same capital letters in columns do not differ from each other according to Dunnett test ($p < 0.05$). Means followed by the same small letters in columns do not differ from each other according to Duncan test ($p < 0.05$).

The improvement of biological indices of heat-treated flour from BRS 309 genotype might be attributed to the denaturation/inactivation of the β -glucosidase, dhurrinase 1. This genotype was developed from the intersection of lineage sorghum CMSXS 182 that contains the cyanogenic compound dhurrin and it kept this compound in its content (PRATES, SCHAFFERT, SANTOS, *et al.*, 1998). In monocotyledons such as sorghum, the enzyme substrate, dhurrin, is stored exclusively in the epidermal layer of the cells, while its β -glucosidase is stored in the chloroplasts. Thus, when plant tissue is disrupted, as in the present study in order to obtain sorghum flour, there is substrate hydrolysis releasing toxic HCN (MORANT, JØRGENSEN,

JØRGENSEN, *et al.*, 2008). However, the exposure of raw grains to heat before being milled may have inactivated the enzyme action and prevented the HCN formation.

The PER and NPR values found in the flour from raw grains of the BRS 309 genotype were similar to those found in the flours from both raw and heat-treated grains of BRS 305 genotype ($p \geq 0.05$). These results might be explained by the formation of HCN in the flour from raw grains of BRS 309 genotype. The short period of the experiment prevented the animals from suffering the toxic effect of this compound, yet its presence caused the lowest weight gain, reflecting on the analyzed biological indices. Similarly, in BRS 305 genotype, this fact is due to the presence of tannins, confirmed by the pigment testa in the grain. The flour from raw grains showed a 60 mgEC.g^{-1} content whereas the flour from heat-treated grains at 105°C for 15 minutes increased this phenol content by approximately 10% (unpublished data).

Neither the use nor the crops of sorghum genotypes with dhurrina are rare, since they are more resistant to bird attacks (PRATES, SCHAFFERT, SANTOS, *et al.*, 1998). Given the results in this paper, additional studies are necessary on the dhurrina toxic action or its antinutritional effect on biological growth parameters, and also on the heat treatment effect on this compound, since sorghum with these characteristics may be being mistakenly used.

The PER value ranged between 0.35 and 1.06 for heat-treated flour from genotype BRS 305 and BRS 309, respectively. According to Friedman & Gumbmann (1986), protein sources with PER values lower than 1.5 are of poor quality, thus, sorghum proteins can be classified as a low-quality protein. Although sorghum has showed the referred low-quality protein, the application of heat treatment on grain increased the values of biological indices, especially for genotype BRS 309.

Comparing PER values of sorghum and other cereals, the heat-treated flours of genotypes BRS 309 and BRS 310 had PER values similar to animals fed with wheat flour (0.98), which is higher than the value obtained for animals fed with corn meal (0.68) (PIRES, OLIVEIRA, ROSA, *et al.*, 2006) and lower than the ones fed with rice (2.57) and quinoa (2.13) (MENDES, OLIVEIRA, COSTA, *et al.*, 2009). Higher NPR values were presented by corn meal (3.89), wheat flour (2.38), rice (3.62) and quinoa (3.68) when compared to all sorghum

genotypes (PIRES, OLIVEIRA, ROSA, *et al.*, 2006; MENDES, OLIVEIRA, COSTA, *et al.*, 2009).

True digestibility

The nitrogen intake was higher in the casein group than in the test group ($p < 0.05$). Among the groups that received flours from raw and heat-treated grains, there was no difference in nitrogen intake levels ($p \geq 0.05$). However, the fecal nitrogen excretion was higher in animals fed on flours from both raw and heat-treated grains of genotype BRS 305, both in relation to control group and test diets ($p < 0.05$) (Table 8).

Among the groups that received flours from raw and heat-treated grains, both nitrogen consumption and its excretion by the animals were similar, except for both groups of BRS 305 genotype, which had higher excretion of nitrogen. This may be associated with the presence of tannins in genotype BRS 305, which agrees with Al-Mamary, Molham, Abdulwali & Al-Obeidi (2001), who highlighted that the increased nitrogen excretion by animals fed on high tannin sorghum is caused by the impaired protein digestion plus the interaction between the tannins and the intestinal mucus glycoproteins.

Table 8- Nitrogen intake (NI), nitrogen excretion (NE) and true digestibility (TD) of diets with casein, sorghum grain flours of genotypes BRS 305, BRS 309 and BRS 310 raw (RF) and subjected to heat treatment (HTF).

Diet	NI(g)	NE(g)	TD
Casein	$0.53^A \pm 0.05$	$0.28^A \pm 0.01$	$93.94^A \pm 1.88$
BRS 305 RF	$0.31^{Ba} \pm 0.02$	$0.79^{Ba} \pm 0.01$	$63.40^{Bb} \pm 6.03$
BRS 305 HTF	$0.28^{Ba} \pm 0.04$	$0.81^{Ba} \pm 0.02$	$57.58^{Bb} \pm 7.22$
BRS 309 RF	$0.30^{Ba} \pm 0.03$	$0.32^{Ab} \pm 0.01$	$87.58^{Aa} \pm 4.00$
BRS 309 HTF	$0.32^{Ba} \pm 0.03$	$0.35^{Ab} \pm 0.01$	$86.73^{Aa} \pm 4.09$
BRS 310 RF	$0.33^{Ba} \pm 0.06$	$0.37^{Ab} \pm 0.02$	$86.39^{Aa} \pm 7.08$
BRS 310 HTF	$0.34^{Ba} \pm 0.05$	$0.37^{Ab} \pm 0.02$	$86.74^{Aa} \pm 2.71$

Means followed by the same capital letters in columns do not differ from each other according to Dunnett test ($p < 0.05$). Means followed by the same small letters in columns do not differ from each other according to Duncan test ($p < 0.05$).

True digestibility of flours from raw and heat-treated grains of BRS 309 and BRS 310 genotypes were similar to that of casein (control) ($p \geq 0.05$). However, the flours from raw and heat-treated grains of BRS 305 showed lower digestibility when compared to control and test diet groups ($p < 0.05$). The heat treatment made no difference on the true digestibility between raw and heat-treated flours ($p \geq 0.05$) (Table 4). Correia *et al.* (2010) also found that

sorghum flours treated in a water bath for 90 minutes do not alter the digestibility *in vitro* compared to non-processed flours.

The true digestibility similarity between casein and both raw and heat-treated flours from BRS 309 and BRS 310 genotypes indicated that the proteins of sorghum were properly hydrolyzed by the digestive enzymes, not being affected by the first factor that alters the efficiency of protein utilization (FRIEDMAN e GUMBMANN, 1986). However, these sorghum genotypes were classified as low-quality protein due to the low PER values and therefore, they have not been suitable to promote growth and development of animals. In this study there probably was a high retention of nitrogen from not essential sources, which possibly led to imbalance in the supply of essential amino acids, affecting the quality of sorghum protein.

All sorghum varieties showed higher digestibility than corn meal (82%) (PIRES, OLIVEIRA, ROSA, *et al.*, 2006). Except to the BRS 305 genotype, both with and without heat treatment, the other genotypes showed higher digestibility than wheat (89%) and quinoa (85%) (PIRES, OLIVEIRA, ROSA, *et al.*, 2006; MENDES, OLIVEIRA, COSTA, *et al.*, 2009).

Amino acid composition

The BRS 310 heat-treated flours showed higher concentrations of cysteine, phenylalanine, threonine, tyrosine, glutamic acid, glycine, proline and serine ($p < 0.05$). The concentrations of isoleucine, leucine, aspartic acid and valine were similar between BRS 310 and BRS 309 genotypes ($p \geq 0.05$). The BRS 305 showed low concentrations of essential amino acids when compared to others ($p < 0.05$) and this fact, along with the presence of tannins and the increased excretion of fecal nitrogen justify the lower weight gain in this experimental group (Table 9).

Table 9- Aminoacid contents (g/100g) of sorghum grain flours of genotypes BRS 305, BRS 309 and BRS 310 subjected to heat treatment (105°C/ 30 Minutes).

Aminoacid	Sorghum genotypes		
	BRS 305 HTF	BRS 309 HTF	BRS 310 HTF
<i>Indispensable</i>			
½ Cystine	0.09 ^c ± 0.00	0.10 ^b ± 0.00	0.1 ^a ± 0.00
Histidine	0.23 ^b ± 0.00	0.32 ^a ± 0.00	0.32 ^a ± 0.01
Isoleucine	0.21 ^b ± 0.00	0.29 ^a ± 0.00	0.30 ^a ± 0.01
Leucine	0.77 ^b ± 0.01	1.08 ^a ± 0.01	1.10 ^a ± 0.01
Lysine	0.20 ^c ± 0.00	0.31 ^a ± 0.00	0.26 ^b ± 0.02
Methionine	0.13 ^a ± 0.00	0.14 ^a ± 0.00	0.13 ^a ± 0.01
Phenylalanine	0.34 ^c ± 0.0	0.43 ^b ± 0.01	0.49 ^a ± 0.00
Threonine	0.25 ^c ± 0.02	0.31 ^b ± 0.01	0.34 ^a ± 0.00
Tryptophan	0.09 ^c ± 0.00	0.17 ^a ± 0.00	0.16 ^b ± 0.00
Tyrosine	0.24 ^c ± 0.01	0.27 ^b ± 0.01	0.34 ^a ± 0.00
Valine	0.26 ^b ± 0.00	0.35 ^a ± 0.01	0.36 ^a ± 0.01
<i>Total</i>	2.81	3.77	3.91
<i>Dispensable</i>			
Alanine	0.55 ^b ± 0.01	0.76 ^a ± 0.01	0.75 ^a ± 0.00
Arginine	0.28 ^c ± 0.00	0.46 ^a ± 0.00	0.36 ^b ± 0.01
Aspartic acid	0.48 ^b ± 0.00	0.67 ^a ± 0.01	0.70 ^a ± 0.01
Glutamic acid	1.18 ^c ± 0.01	1.56 ^b ± 0.01	1.65 ^a ± 0.05
Glycine	0.23 ^c ± 0.00	0.27 ^b ± 0.00	0.29 ^a ± 0.01
Proline	0.60 ^c ± 0.00	0.67 ^b ± 0.00	0.77 ^a ± 0.01
Serine	0.32 ^c ± 0.00	0.39 ^b ± 0.00	0.45 ^a ± 0.00
<i>Total</i>	3.64	4.78	4.97

Means followed by the same letters in lines do not differ from each other according to Duncan test ($p < 0.05$).

