



**Caracterização nutricional, química e bioativa de sorgo  
(*Sorghum bicolor* (L.) Moench) germinado e *in natura* e aplicação das  
farinhas em produtos de panificação**

**Diogo Salvati**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção  
do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no âmbito da dupla  
diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná*

Orientadoras

**Doutora Maria Inês Moreira Figueiredo Dias**

**Doutora Carla Susana Correia Pereira**

**Professora Doutora Nádia Cristiane Steinmacher**

**Bragança**

**Janeiro de 2023**

Este trabalho foi financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Regional Norte 2020, no âmbito do Projeto GreenHealth - Estratégias digitais baseadas em ativos biológicos para melhorar o bem-estar e promover a saúde verde, Norte-01-0145-FEDER-000042.



Aos meus pais,  
**dedico.**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha família, meu irmão Dionei Salvati, minha cunhada Jaqueline de Oliveira Silva, minha sobrinha Julia Carolini Salvati, em especial aos meus pais, Valdeci Salvati e Maria Inês Alievi, obrigado por todo o apoio e pela ajuda, que muito contribuíram para que tudo se tornasse possível. Ao Marcielo Cologni e sua família, por todo o suporte e ajuda nessa trajetória.

Às minhas orientadoras Doutora Maria Inês Dias, Doutora Carla Pereira e Doutora Nádia Cristiane Steinmacher, um agradecimento especial, por orientarem o meu trabalho e por tudo o que aprendi durante o desenvolvimento desta dissertação.

Agradeço à doutoranda Beatriz Helena Paschoalinotto por toda a ajuda durante a realização deste projeto, que só foi possível devido aos seus ensinamentos, orientação e paciência. Muito obrigado por me guiar nesta jornada!

Agradeço aos meus amigos, Shinti Iwamura, Mariana Moia, Daniela Elsenbach, Bruno Marra, Arnaldo Dias e Alexandre de Oliveira Junior, por ser minha casa e minha família nesse período morando em Portugal.

Gostaria de agradecer aos meus queridos amigos da UTFPR, esta jornada foram os melhores anos da minha vida graças a cada um de vocês, obrigado por todos os momentos de alegria, tristeza, aventura e aprendizado que passamos juntos. Vocês são tantos e gostaria de poder agradecer a cada um individualmente, mas em especial gostaria de agradecer a Leticia da Silva Pulitano, Larissa Ramos, Felipe Rodrigues, Eduarda Lorençon, Aline Mazzola, Ana Carolina Striechen, Isabele Monteiro e Carla Satiro, obrigado por todas as lembranças que levarei comigo ao longo da vida.

Também gostaria de agradecer a UTFPR de Medianeira, por todas as experiências proporcionadas nos últimos anos, pela oportunidade de fazer parte do programa de dupla diplomação, e deixar meus sinceros agradecimentos a todos os meus professores que tanto me ensinaram. Ao IPB por me ter acolhido e possibilitado o desenvolvimento deste trabalho, bem como a todos os meus professores.

Agradeço à Doutora Lillian Barros e ao Professor Manuel Gómez Pallarés pela sua confiança inigualável e contribuição para esse trabalho, a todos que participaram, direta ou indiretamente no desenvolvimento deste projeto, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

*“Educação não transforma o mundo.  
Educação muda pessoas.  
Pessoas transformam o mundo”.*  
*(Paulo Freire)*



## RESUMO

As Plantas Alimentares Não Convencionais (PANC) surgem como uma alternativa viável e segura para a substituição das farinhas com glúten, apresentando potencial nutricional, químico e bioativo, para além do menor custo e melhores padrões de qualidade sensorial. A farinha de *Sorghum bicolor* (L.) Moench destaca-se para o desenvolvimento de produtos de panificação, sobretudo após germinação do grão. Neste sentido, este trabalho visou aprofundar o estudo sobre a farinha de sorgo germinado e *in natura* quanto às características tecnológicas das farinhas em relação à granulometria, capacidade de absorção de água e óleo, poder de dilatação e solubilidade, viscosidade da pasta e microscopia dos grânulos de amido. Também foi realizada uma profunda caracterização nutricional pelos métodos da AOAC, determinação de açúcares livres (HPLC-RI), ácidos gordos (GC-FID), ácidos orgânicos (UPLC-DAD), tocoferóis (HPLC-FL) e compostos fenólicos (HPLC-DAD/ESI-MS). As atividades antioxidante, anti-inflamatória, hepatotóxica, nefrotóxica e citotóxica do seu extrato hidroetanólico foram também avaliadas. Finalmente, foram elaborados pães isentos dos principais alergénios alimentares com as farinhas de sorgo *in natura* e germinado, sendo estudadas as propriedades físicas cor, perda de peso, perfil de textura, atividade da água, humidade e volume específico, assim como foi avaliado o seu perfil nutricional, químico e bioativo.

De acordo com os resultados obtidos, o processo de germinação aumentou a capacidade de absorção de óleo e a solubilidade e diminuiu o poder de dilatação da farinha de sorgo. Quanto às propriedades da pasta, a farinha germinada apresentou menor firmeza do gel e menor taxa de retrogradação com o passar do tempo de armazenamento, podendo-se também observar um aumento na temperatura de germinação e menor viscosidade da pasta. Além das alterações às propriedades das farinhas, as atividades bioquímicas desenvolvidas durante a germinação para o desenvolvimento da nova planta influenciaram significativamente as características nutricionais, resultando em diferenças significativas em todos os macronutrientes estudados, aumentando o teor de humidade, cinzas e proteína total e uma diminuição nos teores de gordura total, fibras dietéticas totais e hidratos de carbono, assim como no aumento da concentração de ácidos gordos monoinsaturados.

Quanto à composição química das farinhas, com a germinação, verificou-se um aumento no teor de açúcares livres e ácidos orgânicos totais e diminuição dos teores de

tocoferóis e compostos fenólicos. Em termos de bioatividade, o extrato da farinha de sorgo germinado apresentou melhor capacidade de inibição da peroxidação lipídica, sendo que nenhum dos extratos revelou hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, fatores muito importantes para a validação do uso das farinhas para fins alimentares.

As formulações dos pães elaborados com as farinhas de sorgo germinado e *in natura* apresentaram ambos maiores concentrações de proteínas, fibras dietéticas totais e gordura, quando comparados com o controlo positivo, sendo a gordura composta maioritariamente por ácidos gordos insaturados. Para além disso, os pães desenvolvidos com farinha de sorgo *in natura* e germinado, revelaram uma coloração mais escura, com maior dureza do miolo e menor volume específico, resultados característicos dos produtos elaborados com farinhas integrais e sem glúten. No entanto, o pão de farinha de sorgo germinado apresentou menor aumento de dureza e mastigabilidade do miolo após 24 h de armazenamento. Em relação às propriedades bioativas dos produtos desenvolvidos, o pão de sorgo germinado revelou maior capacidade de inibição da peroxidação lipídica, seguida pelo pão de sorgo *in natura*. As amostras de pão, assim como as farinhas, não revelaram citotoxicidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e capacidade anti-inflamatória à máxima concentração testada (>400 µg/mL).

Este estudo permitiu apresentar resultados inovadores em relação à caracterização química e bioativa das farinhas de sorgo germinado e *in natura*, assim como do produto de panificação elaborado a partir das mesmas. Os resultados obtidos revelam um grande potencial destas farinhas para serem aplicadas na indústria alimentar, no desenvolvimento de produtos sem glúten, com vista à substituição de ingredientes convencionais por não convencionais.

**Palavras-chave:** Plantas alimentares não convencionais (PANC); propriedades nutricionais, químicas e bioativas; produtos de panificação; germinação.

## ABSTRACT

Nonconventional Food Plants (NFP) emerge as a viable and safe alternative to gluten-free flours, presenting nutritional, chemical, and bioactive potential, as well as lower cost, and better quality and sensory standards. *Sorghum bicolor* (L.) *Moench* flours stands out for the development of bakery products, especially after grain germination. In this sense, the present work aimed to deepen the study of sprouted and *in natura* sorghum flour regarding their technological characteristics in relation to granulometry, water, and oil absorption capacity, swelling power and solubility, viscosity of the paste, and microscopy of starch granules. Their nutritional characterization by AOAC methods, determination of free sugars (HPLC-RI), fatty acids (GC-FID), organic acids (UPLC-DAD), tocopherols (HPLC-FL), and phenolic compounds (HPLC-DAD/ESI-MS<sup>n</sup>) was also performed. The antioxidant, anti-inflammatory, hepatotoxic, nephrotoxic, and cytotoxic activities of the hydroethanolic extracts of the flours were also evaluated. Finally, breads free of the main food allergens were prepared with *in natura* and sprouted sorghum flours, and the physical properties of color, weight loss, texture profile, water activity, humidity, and specific volume, as well as their nutritional, chemical, and bioactive profile were studied.

According to the results obtained, the germination process increased the oil absorption capacity and solubility and decreased the swelling power of sorghum flour. As for the paste properties, the sprouted flour presented lower gel firmness and lower retrogradation rate over the storage time, and an increase in the point of gelatinization and lower paste viscosity could also be observed. In addition to the changes to the flours properties, the biochemical activities developed during germination for the development of the new plant significantly influenced the nutritional characteristics, resulting in significant differences in all macronutrients studied, increasing the moisture, ash, and total protein contents and a decrease in the contents of total fat, total dietary fibers, and carbohydrates, as well as an increase in the concentration of monounsaturated fatty acids.

Regarding the chemical composition of the flours, with the germination, an increase in the free sugars and organic acids content was observed, as well as a decrease in the content of tocopherols and phenolic compounds. In terms of bioactive properties, the sprouted flour hydroethanolic extract presented better inhibition of lipid peroxidation capacity; none of the hydroethanolic extracts revealed hepatotoxicity and

nephrototoxicidade, which are very important factors for the validation of the use of these flours for food purposes.

The formulations of breads prepared with sprouted and *in natura* sorghum flours presented higher concentrations of proteins, total dietary fibers, and fat, mainly composed of unsaturated fatty acids, when compared with the positive control. Furthermore, the breads developed with *in natura* and sprouted sorghum flour revealed a darker coloration, higher crumb hardness and lower specific volume, characteristic results of products made with whole grain and gluten-free flours. However, sprouted sorghum flour bread showed a lower increase in hardness and chewability of the crumb after 24 h of storage. Regarding the bioactive properties of the developed products, sprouted sorghum bread showed greater capacity to inhibit lipid peroxidation, followed by *in natura* sorghum bread. Bread samples, as also the flours, did not show cytotoxicity, hepatotoxicity, nephrotoxicity, nor anti-inflammatory capacity at the maximum concentration tested (>400 µg/mL).

This study allowed to present innovative results regarding the chemical and bioactive characterization of sprouted and *in natura* sorghum flours, as well as the bakery product developed. The results obtained revealed a great potential of these flours to be applied in food industry, for the development of gluten-free products, for the replacement of conventional by unconventional ingredients.

**Keywords:** Nonconventional Food Plants (NFP); nutritional, chemical and bioactive properties; bakery products; germination.

## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	IV
<b>RESUMO.....</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>ÍNDICE GERAL .....</b>	<b>X</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>XV</b>
<b>ÍNDICE DE EQUAÇÕES.....</b>	<b>XVI</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS.....</b>	<b>XVII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Alergia e intolerância alimentar.....	1
1.1.1. Doença celíaca.....	2
1.1.2. Glúten .....	3
1.1.3. Ovo .....	4
1.2. Panificação.....	4
1.2.1. Padrão de identidade e qualidade do pão.....	4
1.2.2. Panificação livre de alergénios .....	5
1.2.3. Goma xantana.....	6
1.2.4. Aquafaba.....	6
1.3. Plantas Alimentares Não Convencionais ( <i>PANC</i> ).....	7
1.3.1. Sorgo.....	9
1.3.1.1. Estrutura do Grão .....	10
1.3.1.2. Composição centesimal e química do sorgo .....	11
1.3.1.3. Hidratos de carbonos – importância do amido.....	11
1.3.1.4. Proteína.....	13
1.3.1.5. Lípidos, fibras, minerais e vitaminas .....	14
1.3.1.6. Compostos bioativos .....	14
1.3.2. Germinação.....	15
1.4. Objetivos.....	17
<b>2. METODOLOGIA .....</b>	<b>19</b>
2.1. Padrões e reagentes .....	19
2.2. Amostras de Sorgo e preparação das farinhas .....	20

2.3. Estudos das propriedades termofísicas das farinhas obtidas de sorgo <i>in natura</i> e germinado.....	21
2.3.1 Granulometria da farinha .....	21
2.3.2. Firmeza do gel.....	21
2.3.3. Poder de dilatação e solubilidade .....	22
2.3.4. Capacidade de Absorção de Água (CAA) e Capacidade de Absorção de Óleo (CAO).....	23
2.3.5. Perfil de viscosidade (RVA, Rapid Viscosity Analyser).....	23
2.3.6. Microscopia dos grânulos de amido.....	24
2.4. Estudo da composição nutricional, perfil químico e propriedades bioativas das farinhas de sorgo <i>in natura</i> e germinado .....	24
2.4.1. Composição nutricional.....	24
2.4.1.1. Humidade .....	24
2.4.1.2. Cinzas .....	25
2.4.1.3. Gordura total.....	25
2.4.1.4. Proteína bruta.....	25
2.4.1.5. Fibras dietéticas totais .....	26
2.4.1.6. Hidratos de carbono.....	27
2.4.1.7. Valor energético .....	28
2.4.2. Caracterização fitoquímica.....	28
2.4.2.1. Açúcares livres .....	28
2.4.2.2. Ácidos orgânicos .....	29
2.4.2.3. Ácidos gordos .....	30
2.4.2.4. Tocoferóis (vitamina E).....	31
2.4.2.5 Compostos fenólicos.....	32
2.4.3. Avaliação das propriedades bioativas <i>in vitro</i> .....	33
2.4.3.1. Atividade antioxidante.....	34
2.4.3.2. Atividade citotóxica em células tumorais e hepatotóxica e nefrotóxica em células não tumorais .....	36
2.4.3.3. Atividade anti-inflamatória.....	38
2.5. Aplicação da farinha de sorgo <i>in natura</i> e germinado em produtos de panificação .....	39
2.5.1. Preparação da aquafaba em pó .....	40
2.5.2. Avaliação das propriedades físicas dos produtos de panificação desenvolvidos .....	41
2.5.2.1. Textura.....	41

2.5.2.2. Atividade de água (Aw).....	42
2.5.2.3. Cor .....	42
2.5.2.4. Perda de peso após cozedura .....	42
2.5.2.5. Volume específico .....	43
2.5.3. Avaliação das propriedades nutricionais, químicas, e bioativas dos produtos obtidos .....	43
2.6. Análise estatística .....	43
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
3.1. Caracterização das farinhas de sorgo <i>in natura</i> e germinado .....	46
3.1.1. Cor, granulometria e propriedades funcionais das farinhas .....	46
3.1.2. Perfil nutricional, valor energético e composição química das farinhas.....	51
3.1.2.1. Composição nutricional das farinhas obtidas .....	51
3.1.2.2. Composição química das farinhas obtidas .....	54
3.1.3. Propriedades bioativas das farinhas de sorgo <i>in natura</i> e germinado.....	61
3.2. Caracterização dos produtos de panificação desenvolvidos .....	63
3.2.1. Parâmetros físicos dos produtos de panificação desenvolvidos.....	63
3.2.1. Composição nutricional e química dos produtos de panificação desenvolvidos .....	70
3.2.3. Propriedades bioativas dos produtos de panificação desenvolvidos .....	75
<b>4. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS .....</b>	<b>78</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>82</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática da formação do glúten (Tornisiello, 2019). .....	3
<b>Figura 2:</b> Plantação de sorgo (Canal Rural, 2022). .....	9
<b>Figura 3:</b> Estrutura do sorgo: pericarpo, endosperma (camada de aleurona, córneo e farinhento) e gérmen (escutelo e eixo embrionário) (Ratnavathi & Komala, 2016).....	10
<b>Figura 4:</b> Cruz de malta característica de grão de amido antes da gelatinização .....	12
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática do plano de trabalhos desenvolvidos (Autoria própria, 2023). .....	19
<b>Figura 6:</b> <b>A:</b> Grãos de sorgo germinado e <b>B:</b> Hidratação dos grãos de sorgo .....	21
<b>Figura 7:</b> <b>A:</b> Gel de farinha de sorgo <i>in natura</i> ; <b>B:</b> Gel de farinha de sorgo germinado (Autoria própria, 2023).....	22
<b>Figura 8:</b> <b>A:</b> Precipitação da solução das fibras insolúveis; <b>B:</b> Cadinhos de filtração (Autoria própria, 2023).....	27
<b>Figura 9:</b> Fração alcoólica dos extratos hidroetanólicos (Autoria própria, 2023).....	32
<b>Figura 10:</b> Complexo malondialdeído-ácido tiobarbitúrico na microplaca de 96 poços (Autoria própria, 2023).....	35
<b>Figura 11:</b> Ilustração do esquema de produção de aquafaba líquida.....	40
<b>Figura 12:</b> Amostra de pão preparada para análise de textura no texturômetro (Autoria própria, 2023). .....	41
<b>Figura 13:</b> Espaço de cor CIE Lab (Konica Minolta, 2021).....	42
<b>Figura 14:</b> Grão de sorgo <i>in natura</i> e germinado e respectivas farinhas; (a): Farinha de sorgo <i>in natura</i> ; (b): Farinha de sorgo germinado; (c): Grão de sorgo <i>in natura</i> ; (d): Grão de sorgo germinado. (Autoria própria, 2023). .....	46
<b>Figura 15:</b> Perfil de pasta da farinha de sorgo: (a) sorgo germinado (b) sorgo <i>in natura</i> . (Autoria própria, 2023).....	50
<b>Figura 16:</b> Micrografias eletrônicas de varrimento da farinha de sorgo <i>in natura</i> e germinado; (a): Amostra nativa (800×), (b): Amostra germinada (800×); (c): Amostra <i>in natura</i> (1500×); (d) Amostra germinada (1500×). (Autoria própria, 2023).....	53
<b>Figura 17:</b> Pães e fatias com suas respectivos códigos de cada formulação; PSIN: Pão com farinha de sorgo <i>in natura</i> ; PSG: Pão com farinha de sorgo germinado; PCP: Pão controlo positivo (mix de farinhas sem glúten); PCN: Pão controlo negativo (trigo). (Autoria própria, 2023).....	65

**Figura 18:** Curva de análise de perfil de textura instrumental obtida do teste de pão.  
(Autoria própria, 2023)..... 67