Amino acid score and protein digestibility-corrected amino acid score

Among the essential amino acids analyzed in heat-treated flours of the three sorghum genotypes lysine, the limiting amino acids were lysine, isoleucine, cystine, methionine, valine and threonine (except BRS 310). Lysine was the first limiting amino acid due to the lowest amino acid score found for it. However, Mokrane, Amoura, Belhaneche-Bensemra, Courtin, Delcour & Nadjemi (2010) found that, among five sorghum cultivars tested, only three essential amino acids were limiting: lysine, methionine and cysteine. It is noteworthy that the amino acids concentrations might vary widely depending on the influence of sorghum genetics and planting location (DEYOE e SHELLENBERGER, 1965) (Table 10).

Comparing the amino acid scores of sorghum and other cereals (PIRES, OLIVEIRA, ROSA, *et al.*, 2006) it was shown that wheat and corn are deficient in these amino acids and also have lysine as the first limiting amino acid (ONYANGO, NOETZOLD, BLEY, *et al.*, 2004).

PDCAAS values ranged between 33% and 46% for genotypes BRS 305 and BRS 309, respectively. The PDCAAS values obtained for BRS 309 and

BRS 310 were similar ($p \geq 0.05$). Therefore, it is possible to conclude that the proteins of the analyzed sorghum genotypes are of low quality since they have PDCAAS values lower than 50%. Sorghum genotypes showed PDCAAS values similar to other cereals such as corn (37%) and wheat (40%) (PIRES, OLIVEIRA, ROSA, *et al.*, 2006).

Table 10- Amino acid score (AAS) and protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS), according to FAO/WHO (2007) of sorghum grain flours of genotypes BRS 305, BRS 309 and BRS 310 subjected to heat treatment (105°C/ 30 Minutes).

Essential aminoacids	BRS 305 HTF			BRS 309 HTF			BRS 310 HTF			FAO/WHO 2007
	mg aa/g ptn	AAS	PDCAAS*	mg aa/g ptn	AAS	PDCAAS*	mg aa/g ptn	ASS	PDCAAS*	
Tryptophan	9.43	1.27		14.25	1.92		14.09	1.90		7.4
Lysine	20.15	0.38		25.66	0.49		22.68	0.43		52.0
Histidine	23.27	1.29		26.58	1.47		27.28	1.51		18.0
Threonine	24.6	0.91		25.86	0.95		29.29	1.08		27.0
1/2 Cystine + Methionine	22.07	0.84	33.4 ^b ± 0.57	20.35	0.78	47.0 ^a ± 0.65	21.3	0.81	42.4 ^a ± 2.70	26.0
Valine	25.27	0.60		28.85	0.68		30.99	0.73		42.0
Isoleucine	21.01	0.67		24.45	0.78		25.97	0.83		31.0
Leucine	76.31	1.21		90.17	1.43		94.94	1.50		63.0
Tyrosine + Phenylalanine	56.68	1.23		58.73	1.27		71.66	1.55		46.0

* Means followed by the same letters in lines do not differ from each other according to Duncan test ($p < 0.05$).

In the *in vitro* model of raw sorghum flour, PDCAAS values ranged between 6 and 20%, considering lysine the first limiting aminoacid, which is approximately twice smaller than the values obtained in this study (MOKRANE, AMOURA, BELHANECHÉ-BENSEMRA, *et al.*, 2010).

6.4. Conclusion

The heat treatment improved the protein quality of the BRS 309 genotype, with dhurrin and without tannins, by doubling the PER value.

The amino acid profile of sorghum was the main limitation of protein quality because, although the true digestibility of sorghum with and without heat treatment and without tannin was high, the growth of animals was inadequate.

Though the sorghums have showed low quality protein, the values were similar and sometimes higher than those found in other grains, which indicates that their replacement by sorghum does not lead to losses in the alimentation.

7. ARTIGO III

Resposta à inflamação, estresse oxidativo e morfologia intestinal de ratos alimentados com dietas hiperlipídicas adicionadas de sorgo

Resumo

A obesidade está relacionada ao estado pró-inflamatório de baixo grau e ao estresse oxidativo. A adição de cereais integrais à dieta pode auxiliar na prevenção da obesidade e co-morbididades. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da adição de farinhas de grãos de diferentes genótipos de sorgo à dieta hiperlipídica sobre o perfil lipídico, a glicose sanguínea, o estresse oxidativo, a inflamação e a morfologia intestinal de ratos Wistar adultos. Os animais receberam dietas AIN-93M, hiperlipídica controle (DHC), hiperlipídicas adicionadas de sorgo BRS 305 (DHS 305), BRS 309 (DHS 309) e BRS 310 (DHS 310). O consumo do grupo AIN-93M foi maior que os grupos DHC, DHS 305 e DHS 310 ($p < 0,05$). O consumo energético, peso final, ganho de peso corpóreo, gordura epididimária e o coeficiente de eficiência alimentar foram semelhantes entre os grupos experimentais, assim como as concentrações de glicose, frutossamina, colesterol total e HDL-colesterol, triglicerídeos, enzimas hepáticas e superóxido dismutase ($p \geq 0,05$). O grupo DHS 310 apresentou menores concentrações de malondialdeído e TNF- α ($p < 0,05$). A altura das vilosidades do DHC, DHS 305, DHS 309 e DHS 310 não diferiram entre si ($p \geq 0,05$). Conclui-se que o genótipo BRS 310 foi o mais eficiente em reduzir a inflamação e o estresse oxidativo, e não alterou a morfologia intestinal.

Palavras-chave: *Sorghum bicolor* (L.) Moench, antocianinas, fitato, tanino, interleucina-6, interleucina-8, fator de necrose tumoral- α .

Response to inflammation, oxidative stress and intestinal morphology in rats fed with high-fat diets added with sorghum

Abstract

Obesity has been linked to the low grade pro-inflammatory state and to the oxidative stress. The dietary addition of whole grains could prevent obesity and co-morbidities. The aim of this study was to evaluate the effect of adding flour of different sorghum genotypes to high-fat diets concerning on lipid profile, blood glucose, oxidative stress, inflammation and the intestinal morphology in male adult Wistar rats. The animals were fed AIN-93M diet, high-fat diet control (DHC) and high-fat diet added with sorghum BRS 305 (DHS 305), BRS 309 (DHS 309) and BRS 310 (DHS 310). The food consumption of the AIN-93M group was higher than the DHC, DHS 305 and DHS 310 groups ($p < 0.05$). The energy consumption, final weight, body weight gain, epididymal fat, and food efficiency ratio were similar between the experimental groups, as well as the concentrations of glucose, fructosamina, total cholesterol and HDL cholesterol, triglycerides, liver enzymes and superoxide dismutase ($p \geq 0.05$). The DHS 310 group showed lower levels of malondialdehyde and TNF- α ($p < 0.05$). The intestinal villi height of the DHC, DHS 305, DHS 309 and DHS 310 groups did not differ ($p \geq 0.05$). The BRS 310 sorghum genotype was more effective in reducing inflammation and oxidative stress, and that it did not alter intestinal morphology.

Keywords: *Sorghum bicolor* (L.) Moench, anthocyanins, phytate, tannin, interleukin-6, interleukin-8, tumoral necrosis factor- α .

7.1. Introdução

A obesidade é uma doença caracterizada por desordens no metabolismo de glicose, triglicerídeos e lipoproteínas plasmáticas, além de estar associada ao estado pró-inflamatório de baixo grau e ao estresse oxidativo (KARAOUZENE, MERZOUK, ARIBI, *et al.*, 2011; PATERNAIN, GARCÍA-DIAZ, MILAGRO, *et al.*, 2011).

O acúmulo de tecido adiposo, principalmente o tecido adiposo visceral, tem importante papel na produção de citocinas inflamatórias como, por exemplo, fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6). Estas citocinas são consideradas mediadores do processo de inflamação que estimulam a síntese de outras citocinas, como a interleucina-8 (IL-8), relacionada a diversas doenças inflamatórias (AHIMA e FLIER, 2000; BRUUN, LIHN, MADAN, *et al.*, 2004; GION, TAKETOMI, SHIRABE, *et al.*, 2010; HOGAN, CANNING, SUN, *et al.*, 2010).

O tecido adiposo em excesso aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, favorecendo a instalação do estresse oxidativo, por meio do aumento da expressão de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase (NADPH oxidase) e da redução das enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathiona peroxidase (GSH) (FURUKAWA, FUJITA, SHIMABUKURO, *et al.*, 2004). Deste modo, Roberts, Barnard, Sindhub *et al.* (2006) demonstraram maior expressão de NADPH oxidase e malondialdeído (MDA), e redução na expressão das enzimas SOD e GSH nos rins e em aortas de ratos Fisher com obesidade induzida por meio da ingestão de dieta com elevado teor de lipídios e carboidratos simples.

O estresse oxidativo e a inflamação presentes na obesidade estão associados ao desenvolvimento de outras co-morbidades, como as doenças cardiovasculares, o diabetes mellitus tipo 2 e o câncer (REUTER, GUPTA, CHATURVEDI, *et al.*, 2010; DONATH e SHOELSON, 2011; LEE, PARK, ZUIDEMA, *et al.*, 2011). Os cereais integrais podem auxiliar a redução dos riscos das co-morbidades associadas à obesidade. A fibra alimentar reduz a absorção de colesterol e a glicemia pós prandial além de diminuir o tempo de trânsito intestinal. Os polifenóis, ácido fítico, vitamina E dentre outros fitoquímicos atuam como antioxidantes, compondo o sistema de defesa antioxidante não enzimático (FARRAR, HARTLE, HARGROVE, *et al.*, 2008).

Neste contexto, o sorgo apresenta uma composição de fitoquímicos que inclui os ácidos fenólicos, taninos, antocianinas, fitato além da fibra alimentar, que contribuem para a elevada capacidade antioxidante deste cereal, podendo ser útil para a redução dos risco das doenças crônicas não transmissíveis (AWIKA, 2003; AWIKA e ROONEY, 2004). No entanto, a ingestão de alguns desses fitoquímicos, principalmente os taninos, além de contribuírem para a atividade antioxidante, pode interferir na morfologia das vilosidades e criptas intestinais (CAMPOS, FILHO, TORRES, *et al.*, 2007).

Poucos trabalhos enfocam o potencial funcional do sorgo sobre as doenças crônicas não transmissíveis (AL-MAMARY, MOLHAM, ABDULWALI, *et al.*, 2001; CARR, WELLER, SCHLEGEL, *et al.*, 2005; YANG, BROWNING e AWIKA, 2009). Entretanto, nenhum estudo avaliou até o momento o efeito da adição deste cereal na alimentação sobre o estresse oxidativo ou sobre a inflamação de baixo grau associados à obesidade. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de farinha de três genótipos de sorgo em dietas hiperlipídicas sobre os parâmetros de estresse oxidativo, de inflamação e a morfologia intestinal de ratos Wistar.