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros de cor, granulometria, CAA, CAO, poder de dilatação, solubilidade, firmeza e propriedades das farinhas de sorgo <i>in natura</i> e germinado (Média±DP).....	47
<b>Tabela 2:</b> Perfil nutricional e valor energético das farinhas de sorgo germinado e <i>in natura</i> (Média±DP). ....	52
<b>Tabela 3:</b> Composição química em relação aos açúcares livres, ácidos orgânicos, tocoferóis e ácidos gordos das farinhas de sorgo germinado e <i>in natura</i> (Média±DP)..	54
<b>Tabela 4:</b> Composição ácidos e tocoferóis gordos da farinha de sorgo <i>in natura</i> e germinado (média ± DP). ....	57
<b>Tabela 5:</b> Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do ultravioleta ( $\lambda_{max}$ ), dados de espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação (mg/g extrato) dos compostos fenólicos presentes em extratos hidroetanólicos das farinhas de sorgo germinado e <i>in natura</i> . ....	59
<b>Tabela 6:</b> Atividade antioxidante, citotóxica, hepatotóxica, nefrotóxica e anti-inflamatória dos extratos hidroetanólicos das farinhas de sorgo <i>in natura</i> e germinado (média ± DP). ....	62
<b>Tabela 7:</b> Propriedades físicas e parâmetro de cor dos pães formulados (média ± DP).	64
<b>Tabela 8:</b> Propriedades físicas instrumental dos pães formulados (média ± DP).....	68
<b>Tabela 9:</b> Composição nutricional e valor energético dos pães formulados (média ± DP). ....	70
<b>Tabela 10:</b> Composição em açúcares livres e ácidos orgânicos dos pães elaborados (média ± DP). ....	72
<b>Tabela 11:</b> Composição em ácidos gordos (percentagem relativa) e tocoferóis (g/100g ps) dos pães formulados (média ± DP).....	74
<b>Tabela 12:</b> Atividade antioxidante, citotóxica, hepatotóxica, nefrotóxica e anti-inflamatória dos extratos hidroetanólicos dos pães formulados (média ± DP). ....	75

## ÍNDICE DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1:</b> Percentagem (%) de farinha retida em cada peneira e base. ....	21
<b>Equação 2:</b> Cálculo do teor de proteína bruta (g/100g ps). ....	26
<b>Equação 3:</b> Teor de fibras dietéticas totais (g/100g ps). ....	27
<b>Equação 4:</b> Cálculo do teor de hidratos de carbono (g/100g ps). ....	27
<b>Equação 5:</b> Cálculo do valor energético (kcal/100g ps). ....	28
<b>Equação 6:</b> Determinação da taxa de inibição em ensaio TBARS. ....	35
<b>Equação 7:</b> Percentagem de população de eritrócitos intactos. ....	36
<b>Equação 8:</b> Tempo de atraso da hemólise. ....	36
<b>Equação 9:</b> Perda de peso após cozedura. ....	43
<b>Equação 10:</b> Volume específico. ....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

%	Porcentagem
<	Menor
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
°	Graus
°C	Graus celsius
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
<i>a</i> *	Componente vermelho-verde
AACC	<i>American Association of Cereal Chemists/</i> Associação Americana de Químicos de Cereais
AAPH	2-amidinopropano
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists/</i> Associação Oficial de Químicos Analíticos
<i>A<sub>w</sub></i>	Atividade de água
<i>b</i> *	Componente amarelo-azul
BD	Decomposição
CAA	Capacidade de Absorção de Água
CaCo	Adenocarcinoma colorretal
CAO	Capacidade de Absorção de Óleo
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
cP	Centipoise
<i>df</i>	<i>Film thickness/</i> Grossura do filme
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DP	Desvio Padrão
EUA	Estados Unidos da América
FAME	<i>Fatty Acid Methyl Esthers/</i> Ésteres Metílicos de Ácidos Gordos
FID	<i>Flame Ionization Detector/</i> Detetor de Ionização de Chama
FL	Detetor de fluorescência

FV	Viscosidade final
g	Grama
g/cm <sup>2</sup>	Grama por centímetro quadrado
g/g	Grama por grama
h	Hora
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography/</i> Cromatografia Líquida de Alta eficiência
Ht <sub>50</sub>	Tempo hemolítico de 50%
IC <sub>50</sub>	Concentração responsável por 50% da atividade
IG <sub>50</sub>	Concentração com capacidade de inibir 50% do crescimento celular
kg	Quilograma
kV	Quilovolt
L*	Luminosidade
LPS	Lipossacarídeo
M	Concentração Molar
m/v	Razão massa/volume
m/z	Razão massa/carga
MCF-7	Célula de adenocarcinoma de mama
mg/mL	Miligrama por mililitro
min	Minuto
mL	Mililitro
mL/g	Mililitro por grama
mL/min	Mililitro por minuto
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mm/s	Milímetro por segundo
MS	Espectrometria de massa
MS <sup>2</sup>	Dupla espectrometria de massa
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados
N	Newton
n°	Número
Nd	Não detectado
nm	Nanometro

OxHLIA	<i>Oxidative haemolysis inhibition</i> /Inibição da hemólise oxidativa
PANC	Plantas Alimentares Não Convencionais
PCN	Pão Controlo Negativo
PCP	Pão controlo Positivo
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Padrão Interno
PLP <sub>2</sub>	Cultura primária de fígado de porco
Ps	Peso seco
PSG	Pão de Sorgo Germinado
Psi	<i>Per square inch</i> / Libra-força por polegada quadrada
PSIN	Pão de Sorgo <i>In Natura</i>
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
PV	Pico de viscosidade
R <sup>2</sup>	Coefficiente de correlação
RI	<i>Refraction Index</i> /Índice de refração
Rpm	Rotação por minuto
RVA	<i>Rapid Viscosity Analyser</i>
s	Segundos
SB	Recuo
SFA	Ácidos gordos saturados
SRB	Sulforodamina B
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TPA	<i>Texture Profile Analysis</i>
Tr	Tempo de Retenção
Tris	Trisaminometano
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
U/mL	Unidades por mililitro
UE	União Europeia
UFLC	Cromatografia líquida ultra-rápida
UR	Humidade relativa
USA	Estados Unidos da América
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>

UV	Radiação ultravioleta
UV/Vis	Radiação ultravioleta-visível
V	Volt
v	Volume
v/v	Razão volume/volume
Vero	Células de rim de macaco verde africano
Vg	Vestígios
$\Delta t$	Variação de tempo
$\lambda_{\max}$	Comprimento de onda de absorção máxima
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro



# Capítulo 1



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Alergia e intolerância alimentar

As alergias alimentares são um problema crescente de saúde pública e de segurança alimentar que afetam atualmente cerca de 5% da população nos países ocidentais (Costa et al., 2019). Mais de 170 alimentos foram já identificados como alergénios; no entanto, a grande maioria das alergias alimentares são provocadas por um pequeno número de alimentos como o leite de vaca, o ovo, o amendoim, o trigo, a soja, as nozes, o peixe e o marisco (Carsin et al., 2015). O Regulamento (UE) N.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de outubro de 2011 descreve os principais alimentos alergénios, no qual se inclui o trigo e outros cereais, crustáceos, ovos, peixes, vários frutos secos, leite e derivados e moluscos. A descrição da presença destes alergénios nos rótulos dos alimentos que contenham ou que possam conter vestígios dos mesmos é obrigatória.

As alergias alimentares são definidas como uma resposta do sistema imunitário que ocorre repetidamente em indivíduos sensíveis após exposição a um determinado alimento e que se manifesta por sintomas que podem afetar diferentes partes do corpo com diferentes níveis de gravidade, desde comichão, urticária e diarreia a anafilaxia aguda com diminuição da pressão arterial e constrição das vias aéreas, com risco de vida (Noti et al., 2014). A suscetibilidade de adquirir uma alergia alimentar, como todas as doenças crónicas, é influenciada pela genética, pelo meio ambiente e pelas interações genoma-ambiente, incluindo efeitos epigenéticos (Sicherer & Sampson, 2018).

Ao contrário da alergia alimentar, a intolerância é uma reação adversa não imunológica, mais comum que as alergias alimentares, e está relacionada com a digestão ou transformação dos alimentos no organismo, podendo ser causada por qualquer componente alimentar não proteico (Carco et al., 2020). É categorizada em três tipos: enzimática, farmacológica e indefinida ou idiopática. Todas as tipologias incluem sintomas dermatológicos como edema, formigueiro, sintomas respiratórios como broncoconstrição, dispneia e sibilos, sintomas gastrointestinais, incluindo cólicas estomacais e náuseas. A intolerância a certos alimentos ocorre imediatamente após o consumo ou até 48 horas após o consumo (Schnedl et al., 2020).

Uma das principais formas de tratamento da intolerância e alergias alimentares é a total exclusão dos alimentos responsáveis pelo aparecimento dos sintomas (Solé et al., 2018). Esta total isenção dos alimentos alergénios na dieta dos indivíduos pode causar défice nutricional, perturbar o crescimento e o desenvolvimento de crianças, gerar ansiedade e isolamento social pela mudança no estilo de vida e afetar também economicamente pela falta de alimentos alternativos que, quando existem, são geralmente mais caros (Muthukumar et al., 2020).

Assim, é de extrema importância o desenvolvimento de alimentos com menor potencial alergénio, com substituição por matérias primas de maior valor nutricional e de baixo custo.

### *1.1.1. Doença celíaca*

A doença celíaca é uma doença autoimune causada pela sensibilidade permanente ao glúten em indivíduos geneticamente suscetíveis (Jericho et al., 2017). A ingestão de glúten desencadeia uma resposta inflamatória no intestino delgado, provocando lesões na mucosa que resultam na dificuldade de absorção de nutrientes (Quan et al., 2021). A incidência e os diagnósticos de doença celíaca têm vindo a aumentar, com uma prevalência no Reino Unido e na Europa continental, estimada em quase 1% da população (Jericho et al., 2017; Uche-Anya & Lebwohl, 2021).

Os sintomas da doença celíaca variam em cada indivíduo e estão relacionados com fatores como a idade, extensão e gravidade da lesão na mucosa, grau de sensibilidade ao glúten e ingestão diária de glúten (Uche-Anya & Lebwohl, 2021). Em geral, os indivíduos portadores desta doença apresentam dor abdominal, diarreia crónica ou intermitente, vômito, perda de peso, falta de apetite, distensão abdominal e desnutrição grave em casos de diagnóstico tardio (Guandalini & Assiri, 2014).

A forma de prevenção desta doença é uma dieta 100% isenta de glúten para o resto da vida (Guandalini & Assiri, 2014), pois até uma quantidade mínima de glúten pode causar danos intestinais (Al-Bawardy et al., 2017). No sentido de possibilitar a isenção de glúten em produtos alimentares, o regulamento de execução (UE) n. ° 828/2014 Da Comissão, de 30 de Julho de 2014, estabelece normas sobre a informação prestada aos consumidores relativamente à ausência ou presença de glúten nos alimentos, com o

objetivo de permitir aos celíacos uma identificação segura, rápida e fácil de alimentos com glúten.

### 1.1.2. Glúten

O glúten é um componente vital no processo de panificação, pois determina as propriedades mecânicas da massa (capacidade de absorção de água, coesividade e viscoelasticidade da massa) e a qualidade final dos produtos (Li et al., 2021). É encontrado em diferentes frações no endosperma de diferentes cereais como o trigo, centeio, cevada e aveia. A fração proteica do glúten solúvel em álcool é denominada de prolamina e a insolúvel de glutenina (Resende et al., 2017).

Durante o processo de mistura e hidratação da farinha, as proteínas insolúveis, gliadinas e gluteninas, formam uma rede tridimensional viscoelástica denominada glúten (**Figura 1**) (Verbauwhede et al., 2020; Vitti, 2001). A gliadina é uma mistura heterogénea de proteínas de cadeia simples, que apresenta alta extensibilidade e baixa elasticidade, com capacidade limitada de voltar à forma inicial quando aplicada uma força sobre a massa (Monge-Morera et al., 2021). A glutenina, por outro lado, consiste em cadeias peptídicas ligadas por ligações dissulfeto, que apresenta baixa extensibilidade e alta elasticidade (estica até um certo limite, mas volta rapidamente à sua forma original) (Balakireva & Zamyatnin, 2016). Considera-se que a glutenina é o principal contribuinte para a elasticidade da massa, enquanto as gliadinas contribuem com o comportamento viscoso (Blomfeldt et al., 2011; Li et al., 2021).

A rede tridimensional formada pelo glúten retém os gases produzidos pelas leveduras durante a fermentação da massa, o que permite uma expansão suficiente e uma boa distribuição dos alvéolos de gás dentro da massa, resultando num produto volumoso e com boa textura (Balakireva & Zamyatnin, 2016; Galves, 2014).



**Figura 1:** Representação esquemática da formação do glúten (Tornisiello, 2019).

### *1.1.3. Ovo*

O ovo é um alimento que apresenta um ótimo valor nutricional, sendo considerado como um alimento proteico de fácil digestão e baixo valor calórico, podendo assim contribuir para as necessidades nutricionais diárias dos consumidores (Medeiros et al., 2014). É composto por aproximadamente 75,8% de água, 12,4% de proteínas, 9,8% de lípidos e baixas quantidades de hidratos de carbono. É também uma excelente fonte natural de vitaminas A, D, E e B2, assim como de microelementos como o fósforo, potássio, sódio, cálcio, magnésio e ferro (USDA, 2012). A composição nutricional dos ovos pode variar com a idade, estirpe, linhagem, tamanho, tipo de alimentação e estado sanitário das aves (Medeiros et al., 2014).

Além do seu alto valor nutricional, o ovo tem uma grande importância tecnológica em produtos de panificação devido à sua capacidade espumante, coagulante, emulsionante e gelificante, auxiliando no desenvolvimento da estrutura e textura dos produtos desenvolvidos, assim como na cor, aroma e sabor (Suas, 2012).

A clara e a gema de ovo apresentam mais de 20 proteínas e glicoproteínas com potencial alergénio, sendo a ovomucóide, ovoalbumina, ovotransferrina e lisozima as principais responsáveis pela alergenicidade do ovo (Onamine & Pinotti, 2020).

A alergia ao ovo é uma das alergias alimentares mais comuns na infância e adolescência, afetando 0,5% a 2,5% da população em todo o mundo (Österlund et al., 2019), tendo sido identificada, em crianças, com reações leves a moderadas como urticária, angioedema, dermatite atópica, asma, rinoconjuntivite, dor abdominal, náuseas, vômitos e diarreias e, em poucos casos, com reações anafiláticas (Lobo et al., 2021).

## **1.2.Panificação**

### *1.2.1. Padrão de identidade e qualidade do pão*

Segundo Marquito, (2014), o pão é um alimento com muitas variações, que depende grandemente do local onde é produzido e da forma e técnicas utilizadas na produção. No entanto, a sua constituição é básica, farinha de cereais, água, sal e fermento. Canella-Rawls (2021) descreve o pão como um alimento feito de uma pasta fermentada

de um cereal, normalmente trigo, produzida, desenvolvida e replicada rotineiramente por um padeiro. Ainda, Franco (2015) define pão como:

*“Produto obtido pela cocção, em condições tecnologicamente adequadas, de uma massa fermentada ou não, preparada com farinha de trigo e ou outras farinhas que contenham naturalmente proteínas formadoras de glúten ou adicionadas das mesmas e água, podendo conter outros ingredientes”.*

Legalmente, Segundo a Portaria nº 425/98 de 25 de julho:

*“O produto obtido da amassadura, fermentação e cozedura, em condições adequadas, das farinhas de trigo, centeio, triticale ou milho, estemes ou em mistura, de acordo com os tipos legalmente estabelecidos, água potável e fermento ou levedura, sendo ainda possível a utilização de sal e de outros ingredientes, incluindo aditivos, bem como auxiliares tecnológicos, nas condições legalmente fixadas”.*

Em termos gerais, os principais ingredientes do pão são a farinha, a água, o sal e o fermento, dos quais a farinha é o ingrediente fundamental para obtenção do pão (Pawlak, 2015). Para a elaboração de diferentes tipos de pães são ainda utilizados outros ingredientes, como aditivos e coadjuvantes tecnológicos.

### *1.2.2. Panificação livre de alergénios*

Na última década, notou-se um aumento na procura por alimentos isentos de alergénios alimentares, principalmente produtos sem glúten, devido ao aumento exponencial do número de pessoas com alergia e hipersensibilidade ao glúten (Vintilă, 2021). Juntamente com a procura de produtos isentos de glúten, os consumidores também procuram produtos *clean label*, os quais são produzidos com tecnologias que permitem a obtenção de pães sem glúten de alta qualidade, mas sem a necessidade de aditivos ou coadjuvantes tecnológicos para a sua confeção (Yeşil & Levent, 2022).

Infelizmente, a ausência de glúten na panificação tem um grande impacto nas propriedades tecnológicas dos pães, pois estes produtos geralmente estão associados a produtos de qualidade sensorial inferior, apresentando baixo volume específico, sabor menos agradável, maior consistência do miolo e maior taxa de envelhecimento (Carini et al., 2015). Com isto, a indústria alimentar procura estratégias que permitam a obtenção de um produto com maior qualidade nutricional e sensorial, mas também económica (Gao et al., 2018).

Existem já na literatura muitos trabalhos que focam precisamente a substituição do glúten, ovos, leite e derivados em produtos de panificação, sendo os produtos mais utilizados na substituição da farinha de trigo as farinhas de arroz, sorgo, trigo sarraceno,

teff, aveia, quinoa, amaranto e milho (Hu et al., 2022; Rizzello et al., 2016); proteínas de diferentes origens como albumina, ervilha e soja (Ziobro et al., 2013); amido de milho e fécula de batata e mandioca (Krupa-Kozak et al., 2013; Vintilă, 2021; Wronkowska et al., 2013); fibras (Föste et al., 2020); e hidrocolóides (Santos et al., 2019; Sciarini et al., 2010). Para a substituição do ovo pode-se utilizar mucilagem de leguminosas ricas em fibras (quinoa, linhaça e chia) (Fernandes & Mellado, 2018; Oliveira et al., 2020; Rothschild et al., 2015) e aquafaba (Silva et al., 2022).

### 1.2.3. *Goma xantana*

A goma xantana é um polissacarídeo de alto peso molecular, obtido a partir da biossíntese no processo de fermentação de açúcares por uma cultura pura da bactéria Gram-negativa *Xanthomonas campestris* (Patel et al., 2020). Foi descoberta no final da década de 1950 pelo norte-americano Allene Rosalind Jeanes (Bhat et al., 2022) e, devido aos seus efeitos não tóxicos na saúde humana, foi aprovada em 1969 pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em produtos alimentares, sem limite na quantidade de aplicação (Riaz et al., 2021).

A solução de goma xantana possui propriedades espessantes com comportamento pseudoplástico e é estável numa gama ampla de pH, altas concentrações de sal e temperaturas (Carmona et al., 2015). Na indústria alimentar, é frequentemente utilizada pela alta eficiência mesmo em baixas concentrações, tendo grande aplicabilidade em produtos alimentares assados pois auxilia na ligação à água, prolongando a vida útil e a estabilidade durante o armazenamento destes produtos (Riaz et al., 2021).

### 1.2.4. *Aquafaba*

Para a substituição do ovo em produtos de panificação, tendo em vista a obtenção de uma melhor emulsão e estabilidade da massa, pode-se utilizar mucilagem de sementes como quinoa (Rothschild et al., 2015), chia (Fernandes & Mellado, 2018) e linhaça (Oliveira et al., 2020). No entanto, atualmente, tem vindo a ser estudado o uso da água de cozedura (líquido viscoso) de grão de bico, ou mesmo de outras leguminosas, como fonte de substituição do ovo. Este líquido, denominado aquafaba de acordo com a origem latina da palavra água (*aqua*) e feijão (*faba*), é aplicado para o líquido do grão de bico comercial

enlatado e a água da cozedura, da forma mais tradicional, do mesmo (Mustafa et al., 2018). Além de auxiliar nas propriedades tecnológicas, a aquafaba é um subproduto da indústria alimentar com vários benefícios nutricionais, baixo poder alergénico e, sobretudo, de baixo custo de produção (Buhl et al., 2019).