7.2. Material e método

Preparo das farinhas de sorgo

Foram analisados os grãos dos genótipos de sorgo BRS 309 grãos de pericarpo brancos e sem testa pigmentada, BRS 305 grãos de pericarpo marrom claro com testa pigmentada e BRS 310 grãos de pericarpo vermelho sem testa pigmentada fornecidos pela Embrapa Milho e Sorgo - Sete Lagoas - MG, Brasil. Os grãos de sorgo foram selecionados manualmente e submetidos à peneiragem para remoção de sujidades e impurezas. Para obtenção das farinhas, os grãos foram expostos a temperatura de 105°C em estufa com circulação de ar (Nova Ética®, modelo 400/6ND, Vargem Grande Paulista, São Paulo), como proposto por Souza, Dantas, Silva *et al.* (2005), com modificação do tempo de exposição para 30 minutos. Em seguida, os grãos foram moídos com pericarpo, em moinho de facas (C.W. Brasender®, Duisburg, Alemanha).

Análises químicas dos genótipos de sorgo

A determinação do teor dos compostos fenólicos totais das farinhas foi realizada utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Singleton, Orthofer, Lamuela-Raventós *et al.* (1999). Os taninos condensados foram medidos pelo método de reação vanilina/ HCl segundo Burns (1971) com modificações Maxson e Rooney (1972) e Price, Van Scoyoc e Butler (1978). O teor de fitato foi determinado por cromatografia de troca iônica e espectrofotometria, segundo método de Latta e Eskin (1980), modificado por Ellis e Morris (1986). A concentração de antocianinas totais foi realizada pelo método de pH diferencial conforme Fuleki e Francis (1968) e Giusti e Wrolstad (2001) com modificações. A identificação e quantificação das antocianinas, luteolinidina e apigeninidina, foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu, SCL 10AT VP) de acordo com as condições cromatográficas descritas por Awika, Rooney e Waniska (2004a). A atividade antioxidante foi realizada pelo método do radical 1,1- difenil-2-picrilhidrazila (BLOOR e LESTER, 2001). Todas as análises foram realizadas em três repetições e em triplicata.

Animais e dietas experimentais

Os 50 ratos *Ratus norvegicus* linhagem Wistar, machos, com 53 dias de idade, foram divididos em cinco grupos, de forma sistemática, de modo a não haver diferença entre as médias dos pesos entre os grupos ($199 \text{ g} \pm 4,8$). Os animais foram alocados em gaiolas individuais, de aço inoxidável e mantidos em condições de temperatura de $22 \pm 3^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas. O ganho de peso e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente.

O consumo de fenólicos totais, taninos condensados, antocianinas totais, luteolinidina, apigeninidina e fitato foram estimados de acordo com o consumo das dietas experimentais adicionadas de sorgo, segundo os resultados obtidos na análise química de cada genótipo. Em seguida, dividiu-se a concentração dos compostos ingeridos pelo ganho de peso e pelos dias de experimentação (35 d), sendo os valores expressos em grama por quilo de ganho de peso por dia.

Os grupos de animais receberam as seguintes dietas: AIN-93M (REEVES, NIELSEN e FAHEY, 1993); dieta hiperlipídica controle (DHC), baseada na composição da ração comercial D12079B (Research Diets[®])

(THORNTON-JONES, KENNETT, BENWELL, *et al.*, 2006) adaptada para a dieta AIN-93M; dieta hiperlipídica com farinha de grãos de sorgo do genótipo BRS 305 (DHS 305); dieta hiperlipídica com farinha de grãos de sorgo do genótipo BRS 309 (DHS 309); e dieta hiperlipídica com farinha de grãos de sorgo do genótipo BRS 310 (DHS 310). As farinhas de grãos de sorgo foram adicionadas às dietas em quantidades suficientes para fornecer 50% do teor de fibra alimentar, de acordo com a recomendação de dieta para roedores AIN-93M, o restante da fibra foi fornecido pela celulose (Tabela 11).

Tabela 11- Composição das dietas experimentais (g.100g⁻¹).

Ingredientes	Dietas Experimentais				
	AIN 93-M	DHC	DHS 305	DHS 309	DHS 310
Caseína	14	14	11,79	10,74	11,01
Maltodextrina	15,5	15,5	4,9	0,86	2,2
Amido de milho	46,6	5,32	0	0	0
Sacarose	10	34,1	34,1	34,1	34,1
Óleo de milho	4	1	0,43	0,32	0,33
Manteiga	0	20	20	20	20
Sorgo 305 com tratamento térmico	0	0	21,2	0	0
Sorgo 309 com tratamento térmico	0	0	0	26,4	0
Sorgo 310 com tratamento térmico	0	0	0	0	24,8
Celulose	5	5	2,5	2,5	2,5
Mix de mineral	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Mix de vitamina	1	1	1	1	1
Bitartarato de Colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
L- cistina	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Colesterol	0	0,15	0,15	0,15	0,15
Kcal.g ⁻¹	3,8	4,6	4,5	4,5	4,5
Fibra alimentar ^A	-	-	11,4	9,2	9,7

^A= Teor de fibra alimentar das farinhas dos genótipos de sorgo BRS 305, BRS 309 e BRS 310 utilizados para o cálculo das dietas, determinado pelo método enzimático-gravimétrico (AOAC, 2002).

No 35º dia, aos 88 dias de idade, os animais, sob jejum de 10h, foram anestesiados. O sangue foi coletado por punção cardíaca em tudo heparinizado e centrifugado durante 10 minutos a 3.000 rpm para separação do plasma. O fígado e a gordura epididimária foram pesados, e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Todos os materiais coletados foram armazenados a - 80°C. Após ensaio com a enzima superóxido dismutase o fígado dos animais foi liofilizado para a análise de peroxidação de lipídios.

A porção superior do jejuno de seis animais, de cada grupo experimental, foi fixada em líquido de Bouin, por um período mínimo de 24 horas e preservada em álcool 70%.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFV) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, processo n° 28/2010.

Análises bioquímicas, peroxidação de lipídios e atividade da enzima superóxido dismutase

As concentrações plasmáticas de glicose, frutossamina, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol), triglicerídeos, alanina amino transferase e aspartato amino transferase foram determinadas por métodos colorimétricos conforme recomendações do fabricante (Bioclin[®]). A peroxidação de lipídios foi estimada no plasma e em homogenato de fígado liofilizado, por meio do teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com Buege e Aust (1978). A determinação da atividade da enzima superóxido dismutase foi realizada no fígado, segundo método modificado de Dieterich, Bielick, Beulich *et al.* (2000). As proteínas do fígado foram determinadas pelo método do biureto conforme recomendação do fabricante (Bioclin[®])

Expressão de mRNA de IL-8, IL-10 e TNF- α pelo método Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

A partir de tecido adiposo epididimário, de três animais de cada grupo experimental, foi extraído mRNA utilizando-se reagente trizol (Invitrogen[®]) de acordo com orientações do fabricante. O cDNA foi confeccionado utilizando-se 2 μ L de mRNA extraído a uma concentração de 200 μ g. μ L⁻¹ ao qual foi adicionado 1 μ L do random primers (Promega[®]) e 1 μ L da enzima M-MuLV Transcriptase Reversa (Fermentas[®]). A quantificação dos genes alvo foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR) no equipamento ABI Prism 5700 *Sequence Detection System*, utilizando o sistema de quantificação por fluorescência SYBR-Green. O ciclo da PCR envolveu desnaturação inicial de 95°C (10 min.) e então 40 ciclos, com 1 min. de desnaturação (94°C), 1 min. de anelamento (56°C) e 2 min. de alongamento (72°C), seguidos da curva padrão de dissociação. As seqüências dos “primers” (Choma Biotechnologies[®]) utilizados foram: TNF- α sense: 5' tct caa aac tcg agt gac aag c 3'; TNF- α anti-sense: 5' ggt tgt ctt tga gat cca tgc 3'; IL-10 sense: 5' gag aga agc tga aga ccc tct g 3'; IL-10 anti-sense: 5' tca ttc atg gcc ttg tag aca c 3'; IL-8 sense: 5' cac ttc aag aac atc cag agt ttg a 3' e IL-8

anti-sense: 5'cca ttc ttg agt gtg gct atg act 3'. A expressão relativa dos níveis de mRNA foram normalizadas pelo controle endógeno β -actina.

Morfometria intestinal

Para o estudo da morfologia intestinal foram obtidos do jejuno de seis animais de cada grupo experimental. Para cada animal foi obtida uma lâmina com nove cortes transversais semi-seriados com 3 μ m de espessura, que foram corados pela técnica hematoxilina/eosina. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz CX31 Olympus, e as imagens foram obtidas com câmera digital SC 020 por meio do software Analysis GETIT, Olympus. Para aferição da altura das vilosidades, profundidade das criptas e espessura das camadas musculares interna e externa utilizou-se o aplicativo Image Pro-Plus® versão 4.5.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ($\alpha = 5\%$), considerando-se um delineamento inteiramente casualizado com cinco grupos, dez repetições e o peso inicial como covariável para avaliar o efeito da adição do sorgo no modelo de dieta hiperlipídica. As comparações das médias foram realizadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Para comparar o efeito das dietas sobre a expressão de mRNA utilizou-se o teste de Bonferroni, ao nível de 5% de probabilidade.

7.3. Resultados

Análises químicas dos genótipos de sorgo

Não houve diferença na atividade antioxidante e na concentração de antocianinas entre todos os genótipos de sorgo ($p \geq 0,05$). A concentração de fenólicos totais, taninos condensados, luteolinidina e apigeninidina foram maiores no genótipo BRS 305 que, no entanto, apresentou menor concentração de fitato ($p < 0,05$) (Tabela 12).

Tabela 12- Composição química das farinhas dos genótipos de sorgo BRS 305, BRS 309 e BRS 310 submetidos ao tratamento térmico (150°C/ 30 minutos).

Composição química	BRS 305	BRS 309	BRS 310
Atividade antioxidante (%)	91,4	91,0	89,3
Fenólicos totais (mg EAG.g ⁻¹) ^A	6,82 ^a	0,84 ^b	0,95 ^b
Taninos condensados (mg EC.g ⁻¹) ^B	66,8 ^a	2,9 ^c	12,5 ^b
Antocianinas (mg.g ⁻¹)	3,65	3,14	3,75
Luteolinidina (mg.g ⁻¹)	0,33 ^a	0,16 ^c	0,23 ^b
Apigeninidina (mg/g ⁻¹)	1,47 ^a	0,56 ^c	0,76 ^b
Fitato (mg.g ⁻¹)	3,78 ^b	6,95 ^a	5,53 ^a

Valores não seguidos de letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p< 0,05).

^A mg equivalente de ácido gálico por grama de farinha; ^B mg de equivalente de catequina por g de farinha.

Consumo alimentar e ganho de peso

O consumo alimentar dos animais que receberam dieta AIN-93M foi maior que o dos animais alimentados com DHS 305 e DHS 310 (p<0,05) e não diferiu do grupo DHS 309 (p≥ 0,05). Porém, o consumo de calorias, o peso final, o ganho de peso corpóreo, a gordura epididimária e o coeficiente de eficiência alimentar não diferiram entre os grupos experimentais (p≥ 0,05) (Tabela 13).