A aquafaba exerce uma ampla gama de propriedades funcionais, incluindo a capacidade de ligação com a gordura, capacidade de retenção de água e solubilidade. Apresenta ainda propriedades gelificantes, espumantes e emulsionantes, que podem ser aplicadas na produção de novos produtos alimentares ou melhoria dos já existentes (Silva et al., 2022). Estas propriedades são determinadas pela composição da própria aquafaba que, em geral, possui mais de 20 compostos de elevado interesse, entre eles proteínas, hidratos de carbono solúveis/insolúveis em água, saponinas e compostos fenólicos que são libertados durante a imersão do grão de bico e durante a cozedura (Serventi, 2020).

### **1.3. Plantas Alimentares Não Convencionais (PANC)**

A maioria das plantas existentes a nível mundial pode ser encontrada nos países tropicais e estima-se que, aproximadamente, 25% das espécies se encontram originalmente no Brasil (Rodrigues, 2016). É neste país que se encontra uma das maiores reservas de biodiversidade de plantas do planeta, contando com um número estimado entre 15% a 20% do total mundial (Leal et al., 2018).

Foram reconhecidas 49979 espécies nativas, cultivadas e naturalizadas da flora brasileira (BFG, 2018) e estima-se que pelo menos 10% da flora nativa do país sejam plantas comestíveis (Kelen et al., 2015).

Mesmo com toda a abundância de plantas com potencial alimentar, mais de metade da necessidade energética a nível mundial é suprida por apenas quatro culturas: arroz, batata, trigo e milho. Existe assim uma lacuna gigantesca entre a biodiversidade e o número de plantas que são efetivamente usadas para consumo humano (Jacob, 2020).

As chamadas ervas daninhas e plantas consideradas como pragas e inços são espécies com grande importância económica e/ou ecológica, sendo que muitas delas podem ser mesmo consumidas, não sendo tóxicas, e apresentando um alto potencial nutritivo (Casemiro & Vendramini, 2020).

O termo PANC (*Plantas Alimentares Não Convencionais*) surgiu em 2007, cunhado pelo biólogo e professor Valdely Ferreira Kinupp, e refere-se a todas as frutas,

folhas, flores, raízes, tubérculos, caules, rizomas, sementes, assim como outras estruturas ou parte das plantas vindas de espécies exóticas ou nativas, cultivadas ou espontâneas, que possuem uma ou mais partes comestíveis (Kinupp, 2007).

As PANC apresentam um forte regionalismo, sendo o seu consumo grandemente influenciado pela cultura de cada região e clima (Zacharias et al., 2021). Estas plantas agrupam espécies que são utilizadas secularmente por comunidades tradicionais (indígenas, quilombolas, ribeirinhos, entre outras), exercendo uma grande influência na alimentação dessas populações (Abras, 2018) que, com o passar dos anos, foi perdendo conhecimento sobre estas plantas (Leal et al., 2018). Paralelamente, a população dos grandes centros urbanos tem vindo a consumir cada vez mais alimentos industrializados de preparação rápida, o que teve como maior consequência a perda de soberania alimentar e diversificação dos alimentos (Minello et al., 2021; Polesi et al., 2017).

Em julho de 2009, na 61ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, em Manaus, Amazonas, o professor Valdely Ferreira Kinupp do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), relatou:

*“Muito é dito nas instituições de pesquisa, na mídia em geral, nas agendas políticas e mesmo nas conversas corriqueiras sobre a megabiodiversidade brasileira, no entanto, pouco é feito com objetivos práticos de valorização e uso real dessa riqueza biológica.”* (REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 2009).

Recentes trabalhos científicos têm reportado os vários benefícios relacionados com o consumo de PANC, como a diversificação da nutrição na alimentação humana, na medicina, economia, mas também para a sustentabilidade e biodiversidade de culturas (Silva & Andrade, 2022). Neste sentido, o potencial efeito benéfico (potencial antioxidante e anti-inflamatória) para a saúde está associado aos diversos compostos bioativos encontrados nestas plantas, como as vitaminas, fenólicos, antocianinas, taninos e carotenoides (Benevides et al., 2020; Fernandez & Ruiz, 2021; Minello et al., 2021). A maioria destes compostos tem a capacidade de prevenir o stresse oxidativo, frequentemente associado ao envelhecimento precoce e ao surgimento de doenças como o cancro, osteoporose, diabetes, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (Maphosa & Jideani, 2017; Otero & Ferreira-Ribeiro, 2019).

Além de importantes para a saúde humana, são espécies promissoras na área da tecnologia de alimentos, para formulação de novos produtos, podendo contribuir pela colmatação da demanda no mercado por alimentos funcionais (Kinupp & Lorenzi, 2014; Polesi et al., 2017). Desta forma, a inserção de plantas em produtos processados é uma

alternativa para oferecer aos consumidores dietas mais saudáveis contendo fibras, vitaminas, minerais e compostos bioativos (Alves et al., 2021). Existem alguns estudos relacionados com a substituição total ou parcial de farinha de trigo por farinhas alternativas como farinha de ora-pro-nóbis (Alves et al., 2021), trigo sarraceno, aveia, quinoa, sorgo, teff (Rizzello et al., 2016), niger, milho e alpisti (Lima et al., 2021).

### 1.3.1. Sorgo

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) é um cereal pertencente à família Poaceae (**Figura 2**). É o quinto cereal mais importante do mundo, a seguir ao trigo, arroz, milho e cevada (Stutts & Vermerris, 2020). O sorgo é um género dividido em vinte e nove espécies e dois híbridos (Ratnavathi & Komala, 2016) Ratnavathi; Komala, 2016). A cultura do sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) destaca-se pela rusticidade e a alta tolerância ao défice hídrico, permitindo o seu cultivo em diferentes épocas e regiões com clima árido e semiárido (Tolentino et al., 2016).



**Figura 2:** Plantação de sorgo (Canal Rural, 2022).

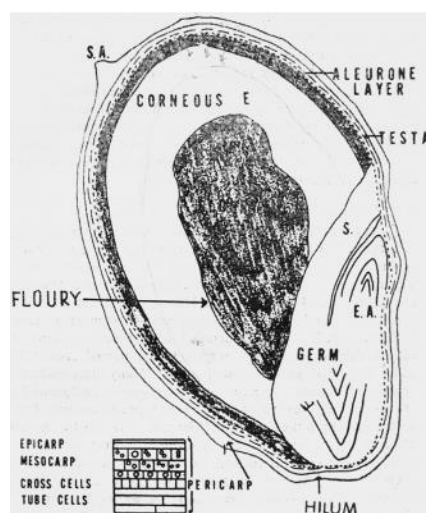
A produção mundial atual de grão de sorgo é de aproximadamente 59 milhões de toneladas, sendo liderada pelos Estados Unidos, seguidos pela China, Índia, México e Brasil. No entanto, mais de metade da produção global ocorre no continente africano, onde se originou, e na Ásia (Duodu & Awika, 2019).

A espécie *S. bicolor* tem uma grande importância mundial, sobretudo nos países de África e Ásia onde é considerado um dos principais alimentos básicos para milhões de pessoas, servindo mesmo como fonte primária de proteína (Weerasooriya et al., 2018). Enquanto em alguns países, como Estados Unidos, México, Argentina, Brasil e Austrália tem sido tradicionalmente utilizado para alimentação animal (Ratnavathi, 2019), na

Europa, esta cultura tem vindo a ser usada para a produção de biocombustíveis e ração animal (Abdelhalim et al., 2021).

### 1.3.1.1. Estrutura do Grão

Os grãos de sorgo são geralmente esféricos, apresentando diferentes tamanhos, com mais ou menos 4 mm de comprimento, 2 mm de largura e 2,5 mm de espessura, mas também com cores que variam entre preto, vermelho, roxo, castanho, amarelo e branco (Ratnavathi & Komala, 2016). O grão é composto por três componentes biológicos: pericarpo, endosperma e gérmen (**Figura 3**) (Crozier et al., 2022). A distribuição destes componentes varia entre os genótipos e o tipo de produção. O pericarpo, endosperma e gérmen representam em média 7%, 84% e 9% do peso do grão, respetivamente (Crozier et al., 2022).



**Figura 3:** Estrutura do sorgo: pericarpo, endosperma (camada de aleurona, córneo e farinhento) e gérmen (escutelo e eixo embrionário) (Ratnavathi & Komala, 2016).

O pericarpo é a camada mais externa do grão de sorgo, dividida em três camadas: pericarpo, mesocarpo e endocarpo. O epicarpo é constituído por duas ou três camadas de células retangulares, muitas vezes contendo material pigmentado. Ao contrário de outros cereais, o mesocarpo do sorgo pode conter grânulos de amido. O endocarpo é composto principalmente por células transversais e tubulares (Arendt & Zannini, 2013; Ratnavathi, 2019).

O endosperma, o principal tecido de armazenamento, é composto por uma única camada de células chamadas aleurona, endosperma vítreo e endosperma opaco. A

aleurona é rica em proteínas, enzimas, lípidos, vitaminas e minerais. O endosperma vítreo e o endosperma opaco diferem pela organização dos grânulos de amido e na distribuição da matriz proteica. O endosperma vítreo contém baixo teor de amido em forma poligonal cercados por uma matriz proteica contínua, enquanto o endosperma opaco é caracterizado por possuir maior presença de amido em forma de esferas, com uma matriz proteica descontínua (Arendt & Zannini, 2013; Ratnavathi, 2019).