Tabela 13- Consumo alimentar, consumo energético, ganho de peso, gordura epididimária, coeficiente de eficiência alimentar, consumo de lipídios e fitoquímicos dos animais alimentados com as dietas AIN-93M, DHC, DHS 305, DHS 309 e DHS 310.

Parâmetros	AIN-93M	DHC	DHS 305	DHS 309	DHS 310
Consumo alimentar(g)	722 ^a	616 ^b	642 ^b	649 ^{ab}	603 ^b
Consumo energético (Kcal.kg ⁻¹ .d ⁻¹) ^A	604	633	661	610	618
Ganho de peso (g)	138	132	136	141	125
Gordura epididimal (g)	5,85	5,12	6,32	6,03	4,73
Coeficiente de eficiência alimentar	0,19	0,21	0,21	0,21	0,21
Consumo de lipídios (g.kg ⁻¹ .d ⁻¹) ^B	8,82 ^b	22,5 ^a	23,3 ^a	24,2 ^a	24,5 ^a
Fenólicos totais (g.kg ⁻¹ .d ⁻¹) ^B	0 ^d	0 ^d	0,21 ^a	0,029 ^c	0,033 ^b
Taninos condensados (g.kg ⁻¹ .d ⁻¹) ^B	0 ^d	0 ^d	2,05 ^a	0,25 ^c	0,43 ^b
Antocianinas (g.kg ⁻¹ .d ⁻¹) ^B	0 ^b	0 ^b	0,11 ^a	0,11 ^a	0,12 ^a
Luteolinidina (g.kg ⁻¹ .d ⁻¹) ^B	0 ^d	0 ^d	0,010 ^a	0,006 ^b	0,007 ^b
Apigeninidina (g.kg ⁻¹ .d ⁻¹) ^B	0 ^c	0 ^c	0,045 ^a	0,020 ^b	0,025 ^b
Fitato (g.kg ⁻¹ .d ⁻¹) ^B	0 ^d	0 ^d	0,12 ^c	0,25 ^a	0,18 ^b

Valores não seguidos de letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p< 0,05).

^AValores expressos em quilocalorias de ganho de peso por dia. ^Bvalores expressos em gramas por quilo de ganho de peso por dia.

Os animais que receberam dieta contendo sorgo BRS 305 apresentaram maior consumo de fenólicos totais, taninos condensados, luteolinidina, apigeninidina ($p < 0,05$). Porém, o consumo de antocianinas totais foi semelhante entre os grupos que receberam dietas com sorgo ($p < 0,05$). O consumo de fitato foi maior para o grupo alimentado com DHS 309 em relação ao DHS 305 e DHS 310 ($p < 0,05$) (Tabela 13).

Análises bioquímicas, peroxidação de lipídios e atividade da enzima superóxido dismutase

A concentração plasmática de glicose, frutossamina, colesterol total, HDL-colesterol, triglicerídeos, alanina e aspartato amino transferase, superóxido dismutase e malondialdeído plasmático foram semelhantes entre os grupos experimentais ($p \geq 0,05$) (Tabela 14).

A concentração de malondialdeído foi menor no grupo alimentado com dieta hiperlipídica adicionada de sorgo BRS 310 em relação a todos os grupos experimentais ($p < 0,05$) (Tabela 14).

Tabela 14- Parâmetros bioquímicos, peroxidação de lipídios e atividade da enzima superóxido dismutase dos animais alimentados com as dietas AIN-93M, DHC, DHS 305, DHS 309 e DHS 310.

Parâmetros	AIN-93M	DHC	DHS 305	DHS 309	DHS 310
Glicose (mg.dL ⁻¹)	112	105	90	99	97
Frutossamina (μmol.L ⁻¹)	128	131	149	135	146
Colesterol total (mg.dL ⁻¹)	68	66	67	67	58
HDL-colesterol (mg.dL ⁻¹)	30	36	33	36	31
Triglicerídeos (mg.dL ⁻¹)	87	87	68	114	87
ALT (U.L ⁻¹) ^A	53	65	61	67	65
AST (U.L ⁻¹) ^B	180	170	176	180	164
MDA plasma (nmol.mL ⁻¹) ^C	8,8	7,9	6,9	6,6	5,9
MDA fígado (nmol.mg ⁻¹) ^D	0,23 ^a	0,19 ^a	0,22 ^a	0,21 ^a	0,11 ^b
SOD (U.mg ⁻¹) ^E	10,0	16,9	17,7	17,3	16,0

Valores não seguidos de letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

^AALT= Alanina amino transferase; ^BAST= Aspartato amino transferase; ^CMDA plasma= Malondialdeído plasmático; ^DMDA fígado= Malondialdeído de homogenato de fígado; ^ESOD =Superóxido dismutase.

Expressão de mRNA IL-8, IL-10 e TNF-α pelo método Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

Não houve diferença sobre a expressão de mRNA de IL-8 e IL-10 entre os grupos experimentais ($p \geq 0,05$). No entanto, a expressão de TNF-α foi menor nos grupos AIN-93M e DHS 310 ($p < 0,05$) (Figura 8).

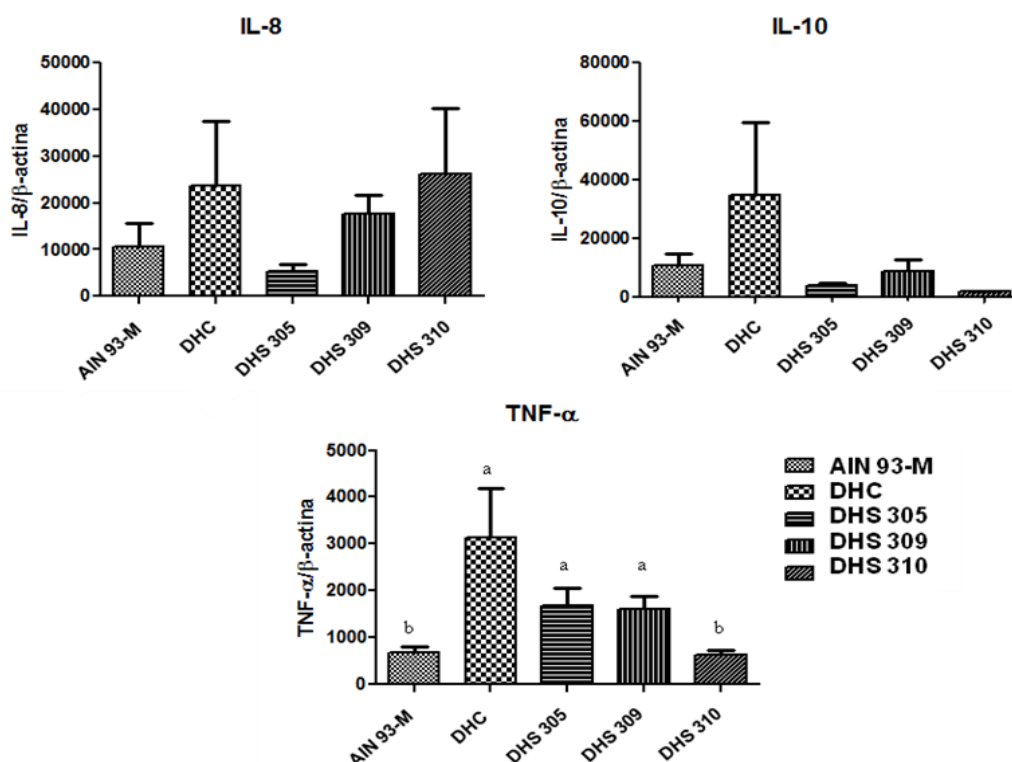


Figura 8- Expressão de mRNA IL-8, IL-10 e TNF- α em tecido adiposo epididimário dos animais alimentados com as dietas AIN-93M, DHC, DHS 305, DHS 309 e DHS 310.

Morfometria intestinal

Não houve diferença quanto à medida da profundidade da cripta e da espessura das musculares interna e externa entre os grupos ($p \geq 0,05$). A altura das vilosidades dos grupos DHS 305 e DHS 309 foram maiores do que a dos animais alimentados com AIN-93M ($p < 0,05$), mas não diferiu de DHC e DHS 310 ($p \geq 0,05$) (Tabela 15).

Tabela 15- Medidas da altura das vilosidades, profundidade das criptas, espessura das camadas musculares externa e interna (μm) do jejuno dos animais alimentados com as dietas AIN-93M, DHC, DHS 305, DHS 309 e DHS 310.

Parâmetros	AIN-93M	DHC	DHS 305	DHS 309	DHS 310
Altura da vilosidade	368 ^b	401 ^{ab}	419 ^a	444 ^a	396 ^{ab}
Profundidade da cripta	163	169	153	162	152
Espessura muscular interna	50	51	57	55	55
Espessura muscular externa	37	35	36	36	39

Valores não seguidos de letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

7.4. Discussão

Análises químicas dos genótipos de sorgo

As farinhas dos grãos dos três genótipos de sorgo apresentaram, em média, 90% de atividade antioxidante, corroborando outras pesquisas que demonstraram elevada atividade antioxidante do sorgo, sendo maior que a do arroz, trigo e aveia (RAGAE, ABDEL-AAL e NOAMAN, 2006; FARRAR, HARTLE, HARGROVE, *et al.*, 2008).

O genótipo BRS 305 apresentou concentração 8 vezes maior de fenólicos totais e 21 vezes maior de taninos em relação ao BRS 309 e, 7 e 5 vezes em relação ao BRS 310, respectivamente. Estes níveis de concentrações no BRS 305 podem ser provenientes da presença da testa pigmentada que se relaciona aos elevados teores destes compostos (DLAMINI, TAYLOR e ROONEY, 2007).

As concentrações de luteolinidina e apigeninidina no genótipo BRS 305 (pericarpo marrom claro) representaram 50% do teor de antocianinas totais, enquanto para o BRS 309 (pericarpo branco) e BRS 310 (pericarpo vermelho) corresponderam apenas a 23 e 26%, respectivamente. Isto demonstra que a pigmentação do pericarpo pode estar relacionada às quantidades destes compostos em conformidade com os resultados apresentados por Awika, Rooney e Waniska (2004b) em que apigeninidina e luteoninidina corresponderam a, aproximadamente, 45% do total de antocianinas em genótipo de pericarpo marrom, no entanto, apenas a apigeninidina foi identificada no genótipo vermelho (19%) (AWIKA, ROONEY e WANISKA, 2004b). Outras antocianinas como as cianidinas e perlagonidinas foram relatadas no sorgo. No entanto, as mais comuns são as 3-deoxiantocianinas e seus derivados, que incluem a luteolinidina e apigeninidina, pouco comuns em outras plantas (AWIKA, ROONEY e WANISKA, 2004a; b).

Apesar das menores concentrações de antocianinas totais, apigeninidina, luteolinidina, taninos e fenólicos totais do sorgo BRS 309, o mesmo apresentou atividade antioxidante semelhante aos demais analisados. Isto pode ser devido ao maior teor de fitato desse genótipo, contribuindo, significativamente, para esta atividade. O posicionamento dos grupos fosfato confere ao fitato a habilidade de quelar íons oxidativos, podendo desta forma,

agir como um antioxidante (FILGUEIRAS, SOARES, SHIMOKOMAKI, *et al.*, 2009; KUMAR, SINHA, MAKAR, *et al.*, 2010).

Consumo alimentar e ganho de peso

As dietas hiperlipídicas apresentaram densidade energética similares e proporcionaram, desta forma, ganho de peso e quantidade de gordura epididimária semelhantes, embora o consumo alimentar tenha reduzido. No entanto, outros estudos com dietas hiperlipídicas detectaram diferença significativa entre o controle e as dietas hiperlipídicas (COLE, MURRAY, COCHLIN, *et al.*, 2011; WRIGHT, BRANDON, HOY, *et al.*, 2011).

Tendo em vista o maior consumo de fenólicos totais, taninos condensados, luteolinidina e apigeninidina do grupo DHS 305 em relação às outras dietas adicionadas de sorgo, esperava-se um maior potencial deste genótipo de sorgo em controlar as alterações bioquímicas, prevenir o estresse oxidativo e a inflamação. Adicionalmente, a incorporação do sorgo com elevados teores de tanino a dieta de ratos (JAMBUNATHAN e MERTZ, 1973) e porcos (AL-MAMARY, MOLHAM, ABDULWALI, *et al.*, 2001) resultaram em menor ganho de peso, indicando que genótipos de sorgo com esta característica poderiam ser utilizados como estratégia no controle da obesidade (AWIKA e ROONEY, 2004).

Análises bioquímicas, peroxidação lipídica e atividade da enzima superóxido dismutase

As concentrações de glicose, frutossamina, colesterol total, HDL-colesterol, triglicerídeos, alanina e aspartato amino transferase, superóxido dismutase e malondialdeído plasmático não diferiram entre os grupos experimentais. Esperava-se redução dos parâmetros bioquímicos nos grupos que receberam dietas adicionadas de sorgo em função da presença dos fitoquímicos deste cereal.

Tem-se demonstrado que o consumo de dietas com elevado teor de lipídios induz lesões hepáticas por meio do aumento do estresse oxidativo e reduz a atividade das enzimas antioxidantes (SLIM, TOBOREK, WATKINS, *et al.*, 1996). No presente estudo, apesar de não ter havido diferença nos níveis de MDA do fígado entre as dietas AIN-93M, DHC, DHS 305 e DHS 309, o genótipo de sorgo BRS 310 reduziu este parâmetro. Não foram observados

alterações nas concentrações das enzimas hepáticas (alanina amino transferase e aspartato amino transferase) em nenhum dos grupos experimentais. Este resultado indica que os três genótipos de sorgo não apresentaram risco de toxicidade nos parâmetros analisados durante 35 dias de consumo. Todavia, Milagro, Campion e Martinez (2006) relataram aumento do estresse oxidativo, indicado pela alta concentração de MDA, desordens hepáticas e agravamento da síndrome metabólica em ratos Wistar animais alimentados com dieta hiperlipídica durante 56 dias.

As dietas hiperlipídicas controle e adicionadas de sorgo aumentaram os níveis de SOD em aproximadamente 70%. Entretanto, Rico, Shin, Um *et al.* (2011) relataram menores níveis das enzimas SOD, catalase e glutathione peroxidase em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e destacaram o efeito deletério do consumo de lipídios sobre o sistema antioxidante enzimático.

Expressão de mRNA IL-8, IL-10 e TNF- α pelo método Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

A maior expressão de mRNA de TNF- α , principalmente no grupo alimentado com DHC, confirma o efeito pró-inflamatório de dietas hiperlipídicas. Tem-se demonstrado que o aumento da adiposidade é um importante mediador do processo inflamatório, que contribui para a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α (HOTAMISLIGIL, SHARGILL e SPIEGELMAN, 1993). Entretanto, no presente estudo, a produção destas citocinas foi observada sem alterações estatisticamente significativas no peso corpóreo, na gordura epididimária e nos parâmetros bioquímicos dos animais. Os animais alimentados com DHS 305 e DHS 309 expressaram aproximadamente duas vezes menos mRNA de TNF- α que os alimentados com DHC, e juntamente com a menor expressão do grupo DHS 310, indicaram que o sorgo foi capaz de reduzir a expressão desta citocina com o consumo de dieta hiperlipídica.

Verificou-se que o grupo DHS 305 expressou 3,6 vezes menos mRNA de IL-8 que o grupo DHC. Este resultado pode ser proveniente da maior concentração de taninos condensados, denominados procianidinas, no genótipo de sorgo BRS 305. Estudo *in vitro* com este flavonóide proveniente de semente de uva demonstrou atividade antiinflamatória e imunomodulatória em macrófagos ativados (TERRA, VALLS, VITRAC, *et al.*, 2007).

Ressalta-se que o mecanismo que sustenta a associação entre a obesidade e os níveis mais elevados de inflamação não está totalmente elucidada. No entanto, a maior expressão de mRNA das interleucinas TNF- α e o aumento aparente da IL-8 caracteriza a presença da inflamação subclínica, principalmente nos animais alimentados com DHC.

Observou-se que a IL-10 apresentou expressão aproximadamente 2,5 vezes maior no grupo DHC em comparação ao grupo AIN- 93M. Na presença das farinhas dos genótipos de sorgo adicionadas em dietas hiperlipídicas, verificou-se que os grupos DHS 305, DHS 309 e BRS 310 expressaram, respectivamente, 7, 3 e 15 vezes menos IL-10 que o grupo DHC. Deste modo, pode-se inferir que este aumento compreende uma resposta do organismo para reduzir a produção das IL-8 e TNF- α , uma vez que a IL-10 é a principal inibidora da síntese das citocinas pró-inflamatórias e supressora da função dos macrófagos (ESPOSITO, NAPPO, GIUGLIANO, *et al.*, 2003).

Morfometria intestinal

Verificou-se que os animais alimentados com dieta hiperlipídica na ausência e presença de sorgo (DHS 305 e BRS 309) apresentaram hipertrofia na altura das vilosidades do jejuno. Entretanto, não houve modificação na profundidade das criptas e na espessura das camadas musculares. Goda e Takase (1994) relataram resultado semelhante em ratos que consumiram dieta com elevado teor de lipídios (70%), destacando ainda, aumento da superfície de absorção de nutrientes. Scoaris, Rizo, Roldi *et al.* (2010) relacionaram o aumento da superfície de absorção intestinal ao maior ganho de peso de ratos alimentados com dietas de cafeteria (16% lipídios). No entanto, no presente estudo, o aumento das vilosidades intestinais não favoreceu o ganho de peso dos animais alimentados com dietas hiperlipídicas.

Não foram observadas alterações nos parâmetros morfométricos intestinais dos animais alimentados com dieta contendo sorgo. Similarmente, frangos de corte alimentados com sorgo não apresentaram alterações na altura das vilosidades, profundidade das criptas e espessuras das camadas musculares intestinais, além de suas mucosas se mostrarem semelhante a dos animais alimentados com trigo e milho (THOMAS, RAVINDRAN e THOMAS, 2005; SHAKOURI, IJI, MIKKELSEN, *et al.*, 2009)

No presente estudo, os diferentes níveis de taninos condensados nos genótipos de sorgo não foi capaz de alterar a morfologia intestinal dos animais. Entretanto, resultados divergentes foram demonstrados por Nyamambi, Ndlovu, Naik *et al.* (2007) em que altura das vilosidades e a profundidade das criptas intestinais de frango de corte reduziram de acordo com o aumento das procianidinas de genótipos de sorgo. Assim, pode-se inferir que as alterações morfológicas foram decorrentes, principalmente, da elevada concentração de lipídios da dieta.

A seleção de alimentos que apresentam elevada atividade antioxidante e sua inserção no hábito alimentar pode auxiliar na redução dos riscos das doenças crônicas não transmissíveis (BRIGHENTI, VALTUEÑA, PELLEGRINI, *et al.*, 2005; VALTUEÑA, PELLEGRINI, FRANZINI, *et al.*, 2008). No entanto, estudos adicionais *in vivo* são necessários para explorar o potencial de cereais com elevado potencial antioxidante uma vez que estes são predominantes na alimentação ocidental.

7.5. Conclusão

As farinhas dos genótipos de sorgo BRS 305, BRS 309 e BRS 310 apresentaram elevada atividade antioxidante. O genótipo de sorgo BRS 305 apresentou as maiores concentrações de fenólicos totais, taninos condensados, luteolinidina e apigeninidina.

A menor expressão de TNF- α e o menor nível de MDA do fígado dos animais do grupo alimentado com o sorgo BRS 310 indicaram que este genótipo foi mais eficiente em reduzir a inflamação e o estresse oxidativo, além de não alterar a morfologia intestinal. Os parâmetros bioquímicos plasmáticos, de toxicidade hepática, as concentrações de MDA e a atividade da enzima SOD no fígado não apresentaram alterações em ratos alimentados com dieta hiperlipídica na presença de sorgo.

8. CONCLUSÃO GERAL

No presente estudo avaliou a atividade antioxidante, a qualidade protéica e o potencial funcional de novos genótipos de sorgo desenvolvido para o consumo humano, submetido a processamentos térmicos. Os genótipos de sorgo apresentaram elevada atividade antioxidante, e esta foi mantida com a exposição dos grãos a temperatura de 105°C durante 15 minutos. Além disso, este tratamento aumentou a concentração de fenólicos totais e manteve taninos e fitato. Correlação positiva foi demonstrada entre a atividade antioxidante dos genótipos de sorgo com as concentrações de fenólicos totais, taninos e fitato. O tratamento térmico melhorou a qualidade protéica do genótipo BRS 309. O perfil de aminoácidos essenciais do sorgo foi o principal limitante da qualidade protéica. Dentre os genótipos avaliados o BRS 310 apresentou a melhor qualidade protéica independente do tratamento térmico. A adição das farinhas de sorgo as dietas hiperlipídicas não alterou os parâmetros bioquímicos e as concentrações de MDA plasmáticos e a atividade da enzima SOD no fígado. Tendo em vista a manutenção da elevada atividade antioxidante frente à exposição ao tratamento térmico em estufa, os melhores indicadores de índices biológicos de qualidade protéica, manutenção da morfologia intestinal, além da redução da inflamação subclínica e do estresse oxidativo, pode-se inferir que o genótipo BRS 310 possui uma composição química e nutricional favorável ao consumo humano.