O gérmen está fortemente unido ao grão de sorgo, tornado difícil a sua remoção no processo de moagem. Consiste em duas partes principais: o eixo embrionário e o escutelo. O escutelo contém elevadas quantidades de lípidos, proteínas, enzimas e sais minerais e serve como conexão entre o endosperma e o gérmen. O eixo embrionário é dividido em radícula e plúmula. Após a germinação, a radícula forma raízes primárias, enquanto a plúmula forma as folhas e os caules (Serna-Saldivar & Espinosa-Ramírez, 2019).

#### *1.3.1.2. Composição centesimal e química do sorgo*

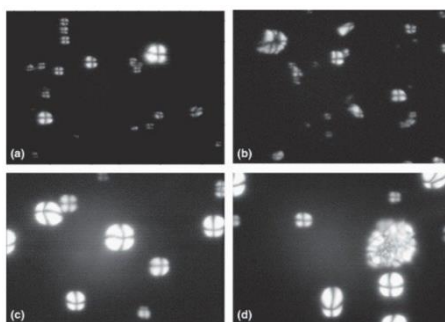
A composição nutricional do grão de sorgo é diretamente influenciada por fatores climáticos, ambientais e genéticos. Geralmente, o grão contém 55% a 77% de amido, 7% a 19% de proteína e 1% a 5% de gordura, 8,5% a 24% de fibras, 1% a 2,8% de cinzas e 9% a 11% de humidade (Queiroz et al., 2015).

#### *1.3.1.3. Hidratos de carbonos – importância do amido*

O sorgo contém também hidratos de carbono, sendo a maioria açúcares como a glicose e frutose, sacarose e maltose. Os valores de glicose e frutose podem variar de 0,6% a 1,18% e 0,3% a 0,7%, respetivamente (Arendt & Zannini, 2013). Mas a sua forma principal de armazenamento dos hidratos de carbono é sob a forma de amido, que varia de 55,6 a 77% dependendo do peso do grão (Mehboob et al., 2015).

Por sua vez, o amido é um polímero de elevado peso molecular, formado por moléculas de amilose e amilopectina, dispostas de modo radial, unidas por pontes de hidrogénio, com as cadeias reductoras terminais voltadas para dentro, em direção ao centro do grânulo, local que se acredita ser a origem de crescimento do denominado hilum (Azevedo et al., 2018; Galves, 2014). A amilose é essencialmente uma cadeia linear de

unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídeas  $\alpha$ -1,4. Pode conter 350 a 1000 unidades de glicose na sua estrutura, ligadas por pontes de hidrogénio, formando assim uma estrutura helicoidal em que cada volta é formada por seis unidades de glicose. Essa estrutura é ainda capaz de incluir outras moléculas, como ácidos gordos, iodo e hidrocarbonetos, formando assim os compostos de inclusão (Damodaran & Parkin, 2019; Ribeiro & Seravalli, 2007).



**Figura 4:** Cruz de malta característica de grão de amido antes da gelatinização (Çatal & İbanoğlu, 2012).

A amilopectina é um polímero altamente ramificado, contendo cerca de 6000 a 100000 subunidades de glucose, unidas em ligações glicosídeas  $\alpha$ -1, 4 e  $\alpha$ - 1, 6, sendo a última responsável pelas ramificações (Damodaran & Parkin, 2019). A amilopectina sozinha é suficiente para formar o grânulo, como ocorre em espécies de sorgo modificadas que são desprovidas de amilose (Silva, 2016).

Os grãos de amido são insolúveis em água fria, mas podem absorver até 50% do seu peso seco em água, e desse modo, eles aumentam de tamanho apenas até um ponto sem danificar a estrutura (Damodaran & Parkin, 2019). Quando o amido é aquecido, em excesso de água, ocorre a expansão e hidratação dos grânulos, denominada de gelatinização que é um processo irreversível (Oliveira, 2011; Xu et al., 2020). O amido de sorgo gelatiniza numa faixa de temperaturas que varia entre os 68 e 91 °C (Serna-Saldivar & Espinosa-Ramírez, 2019), e a amilopectina contribui para a absorção de água, inchaço, e gelatinização dos grãos, enquanto a amilose e lípidos tendem a retardar esses processos (Silva, 2016). A perda da cristalinidade do grão de amido durante a gelatinização pode ser visualizada através da perda da cruz de malta (**Figura 4**), que é acompanhada pela liquefação dos cristalitos, absorção de água, inchaço dos grãos e solubilização progressiva do amido (Çatal & İbanoğlu, 2012).

Após o arrefecimento, o amido gelatinizado pode sofrer um fenómeno denominado de retrogradação, no qual as moléculas de amido se reassociam parcialmente, formando um precipitado ou um gel que, dependendo da extensão da associação da zona de formação, vai ter uma firmeza diferente (Silva, 2016). Em função de sua estrutura linear, as moléculas de amilose aproximam-se mais facilmente e são as principais responsáveis pela retrogradação, enquanto na amilopectina parece só ocorrer na periferia da molécula (Spier et al., 2013). Outros fatores podem influenciar a retrogradação do amido, tais como a fonte botânica do amido, a relação amido-água, a temperatura e o tempo de armazenamento, o pH, as condições de aquecimento e arrefecimento e a presença de constituintes não amiláceos (açúcares, lipídios, hidrocolóides e sais) (Silva, 2019).

#### *1.3.1.4. Proteína*

O teor de proteínas do grão de sorgo varia entre 7% a 19%, sendo distribuídas no endosperma, gérmen e pericarpo (80%, 16% e 3%, respectivamente) (Arendt & Zannini, 2013). As proteínas do grão são principalmente a albumina (10% a 30%), a globulina (10% a 30%) e as prolaminas (50% a 70%) (Majid et al., 2022). As karfirinas do grão de sorgo têm um alto nível de polimeria e pontes de dissulfeto, e apresentam uma forte interação com taninos e amido que as torna resistentes à digestão enzimática pelo trato digestivo (Mohamed et al., 2022). As proteínas são a principal fonte de aminoácidos, sendo um fator importante para a qualidade nutricional do grão. Os principais aminoácidos encontrados no grão de sorgo são não essenciais como a histidina, leucina, fenilalanina, tirosina, treonina, triptofano e valina (Espitia-Hernández et al., 2022). Os aminoácidos essenciais também podem ser encontrados em menor quantidade como a metionina, lisina e isoleucina (Mohapatra et al., 2019).

O grão de sorgo apresenta baixo poder alergénio pois, ao contrário do grão de trigo, não apresenta as proteínas gliadina e glutenina, responsáveis pela alergia ao glúten (Arendt & Zannini, 2013). Assim, a farinha de sorgo tem vindo a ser estudada como uma alternativa para a substituição da farinha de trigo em produtos panificados livres de alergénios alimentares (Vargas-Solórzano et al., 2014).

#### *1.3.1.5. Lípidos, fibras, minerais e vitaminas*

O conteúdo lipídico do grão de sorgo pode variar entre 1,0 g a 5,0 g por 100 g de peso seco do grão, sendo esse valor diretamente influenciado pelo cultivar e fatores climáticos (Arendt & Zannini, 2013) e estando no gérmen do sorgo 80% dessa fração. A composição dos ácidos gordos consiste majoritariamente em ácido linoleico, oleico e palmítico (Serna-Saldivar & Espinosa-Ramírez, 2019).

O conteúdo de fibras no grão de sorgo pode variar de 8,5% a 24%, estando localizadas principalmente nas paredes celulares do pericarpo e do endosperma, e são constituídas principalmente por celulose, hemicelulose, lignina e pectina, sendo 86,2% destas consideradas fibras insolúveis (Arendt & Zannini, 2013).

O sorgo é também uma grande fonte de minerais, fósforo e cálcio, apresentando em quantidades menores o cobre, ferro e zinco, magnésio, potássio e sódio (Ratnavathi, 2019). As vitaminas do complexo B, tiamina, niacina e riboflavinas, estão também em quantidades significativas no sorgo, podendo ainda conter quantidades vestigiais de vitaminas A, D, E e K (Aruna & Visarada, 2019).

#### *1.3.1.6. Compostos bioativos*

Por fim, os compostos fenólicos são metabolitos secundários de plantas que possuem pelo menos um anel aromático e um ou mais grupos hidroxila na sua estrutura (Espitia-Hernández et al., 2022), que podem ser divididos em ácidos fenólicos (hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos), flavonóides, cumarinas, xantonas, chalconas, estilbenos, ligninas e lignanas (Leyva-López et al., 2020).

O grão de sorgo tem sido identificado como potencial fonte de compostos fenólicos (Kang et al., 2016), destacando-se o seu uso como alimento para a prevenção e modulação de doenças crônicas, como doença cardíaca coronária e diabetes tipo 2, relacionado com o seu teor em fibra alimentar, lípidos, compostos fenólicos, taninos e flavonóides como antocianinas, flavonas e flavanonas (Wu et al., 2017).

Os ácidos fenólicos estão presentes principalmente no endosperma e no pericarpo do grão de sorgo (Mohamed et al., 2022). São classificados como derivados dos ácidos benzoico e cinâmico. Os principais ácidos fenólicos relatados foram os ácidos ferúlico, *p*-cumárico, cafeico, sinápico, gálico e protocatecuico (Xiong et al., 2021). O grão de

sorgo também contém flavonóides e pigmentos naturais responsáveis pelo bom funcionamento do sistema enzimático nas células vegetais (Przybylska-Balcerek et al., 2019). Os flavonóides do sorgo consistem principalmente em desoxiantocianidinas, embora também seja possível encontrar quantidades significativas de flavonóis (quercetina e kaempferol), flavanonas (naringenina) e flavonas (apigenina e luteolina) (Salazar-López et al., 2018).