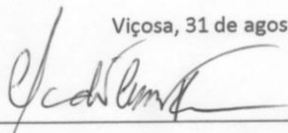
9. ANEXO I**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) / UFV certifica que o processo n.º 28/2010, intitulado “Efeito antioxidante e modulação da inflamação subclínica por farinhas integrais de genótipos de sorgo sobre parâmetros fisiológicos de ratos Wistar” coordenado pelo(a) Prof(a). Hércia Stampini Duarte do Departamento de Nutrição e Saúde está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em reunião de 31/08 /2010.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use / UFV certify that the process number 28/2010, named “Antioxidant effect and modulation of inflammation subclinical of the sorgum genotypes flour on physiological parameters in wistar rats” is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and with actual Brazilian legislation. This Departmental Commission on August 31, 2010 approved this process.

Viçosa, 31 de agosto de 2010



Comissão de Ética para o Uso de Animais da UFV

(CEUA / UFV)

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, D., BARRON, M., RIAZ, M., *et al.* Factors affecting extrusion of white sorghum to produce whole grain snacks. In: **AACC Annual Meeting**. Portland OR. 2010: <http://www.aaccnet.org/meetings/2003/abstracts/a03ma305.htm>. p. 2003.

AHIMA, R. S. e FLIER, J. S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.11, n.8, p.327-332. 2000.

AL-MAMARY, M., MOLHAM, A.-H., ABDULWALI, A.-A., *et al.* In vivo effects of dietary sorghum tannins on rabbit digestive enzymes and mineral absorption. **Nutrition Research**, v.21, n.10, p.1393-1401. 2001.

ALI, N. M. M., EL TINAY, A. H., ELKHALIFA, A. E. O., *et al.* Effect of alkaline pretreatment and cooking on protein fractions of a high-tannin sorghum cultivar. **Food Chemistry**, v.114, n.2, p.646-648. 2009.

ALONZO, N. e HIRS, C. H. W. Automation of sample application in amino acid analyzers. **Analytical Biochemistry**, v.23, n.2, p.272-288. 1968.

ANGELO, P. M. e JORGE, N. Phenolic compounds in foods – A brief review. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.6, p.232-240. 2006.

ANGLANI, C. Sorghum for human food – A review. **Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)**, v.52, n.1, p.85-95. 1998.

ANTUNES, R. C., RODRIGUEZ, N. M., GONÇALVES, L. C., *et al.* Composição bromatológica e parâmetros físicos de grãos de sorgo com diferentes texturas do endosperma. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.1351-1354. 2007.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the AOAC International**. Gaithersburg, MD, USA,: Association of Analytical Communities. 2002

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the AOAC International**. Maryland. 1997

AWIKA, J. M. **Antioxidant properties of sorghum**. Texas A&M University: College Station, Texas, 2003.

_____. Behavior of 3-deoxyanthocyanidins in the presence of phenolic copigments. **Food Research International**, v.41, n.5, p.532-538. 2008.

AWIKA, J. M., DYKES, L., GU, L., *et al.* Processing of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products alters procyanidin oligomer and polymer distribution and content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.18, p.5516-5521. 2003.

AWIKA, J. M., MCDONOUGH, C. M. e ROONEY, L. W. Decorticating sorghum to concentrate healthy phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.16, p.6230-6234. 2005.

AWIKA, J. M. e ROONEY, L. W. Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. **Phytochemistry**, v.65, n.9, p.1199-1221. 2004.

AWIKA, J. M., ROONEY, L. W. e WANISKA, R. D. Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v.90, n.1-2, 2005/4//, p.293-301. 2004a.

_____. Properties of 3-Deoxyanthocyanins from Sorghum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.14, p.4388-4394. 2004b.

AWIKA, J. M., YANG, L., BROWNING, J. D., *et al.* Comparative antioxidant, antiproliferative and phase II enzyme inducing potential of sorghum (*Sorghum bicolor*) varieties. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, n.6, p.1041-1046. 2009.

BARBOSA, K., BRESSAN, J., ZULET, M., *et al.* Influencia de la dieta sobre marcadores plasmáticos de estrés oxidativo en humanos. **An. Sist. Sanit. Navar.**, v.31, n.1, p.259-280. 2008.

BARBOSA, K. B. F., COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. D. C. G., *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, n.4, p.629-643. 2010.

BENDER, A. E. e DOELL, B. H. Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. **British Journal of Nutrition**, v.11, n.02, p.138-139. 1957.

BLOOR, S. J. e LESTER, P. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. In: (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v.Volume 335, 2001. Overview of methods for analysis and identification of flavonoids, p.3-14

BOUDRIES, N., BELHANECH, N., NADJEMI, B., *et al.* Physicochemical and functional properties of starches from sorghum cultivated in the Sahara of Algeria. **Carbohydrate Polymers**, v.78, n.3, p.475-480. 2009.

BRALLEY, E., GREENSPAN, P., HARGROVE, J. L., *et al.* Inhibition of Hyaluronidase Activity by Select Sorghum Brans. **Journal of Medicinal Food**, v.11, n.2, p.307-312. 2008.

BRIGHENTI, F., VALTUEÑA, S., PELLEGRINI, N., *et al.* Total antioxidant capacity of the diet is inversely and independently related to plasma concentration of high-sensitivity C-reactive protein in adult Italian subjects. **British Journal of Nutrition**, v.93, n.05, p.619-625. 2005.

BRUUN, J. M., LIHN, A. S., MADAN, A. K., *et al.* Higher production of IL-8 in visceral vs. subcutaneous adipose tissue. Implication of nonadipose cells in

adipose tissue. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v.286, n.1, January 1, 2004, p.E8-E13. 2004.

BUEGE, J. A. e AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. In: S. FELISHER e L. PACKER (Ed.). **Methods in enzymology**. San diego: Academic Press, v.52, 1978. Microsomal lipid peroxidation, p.302-10

BUEGE, J. A. e AUST., S. D. Microsomal lipid peroxidation. In: S. FELISHER e L. PACKER (Ed.). **Methods in enzymology**. San diego: Academic Press, v.52, 1978. Microsomal lipid peroxidation.

BURNS, R. E. Method for Estimation of Tannin in Grain Sorghum 1. **Agronomy Journal**, v.63, n.3, p.511-512. 1971.

CAMPOS, D. M. B., FILHO, D. E. F., TORRES, K. A. A., *et al.* Desenvolvimento da mucosa intestinal e a substituição do milho por sorgo na dieta de pintainhos de corte. **Ensaio e Ciência**, v.5, n.5, p.44-48. 2007.

CARR, T. P., WELLER, C. L., SCHLEGEL, V. L., *et al.* Grain Sorghum Lipid Extract Reduces Cholesterol Absorption and Plasma Non-HDL Cholesterol Concentration in Hamsters. **The Journal of Nutrition**, v.135, n.9, p.2236-2240. 2005.

CHUNG, K.-T., WONG, T. Y., WEI, C.-I., *et al.* Tannins and Human Health: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, n.6, p.421 - 464. 1998.

CIACCI, C., MAIURI, L., CAPORASO, N., *et al.* Celiac disease: In vitro and in vivo safety and palatability of wheat-free sorghum food products. **Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v.26, n.6, p.799-805. 2007.

CLIFFORD, M. N. Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, n.7, p.1063-1072. 2000.

COLE, M., MURRAY, A., COCHLIN, L., *et al.* A high fat diet increases mitochondrial fatty acid oxidation and uncoupling to decrease efficiency in rat heart. **Basic Research in Cardiology**, v.106, n.3, p.447-457. 2011.

CORREIA, I., NUNES, A., BARROS, A. S., *et al.* Comparison of the effects induced by different processing methods on sorghum proteins. **Journal of Cereal Science**, v.51, n.1, p.146-151. 2010.

DESHPANDE, S. S. e DAMODARAN, S. Food legumes: chemistry and technology. **Advances in Cereal Science and Technology**, v.10, p.147-241. 1990.

DEWANTO, V., WU, X. e LIU, R. H. Processed Sweet Corn Has Higher Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.17, p.4959-4964. 2002.

DEYOE, C. W. e SHELLENBERGER, J. A. Nutritive Value of Grains, Amino Acids and Proteins in Sorghum Grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.13, n.5, p.446-450. 1965.

DICKO, M. H., GRUPPEN, H., TRAORÉ, A. S., *et al.* Sorghum grain as human food in Africa: relevance of content of starch and amylase activities. **Afr. J. Biotechnol**, v.5, n.5, p. 384-395 2006.

DIETERICH, S., BIELIGK, U., BEULICH, K., *et al.* Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart : Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. **Circulation**, v.101, n.1, January 4, 2000, p.33-39. 2000.

DLAMINI, N. R., DYKES, L., ROONEY, L. W., *et al.* Condensed tannins in traditional wet cooked and modern extrusion cooked sorghum porridges. **Cereal Chemistry**, v.86, n.2, p.191-196. 2009.

DLAMINI, N. R., TAYLOR, J. R. N. e ROONEY, L. W. The effect of sorghum type and processing on the antioxidant properties of African sorghum-based foods. **Food Chemistry**, v.105, n.4, p.1412-1419. 2007.

DONATH, M. Y. e SHOELSON, S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. **Nat Rev Immunol**, v.11, n.2, p.98-107. 2011.

DREWNOWSKI, A. e GOMEZ-CARNEROS, C. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.72, n.6, December 1, 2000, p.1424-1435. 2000.

DUODU, K. G., NUNES, A., DELGADILLO, I., *et al.* Effect of Grain Structure and Cooking on Sorghum and Maize in vitro Protein Digestibility. **Journal of Cereal Science**, v.35, n.2, p.161-174. 2002.

DUODU, K. G., TANG, H., GRANT, A., *et al.* FTIR and Solid State¹³C NMR spectroscopy of proteins of wet cooked and popped sorghum and maize. **Journal of Cereal Science**, v.33, n.3, p.261-269. 2001.

DUODU, K. G., TAYLOR, J. R. N., BELTON, P. S., *et al.* Factors affecting sorghum protein digestibility. **Journal of Cereal Science**, v.38, n.2, p.117-131. 2003.

DYKES, L. e ROONEY, L. W. Sorghum and millet phenols and antioxidants. **Journal of Cereal Science**, v.44, n.3, p.236-251. 2006.

DYKES, L., ROONEY, L. W., WANISKA, R. D., *et al.* Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Sorghum Grains of Varying Genotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.17, p.6813-6818. 2005.

DYKES, L., SEITZ, L. M., ROONEY, W. L., *et al.* Flavonoid composition of red sorghum genotypes. **Food Chemistry**, v.116, n.1, p.313-317. 2009.

ELIAS, M. C., DIONELLO, R. G., FORLIN, F. J., *et al.* Avaliação do uso de ácidos orgânicos na conservação de grãos de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) durante o armazenamento. **Ciências Agrárias**, v.29, n.1, p.35-46. 2008.

ELLIS, R. e MORRIS, R. Appropriate resin selection for rapid phytate analysis by ion-exchange chromatography. **Cereal Chemistry**, v.63, p.58-59. 1986.

EMMAMBUX, M. N. e TAYLOR, J. R. N. Properties of Heat-Treated Sorghum and Maize Meal and Their Prolamin Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.3, p.1045-1050. 2009.

ENRIGHT, L. e SLAVIN, J. No effect of 14 day consumption of whole grain diet compared to refined grain diet on antioxidant measures in healthy, young subjects: a pilot study. **Nutrition Journal**, v.9, n.1, p.12. 2010.

ERKKILA, A. T. e LICHTENSTEIN, A. H. Fiber and Cardiovascular Disease Risk: How Strong Is the Evidence? **Journal of Cardiovascular Nursing**, v.21, n.1, p.3-8. 2006.

ESPOSITO, K., NAPPO, F., GIUGLIANO, F., *et al.* Meal modulation of circulating interleukin 18 and adiponectin concentrations in healthy subjects and in patients with type 2 diabetes mellitus. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.78, n.6, December 1, 2003, p.1135-1140. 2003.

FAO/WHO. **Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation**. WHO Technical Report Series. Geneva, p.284. 2007

FAO/WHO. Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. Geneva: WHO Technical Report Series. 935: 284 p. 2007.

FAOSTAT. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. 2010: <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=en> p. 2007.

FARDET, A., ROCK, E. e RÉMÉSY, C. Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo? **Journal of Cereal Science**, v.48, n.2, p.258-276. 2008.

FARRAR, J. L., HARTLE, D. K., HARGROVE, J. L., *et al.* A novel nutraceutical property of select sorghum (*Sorghum bicolor*) brans: inhibition of protein glycation. **Phytotherapy Research**, v.22, n.8, p.1052-1056. 2008.

FERGUSON, L. R., TASMAN-JONES, C., ENGLYST, H., *et al.* Comparative effects of three resistant starch preparations on transit time and short-chain fatty acid production in rats. **Nutrition and Cancer**, v.36, n.2, p.230–237. 2000.

FILGUEIRAS, C. T., SOARES, A. L., SHIMOKOMAKI, M., *et al.* Avaliação da atividade antioxidante do ácido fítico de germe de milho. **Química Nova**, v.32, p.1787-1791. 2009.

FRARY, C. D. e JOHNSON, R. K. Energia In: L. K. MAHAN e S. K. ESCOTT-STUMP (Ed.). **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. São Paulo: Rocca, 2005. Energia p.20-34

FRIEDMAN, M. e GUMBMANN, M. R. Nutritional Improvement of Soy Flour Through Inactivation of Trypsin Inhibitors by Sodium Sulfite. **Journal of Food Science**, v.51, n.5, p.1239-1241. 1986.

FULEKI, T. e FRANCIS, F. J. Quantitative Methods for Anthocyanins. **Journal of Food Science**, v.33, n.1, p.72-77. 1968.

FURUKAWA, S., FUJITA, T., SHIMABUKURO, M., *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v.114, n.12, p.1752-1761. 2004.

GILL, R., TSUNG, A. e BILLIAR, T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. **Free Radical Biology and Medicine**, v.48, n.9, p.1121-1132. 2010.

GION, T., TAKETOMI, A., SHIRABE, K., *et al.* The role of serum interleukin-8 in hepatic resections. **Surgery Today**, v.40, n.6, p.543-548. 2010.

GIUGLIANO, D., CERIELLO, A. e ESPOSITO, K. The Effects of Diet on Inflammation: Emphasis on the Metabolic Syndrome. **Journal of the American College of Cardiology**, v.48, n.4, p.677-685. 2006.

GIUSTI, M. M. e WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. In: (Ed.). **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**: John Wiley & Sons, Inc., 2001. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy

GODA, T. e TAKASE, S. Effect of dietary fat content on microvillus in rat jejunum. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, v.40, n.2, p.127-136. 1994.

GÓMEZ-CORDOVÉS, C., BARTOLOMEÉ, B., VIEIRA, W., *et al.* Effects of wine phenolics and sorghum tannins on tyrosinase activity and growth of melanoma cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.3, p.1620-1624. 2001.

GRIMBLE, R. F. Nutritional modulation of cytokine biology. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v.14, n.7, p.634-640. 1998.

GÜLÇİN, I., HUYUT, Z., ELMASTAS, M., *et al.* Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. **Arabian Journal of Chemistry**, v.3, n.1, p.43-53. 2010.

HAGERMAN, A. E., RIEDL, K. M., JONES, G. A., *et al.* High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.5, p.1887-1892. 1998.

HAMAKER, B. R., KIRLEIS, A. W., MERTZ, E. T., *et al.* Effect of cooking on the protein profiles and in vitro digestibility of sorghum and maize. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.34, n.4, p.647-649. 1986.

HAMAMA, A. A. e NAWAR, W. W. Thermal decomposition of some phenolic antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, n.6, p.1063-1069. 1991.

HEGSTED, D. Protein quality and its determination. In: J. WHITAKER e S. TANNENBAUUM (Ed.). **Food proteins**. Westport: Publishing, 1977. Protein quality and its determination, p.347-362

HEGSTED, D. M. Protein Quality and its Determination. In: J. H. WHITAKER e S. H. TANNENBAUUM (Ed.). **Foods Proteins**. Westport: AVI Publishing, 1977. Protein Quality and its Determination, p.347-362

HENLEY, E. C. e KUSTER, J. M. Protein quality evaluation by protein digestibility corrected amino acid scoring. **Food Technology**, v.4, p.74-77. 1994.

HOGAN, S., CANNING, C., SUN, S., *et al.* Effects of Grape Pomace Antioxidant Extract on Oxidative Stress and Inflammation in Diet Induced Obese Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.21, p.11250-11256. 2010.

HOTAMISLIGIL, G., SHARGILL, N. e SPIEGELMAN, B. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v.259, n.5091, January 1, 1993, p.87-91. 1993.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v.444, n.7121, p.860-867. 2006.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias - GCEA/IBGE, DPE, COAGRO - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. 2010: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201001_5.shtm p. 2010.

ÍTAVO, C. C. B. F., MORAIS, M. G., ÍTAVO, L. C. V., *et al.* Consumo e digestibilidade de nutrientes de dietas com silagens de grãos amidos de milho ou sorgo, em ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.452-459. 2009.

JAMBUNATHAN, R. e MERTZ, E. T. Relation between tannin levels, rat growth, and distribution of proteins in sorghum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.21, n.4, p.692-696. 1973.

KAMATH, V. G., CHANDRASHEKAR, A. e RAJINI, P. S. Antiradical properties of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) flour extracts. **Journal of Cereal Science**, v.40, n.3, p.283-288. 2004.

KARAOUZENE, N., MERZOUK, H., ARIBI, M., *et al.* Effects of the association of aging and obesity on lipids, lipoproteins and oxidative stress biomarkers: A comparison of older with young men. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v.In Press, Corrected Proof. 2011.

KLOPFENSTEIN, C. F., VARRIANO-MARSTON, E. e HOSENEY, R. C. Cholesterol-lowering effect of sorghum diet in guinea pigs. **Nutrition Reports International**, v.24, p.621–627. 1981.

KOBUE-LEKALAKE, R. I., TAYLOR, J. R. N. e DE KOCK, H. L. Effects of phenolics in sorghum grain on its bitterness, astringency and other sensory properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.87, n.10, p.1940-1948. 2007.

KUMAR, V., SINHA, A. K., MAKKAR, H. P. S., *et al.* Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. **Food Chemistry**, v.120, n.4, p.945-959. 2010.

LAKSHMI, K. B. e VIMALA, V. Hypoglycemic effect of selected sorghum recipes. **Nutrition Research**, v.16, n.10, p.1651-1658. 1996.

LARRAURI, J. A., RUPÉREZ, P. e SAURA-CALIXTO, F. Effect of Drying Temperature on the Stability of Polyphenols and Antioxidant Activity of Red Grape Pomace Peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.4, p.1390-1393. 1997.

LATTA, M. e ESKIN, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.28, n.6, p.1313-1315. 1980.

LEE, S., PARK, Y., ZUIDEMA, M., *et al.* Effects of interventions on oxidative stress and inflammation of cardiovascular diseases. **World journal of cardiology**, v.3, n.1, p.18-24. 2011.

LUCAS, B. e SOTELO, A. Effect of different alkalies, temperature, and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and of foods. **Analytical Biochemistry**, v.109, n.1, p.192-197. 1980.

MACLEAN, W. C., ROMAÑA, G. L. D., PLACKO, R. P., *et al.* Protein quality and digestibility of sorghum in preschool children: balance studies and plasma free amino acids. **The Journal of Nutrition**, v.111, n.11, November 1, 1981, p.1928-1936. 1981.

MAHGOUB, S. E. O. e ELHAG, S. A. Effect of milling, soaking, malting, heat-treatment and fermentation on phytate level of four Sudanese sorghum cultivars. **Food Chemistry**, v.61, n.1-2, p.77-80. 1998.

MARTÍNEZ, B. F. e PAU, C. L. Extrusión de sorgo integral y decorticado. **Agromía mesoamericana**, v.3, p.40 - 44. 1992.

MAXSON, E. D. e ROONEY, L. M. Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. **Cereal Chem.**, v.49, p.719-729. 1972.

MAZZA, G. e BROUILLARD, R. Color stability and structural transformations of cyanidin 3,5-diglucoside and four 3-deoxyanthocyanins in aqueous solutions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.35, n.3, p.422-426. 1987.

MCKEOWN, N. M., TROY, L. M., JACQUES, P. F., *et al.* Whole- and refined-grain intakes are differentially associated with abdominal visceral and subcutaneous adiposity in healthy adults: the Framingham Heart Study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.92, n.5, November 1, 2010, p.1165-1171.

MEHANSHO, H., BUTLER, L. G. e CARLSON, D. M. Dietary Tannins and Salivary Proline-Rich Proteins: Interactions, Induction, and Defense Mechanisms. **Annual Review of Nutrition**, v.7, p.423-440. 1987.

MEHMOOD, S., ORHAN, I., AHSAN, Z., *et al.* Fatty acid composition of seed oil of different Sorghum bicolor varieties. **Food Chemistry**, v.109, n.4, p.855-859. 2008.

MENDES, F. Q., OLIVEIRA, M. G. D. A., COSTA, N. M. B., *et al.* Qualidade protéico de diversos alimentos, incluindo diferentes variedade de soja. **Revista Alimentos e Nutrição**, v.20, n.1, p.77-86. 2009.

MÉNDEZ-ALBORES, A., MARTÍNEZ-BUSTOS, F., VÉLES-MEDINA, J. J., *et al.* Efecto de la adición de ácido cítrico sobre La Degradación de las aflatoxinas y las propiedades Funcionales de productos extrudidos de sorgo. **Interciencia**, v.43, n.4, p.252-258. 2009.