Os taninos, também conhecidos como taninos condensados ou proantocianidinas (PAs), são oligómeros e polímeros de flavan-3-óis (Salazar-López et al., 2018). Estão associados a efeitos benéficos para a saúde, incluindo propriedades imunomoduladoras e anticancerígenas, funções antioxidantes e de eliminação de radicais e efeitos anti-inflamatórios (Palacios et al., 2021; Wu et al., 2012). No entanto, os taninos podem ligar-se às proteínas, hidratos de carbono e minerais, resultando na redução da digestibilidade dos alimentos. Também conferem um sabor amargo e adstringente que pode afetar a palatabilidade (Paiva et al., 2022).

### *1.3.2. Germinação*

A germinação é um processo bioquímico complexo, eficaz e barato, com finalidade de melhorar a qualidade dos grãos (Zhang et al., 2015). Ocorre nos grãos em condições adequadas de temperatura, luz e humidade, ativando inúmeras enzimas que iniciam o processo de germinação (Liu et al., 2022). A combinação de tempo e temperatura é um parâmetro importantíssimo para o processo, afetando diretamente a atividade enzimática e, como consequência, afeta a composição nutricional e tecnológica da farinha obtida (Marchini et al., 2021; Singh et al., 2017).

Inúmeras enzimas podem ser produzidas ou ativadas durante o processo de germinação, incluindo proteases, amilases,  $\beta$ -glucanases e fitases, resultando principalmente na degradação do amido, que nesse caso é utilizado como reserva energética para o processo germinativo, gerando um aumento nos açúcares redutores, fibras solúveis e aminoácidos livres, oligopeptídeos, mono e oligossacarídeos (Ocheme et al., 2015).

O sorgo germinado pode apresentar níveis mais altos de proteases e nitrogênio e de aminoácidos livres, além do aumento de albumina e globulina, podendo diminuir os fatores antinutricionais como inibidores de fitatos, taninos e inibidores enzimáticos, mas

também o teor dos ácidos gordos saturados totais e triglicerídeos (Rashwan et al., 2021). O amido sofre hidrólise, aumentando o teor de açúcares e, por isso, melhora a digestibilidade do amido e da proteína (Marchini et al., 2021).

Além disso, a germinação também pode aumentar os teores de compostos fenólicos e favorecer a liberação de péptidos bioativos que exercem uma ampla gama de funções biológicas, atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana (Zhang et al., 2015).

Com o aumento do tempo de germinação, podem ocorrer modificações nas propriedades termofísicas do amido, resultado num maior grau de gelatinização, uma maior temperatura de gelatinização e baixa viscosidade. Também pode causar a desnaturação proteica e a diminuição da tensão superficial das moléculas, resultando no aumento das propriedades espumantes, emulsionantes e gelificantes da farinha (Saithalavi et al., 2021; Singh et al., 2017).

O processo germinativo resulta sobretudo em mudanças fisiológicas do grão, tornando-o, assim, tecnologicamente importante para o processamento de alimentos. Sendo assim, é de grande importância o estudo das propriedades funcionais da farinha de sorgo germinado e a sua aplicação em produtos alimentares (Liu et al., 2022; Ocheme et al., 2015).

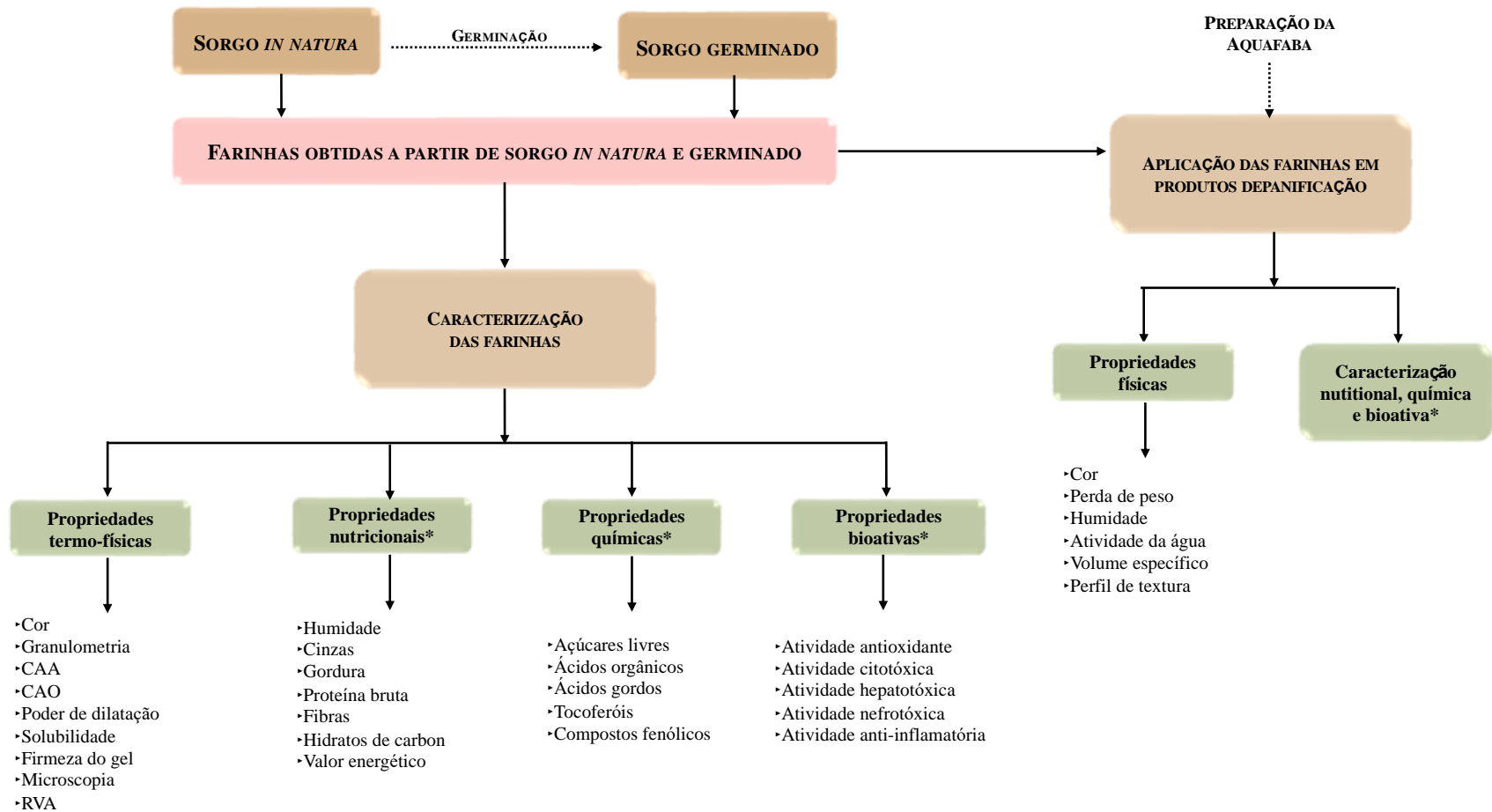
## 1.4. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo principal o estudo da farinha de grãos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) germinados e *in natura*, para posterior desenvolvimento de um produto de panificação livre dos principais alergénios alimentares, com o estudo complementar dos vários aspetos tecnológicos das farinhas obtidas e dos produtos finais.

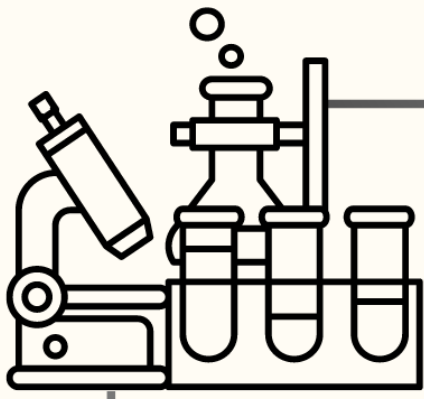
Os objetivos específicos estão descritos abaixo, com as metodologias implementadas, e o plano de trabalho encontra-se esquematizado na **Figura 5**:

- Avaliar a influência da germinação no gel de farinha de sorgo e nas propriedades termofísicas da farinha;
- Avaliação nutricional das farinhas de sorgo germinado e *in natura* por métodos AOAC, nomeadamente, humidade, cinzas, gordura total, proteína bruta, fibras dietéticas totais, hidratos de carbono e valor energético;
- Determinação da composição química em:
  - Açúcares por HPLC acoplada a um detetor Índice de Refração (RI, *Refraction Index*);
  - Ácidos orgânicos por UFLC acoplado a um detetor de díodos (DAD, *Diode Array Detector*);
  - Ácidos gordos por cromatografia gasosa (GC, *Gas Chromatography*, acoplada a um detetor FID);
  - Vitamina E (tocoferóis) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*, acoplado a um detetor de fluorescência);
  - Compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Espectrómetro de massa de Ionização por *Electrospray* (HPLC-DAD/ESI-MSn) após preparação de extratos hidroetanólicos (80:20 v/v) a partir da farinha de sorgo *in natura* e germinado.
- Avaliação *in vitro* das propriedades bioativas de extratos hidroetanólicos obtidos a partir da farinha em estudo:
  - Atividade antioxidante: inibição da peroxidação lipídica através do ensaio das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA);
  - Atividade antitumoral:

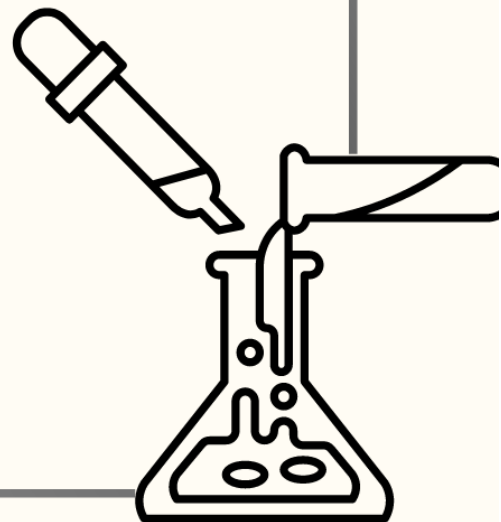
- Citotoxicidade: utilizando quatro linhas celulares tumorais, nomeadamente MCF-7 (carcinoma da mama), AGS (adenocarcinoma gástrico), NCI-H460 (carcinoma de pulmão) e CaCo (adenocarcinoma colorretal);
- Hepatotoxicidade/nefrotoxicidade: avaliado utilizando uma cultura primária obtida a partir de células normais de fígado de porco (PLP2) e de rim de macaco (VERO);
- Atividade anti-inflamatória: avaliado utilizando a linha celular de macrófagos de rato (RAW 264.7).
- Desenvolvimento de produtos de panificação à base de farinhas de sorgo germinado e *in natura*. Desenvolvimento de um controlo positivo com uma mistura de farinhas isentas de glúten (farinha de arroz, fécula de batata e polvilho doce) e de um controlo negativo com 100% de farinha de trigo.
  - Preparação de aquafaba para o desenvolvimento dos produtos de panificação;
  - Avaliação das propriedades físicas e organolépticas, nomeadamente textura, atividade da água (Aw), cor, perda de peso após cozedura e volume específico;
  - Avaliação das propriedades nutricionais, químicas, e bioativas dos produtos obtidos, em comparação com os controlos sem glúten e 100% farinha de trigo, utilizando as mesmas metodologias analíticas usadas para as farinhas.