MENEZES, L. F. G., SEGABINAZZI, L. R., BRONDANI, I. L., *et al.* Silagem de milho e grão de sorgo como suplementos para vacas de descarte terminadas em pastagem cultivada de estação fria. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.182-189. 2009.

MERTZ, E. T., HASSEN, M. M., CAIRNS-WHITTERN, C., *et al.* Pepsin digestibility of proteins in sorghum and other major cereals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.81, n.1, January 1, 1984, p.1-2. 1984.

MILAGRO, F. I., CAMPION, J. e MARTINEZ, J. A. Weight Gain Induced by High-Fat Feeding Involves Increased Liver Oxidative Stress[ast]. **Obesity**, v.14, n.7, p.1118-1123. 2006.

MITRE-DIESTE, C. M., GORDON, L. A., AWIKA, J., *et al.* Cookies made with sorghum brans high in phenols and catechins. I. A. A. MEETING. Kansas. 2010: <http://www.aaccnet.org/meetings/2000/abstracts/a00ma203.htm> p. 2000.

MOHAMMED, N. A., MOHAMED, A. I. A. e BABIKER, E. E. Nutritional Evaluation of Sorghum Flour (Sorghum bicolor L. Moench) During Processing of Injera. **International Journal of Biological and Life Sciences** v.6, n.1, p.35-39. 2010.

MOKRANE, H., AMOURA, H., BELHANECH-BENSEMRA, N., *et al.* Assessment of Algerian sorghum protein quality [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] using amino acid analysis and in vitro pepsin digestibility. **Food Chemistry**, v.121, n.3, p.719-723. 2010.

MORAES, É. A., CARRARO, J. C. C., DANTAS, M. I. D. S., *et al.* Qualidade proteica e eficiência alimentar de farinhas integrais de linhaça obtidas de sementes cruas e submetidas a tratamento térmico. **Rev Inst Adolfo Lutz.**, v.90, n.4, p.535-540. 2010.

MORANT, A. V., JØRGENSEN, K., JØRGENSEN, C., *et al.* [beta]-Glucosidases as detonators of plant chemical defense. **Phytochemistry**, v.69, n.9, p.1795-1813. 2008.

NEUMANN, M., RESTLE, J. e BRONDANI, I. L. Avaliação de silagens de sorgo (*Sorghum bicolor*, L. Moench) ou milho (*Zea mays*, L.) na produção do novilho superprecoce. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.3, n.3, p. 438-452. 2004.

NIBA, L. L. e HOFFMAN, J. Resistant starch and [beta]-glucan levels in grain sorghum (*Sorghum bicolor* M.) are influenced by soaking and autoclaving. **Food Chemistry**, v.81, n.1, p.113-118. 2003.

NYAMAMBI, B., NDLOVU, L. R., NAIK, Y. S., *et al.* Intestinal growth and function of broiler chicks fed sorghum based diets differing in condensed tannin levels. **South African Journal of Animal Science**, v.37, n.3, p.202-214. 2007.

O'KENNEDY, M. M., GROOTBOOM, A. e SHEWRY, P. R. Harnessing sorghum and millet biotechnology for food and health. **Journal of Cereal Science**, v.44, n.3, p.224-235. 2006.

ONYANGO, C., NOETZOLD, H., BLEY, T., *et al.* Proximate composition and digestibility of fermented and extruded uji from maize-finger millet blend. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.37, n.8, p.827-832. 2004.

PATERNAIN, L., GARCÍA-DÍAZ, D. F., MILAGRO, F. I., *et al.* Regulation by chronic-mild stress of glucocorticoids, monocyte chemoattractant protein-1 and adiposity in rats fed on a high-fat diet. **Physiology & Behavior** v.103 p.173-180. 2011.

PIRES, C. V., OLIVEIRA, M. G. D. A., ROSA, J. C., *et al.* Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.179-187. 2006.

PRATES, H. T., SCHAFFERT, R. E., SANTOS, F. G., *et al.* Isolation, purification, and quantification of dhuririn from tannin-free bird-resistant grain sorghum. **International Sorghum and Millets Newsletter**, v.39, p.103-104. 1998.

PRICE, M. L., VAN SCOYOC, S. e BUTLER, L. G. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.26, n.5, p.1214-1218. 1978.

RAGAE, S., ABDEL-AAL, E.-S. M. e NOAMAN, M. Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. **Food Chemistry**, v.98, n.1, p.32-38. 2006.

REEVES, P. G., NIELSEN, F. H. e FAHEY, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**, v.123, n.11, November 1, 1993, p.1939-1951. 1993.

RESTLE, J., FATURI, C., ALVES FILHO, D. C., *et al.* Substituição do grão de sorgo por casca de soja na dieta de novilhos terminados em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.1009-1015. 2004.

REUTER, S., GUPTA, S. C., CHATURVEDI, M. M., *et al.* Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v.49, n.11, p.1603-1616. 2010.

RICO, C., SHIN, J.-H., UM, I., *et al.* Cholesterol-lowering action and antioxidative effects of microbial gum in C57BL/6N mice fed a high fat diet. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.16, n.1, p.167-172. 2011.

RIEDL, K. M. e HAGERMAN, A. E. Tannin - Protein Complexes as Radical Scavengers and Radical Sinks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.10, p.4917-4923. 2001.

ROBERTSA, C. K., BARNARDA, R. J., SINDHUB, R. K., *et al.* Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. **Metabolism Clinical and Experimental**, v.55, p.928-934. 2006.

SANCHEZ, D. A. **White food-type sorghum in direct-expansion extrusion applications**. Food Science and Technology., Texas A&M University, Texas, 2003. 132 p.

SCOARIS, C. R., RIZO, G. V., ROLDI, L. P., *et al.* Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats. **Nutrition**, v.26, n.3, p.312-320. 2010.

SHAKOURI, M. D., IJI, P. A., MIKKELSEN, L. L., *et al.* Intestinal function and gut microflora of broiler chickens as influenced by cereal grains and microbial enzyme supplementation. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.93, n.5, p.647-658. 2009.

SHIH, C.-H., SIU, S.-O., NG, R., *et al.* Quantitative Analysis of Anticancer 3-Deoxyanthocyanidins in Infected Sorghum Seedlings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.2, p.254-259. 2006.

SILVA, A. G., BARROS, A. S., SILVA, L. H. C. P., *et al.* Avaliação de cultivares de sorgo granífero na safrinha no sudoeste do estado de goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.39, n.2, p.168-174. 2009.

SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTÓS, R. M., *et al.* Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. Volume 299, 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, p.152-178

SINGLETON, V. L., RUDOLF, O., LAMUELA-RAVENTÓS, R. M., *et al.* Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v.299, 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, p.152-178

SLAVIN, J. Whole grains and human health. **Nutrition Research Reviews**, v.17, n.01, p.99-110. 2004.

SLIM, R. M., TOBOREK, M., WATKINS, B. A., *et al.* Susceptibility to hepatic oxidative stress in rabbits fed different animal and plant fats. **Journal of the American College of Nutrition**, v.15, n.3, June 1, 1996, p.289-94. 1996.

SOUZA, C. C. D., DANTAS, J. P., SILVA, S. D. M., *et al.* Produtividade do Sorgo granífero cv. sacarino e qualidade de produtos formulados isoladamente ou combinados ao caldo de cana-de-açúcar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p.512-517. 2005.

SOUZA, G. F. M. V., SANTOS, C. M., SANTANA, D. G., *et al.* Armazenamento de sementes de sorgo submetidas a diferentes graus de umidade de colheita. **Semina: Ciências Agrárias**, v.30, n.4, p.745-752. 2009.

SPACKMAN, D. H., STEIN, W. H. e MOORE, S. Automatic Recording Apparatus for Use in Chromatography of Amino Acids. **Analytical Chemistry**, v.30, n.7, p.1190-1206. 1958.

TAYLOR, J. R. N., SCHOBBER, T. J. e BEAN, S. R. Novel food and non-food uses for sorghum and millets. **Journal of Cereal Science**, v.44, n.3, p.252-271. 2006.

TERRA, X., VALLS, J., VITRAC, X., *et al.* Grape-Seed Procyanidins Act as Antiinflammatory Agents in Endotoxin-Stimulated RAW 264.7 Macrophages by Inhibiting NFkB Signaling Pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.11, p.4357-4365. 2007.

THOMAS, D. V., RAVINDRAN, V. e THOMAS, D. G. **Performance, digestive tract measurements and gut morphology in broiler chickens fed diets containing maize, wheat or sorghum**. Proceedings of the 17th Australian Poultry Science Symposium. Sydney, New South Wales, Australia,, 2005. 61-62 p.

THORNTON-JONES, Z. D., KENNETT, G. A., BENWELL, K. R., *et al.* The cannabinoid CB1 receptor inverse agonist, rimonabant, modifies body weight and adiponectin function in diet-induced obese rats as a consequence of reduced food intake. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.84, n.2, p.353-359. 2006.

TOMAZ, P. A., QUEIROZ, V. A. V., MARTINO, H. S. D., *et al.* Determinação de minerais em diferentes cultivares de sorgo (*sorghum bicolor*). **IX Simpósio de Iniciação Científica da Universidade Federal de Viçosa**. Viçosa, MG, Brasil 2009.

TURNER, N., DIAZ, A., TADDEO, S. S., *et al.* Bran from black or brown sorghum suppresses colon carcinogenesis. **FASEB Journal** v.20, n.A599. 2006.

USDA. National Nutrient Database for Standard Reference, United States Department of Agriculture: http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl p. 2010.

VALTUEÑA, S., PELLEGRINI, N., FRANZINI, L., *et al.* Food selection based on total antioxidant capacity can modify antioxidant intake, systemic inflammation, and liver function without altering markers of oxidative stress. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.87, n.5, May 1, 2008, p.1290-1297. 2008.

WONG, J. M. W., SOUZA, R., KENDALL, C. W. C., *et al.* Colonic Health: fermentation and short chain fatty acids. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.40, n.3, p.235-243. 2006.

WRIGHT, L., BRANDON, A., HOY, A., *et al.* Amelioration of lipid-induced insulin resistance in rat skeletal muscle by overexpression of Pgc-1 β involves reductions in long-chain acyl-CoA levels and oxidative stress. **Diabetologia**, v.54, n.6, p.1417-1426. 2011.

YANG, L., BROWNING, J. D. e AWIKA, J. M. Sorghum 3-Deoxyanthocyanins possess strong phase II enzyme inducer activity and cancer cell growth inhibition properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.5, p.1797-1804. 2009.

YEH, C.-T., CHING, L.-C. e YEN, G.-C. Inducing gene expression of cardiac antioxidant enzymes by dietary phenolic acids in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.20, n.3, p.163-171. 2009.