**Figura 5:** Representação esquemática do plano de trabalhos desenvolvidos (Autoria própria, 2023).



# Capítulo 2



## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Padrões e reagentes

A mistura padrão de referência de éster metílico de ácidos gordos (FAME) 37 (padrão 47885-U) foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), bem como os isómeros dos ácidos gordos individuais, açúcares (D(+)-sacarose e D(+)-melezitose) e padrões de ácidos orgânicos (ácido oxálico, ácido chiquímico, ácido fumárico, e ácido quínico). Para análise de tocoferóis, o tocol racémico (50 mg/ml) foi adquirido na Matreya (Chalfont, PA, EUA). Os solventes *n*-hexano (95%) e acetato de etilo (99,8%) de grau HPLC foram adquiridos na Lab-Scan (Lisboa, Portugal). Para análise de compostos fenólicos, o acetonitrilo (99,99%, grau HPLC) e o ácido fórmico foram adquiridos na Fisher Scientific (Lisboa, Portugal) e Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), respectivamente. Os padrões de compostos fenólicos (ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido protocatecuico, apigenina-6-*C*-glucósido, (-)-catequina, naringenin e quercetina-3-*O*-glucósido) na Extrasynthèse (Genay, França).

No ensaio de inibição da hemólise oxidativa o reagente dicloro-hidrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) foi adquirido na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Para os ensaios de citotoxicidade, hepatotoxicidade e anti-inflamatório, foram utilizados soro fetal de bovino (FBS), solução salina balanceada de Hank (HBSS), tripsina, solução de penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100 µg/mL), RPMI-1640 (meio Instituto Memorial Parque Roswell) e meio DMEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco) adquiridos na Hyclone (Chicago, Illinois, EUA). O ácido acético, elipticina, sulforodamina B (SRB), dexametasona, lipopolissacarídeo (LPS), Azul de Trypan e Trisaminometano (Tris) foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As células RAW 264.7 foram compradas à ECACC (Colecção Europeia de Cultura Celular Animal, DMSMZ – Leibniz – Institut DSMZ – *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*) e o Kit de Reagentes Griess foi adquirido da Promega (Madison, Wisconsin, EUA). No ensaio de atividade antimicrobiana foi usado o cloreto de *p*-iodonitrotetrazóico (INT), adquirido na Panreac Applichem (Barcelona, Espanha), o caldo triptona de soja (TSB) e o Caldo Mueller Hinton (MHB) na Biolab® (São Paulo, Brasil). Para os ensaios de atividade antidiabética e anti-tirosinase, a  $\alpha$ -

glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* e tirosinase de origem fúngica foram obtidas na Sigma life Science (St. Louis, MO, EUA).

Os ingredientes utilizados para a confeção dos produtos de panificação foram adquiridas em superfícies comerciais dedicadas à venda de retalho na cidade de Bragança, Portugal. A água destilada utilizada foi tratada num sistema de purificação MilliQ (Millipore, model A10, Billerica, MA, USA).

## **2.2. Amostras de Sorgo e preparação das farinhas**

Os grãos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) foram disponibilizados pela empresa NHD-Foods (Uberaba, Minas Gerais, Brasil). Foi-lhes higienizado, removido toda a sujidade (partículas sólidas de grande tamanho) e separadas as sementes defeituosas. Posteriormente, os grãos foram fracionados e armazenados em lugar seco, ao abrigo do sol até à sua utilização.

Neste trabalho foram estudados dois tipos de farinha de sorgo: farinha de sorgo *in natura* (sem nenhum processo germinativo) e farinha de sorgo germinado. O processo de germinação dos grãos de sorgo seguiu as especificações descritas por Contreras-Jiménez et al., (2019) e Ocheme et al., (2015), com ligeiras modificações. Após a higienização, os grãos foram encaminhados à incubadora (incubadora tipo B.O.D, CE-300/350-FAU, CIENLAB) 1 kg de grãos de sorgo imersos em 2,5 litros água destilada durante 24 h a 21 °C, efetuando-se a troca de água a cada 12 h (**Figura 6A**). Após a incubação, a água foi drenada e os grãos de sorgo foram dispersos sobre sacos de algodão e colocados novamente na incubadora a 30 °C durante 24 h (**Figura 6B**). Após a germinação, os grãos foram secos numa estufa (Modelo CE-205/100, CIENLAB, São Paulo, Brasil) a 40 °C por 12 h.

Os grãos de sorgo *in natura* e germinados foram triturados moídos num moinho (SOLAB, SL31, São Paulo, Brasil) equipado com uma peneira de 0,5 mm. As farinhas obtidas de ambas as amostras foram embaladas em sacos de polipropileno, codificadas e armazenadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz para posterior análise.



**Figura 6:** A: Grãos de sorgo germinado e B: Hidratação dos grãos de sorgo (Autoria própria, 2023).

### 2.3. Estudos das propriedades termofísicas das farinhas obtidas de sorgo *in natura* e germinado

#### 2.3.1 Granulometria da farinha

Para a determinação da granulometria da farinha de sorgo *in natura* e germinado foi utilizado o método oficial n° 66-20 da AACC (*American Association of Cereal Chemists/Associação Americana de Químicos de Cereais*) (AACC, 2000), no qual usando um agitador de peneiras (Bertel Indústria Metalúrgica Ltda. Caieiras, São Paulo, Brasil), foram peneirados, aproximadamente, 100 g de cada farinha com agitação durante 15 min, acoplado um conjunto de peneiras com 20, 30, 50, 60 e 100 “Mesh Tyler” (abertura 850, 600, 300, 250 e 150  $\mu\text{m}$ , respectivamente) e a base. A quantidade de farinha retida em cada peneira e base foi pesada e expressa em percentagem (%) conforme a **Equação (1)**.

**Equação 1:** Percentagem (%) de farinha retida em cada peneira e base.

$$\text{Farinha retida (\%)} = \left( \frac{\text{farinha retida (g)}}{\text{total de farinha (g)}} \right) * 100$$

#### 2.3.2. Firmeza do gel

Para a determinação da firmeza dos géis formados pela farinha, num banho termostático (Julabo, SW22; Seelbach, Germany) a 90 °C foram homogeneizadas as farinhas com água destilada a uma concentração de 50% (*m/v*), durante 5 min, até à formação da estrutura em gel. Posteriormente, 40 mL de cada amostra foram colocados

em recipientes de acrílico com tampa, previamente identificados, e armazenados com refrigeração à 15 °C até posterior análise.

A firmeza dos géis foi determinada 24, 48 e 72 h após a elaboração, através de um texturómetro (modelo TA HD plus, Stable Micro System, Godalming, Reino Unido), utilizando o programa Exponent Lite 2016, versão 6.1.16 lite. A compressão dos géis foi feita a uma velocidade de 2 mm/s e uma distância de 15 mm com uma sonda cilíndrica de 1,0 pol, e uma célula de carga de 5 kg. A partir da curva de penetração foram obtidos os parâmetros de força ou firmeza do gel, expresso em  $\text{g}/\text{cm}^2$ . A força é definida como a força máxima observada durante o ciclo de penetração inicial da sonda no gel.



**Figura 7:** **A:** Gel de farinha de sorgo *in natura*; **B:** Gel de farinha de sorgo germinado (Autoria própria, 2023).

### 2.3.3. Poder de dilatação e solubilidade

A determinação do Poder de dilatação e solubilidade da farinha de sorgo germinado e *in natura* foi realizado conforme o descrito por Spier et al. (2013). 1 g de farinha de sorgo *in natura* e germinado foram colocados em tubos Falcon de 50 mL previamente pesados, com 50 mL de água destilada, aquecidos num banho termostático (Julabo, SW22; Seelbach, Germany) até atingir a temperatura de 90 °C. Após 10 min de aquecimento, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm durante 15 min (modelo CT 5000-R, Cientec, São Paulo, Brasil). Num papel de filtro previamente identificado, seco e pesado foi recolhido o sobrenadante, posteriormente seco em estufa (Modelo CE-205/100, CIENLAB, São Paulo, Brasil) a 105 °C até atingir peso constante para quantificação da fração solúvel. Por fim, pesou-se o tubo com o resíduo e os papéis de filtro com os resíduos numa balança analítica (modelo AW220, Marte, São Paulo, Brasil). A amostra intumescida no tubo determinou o poder de dilatação. Calculou-se a solubilidade através da relação de massa solúvel e massa inicial, expressa em

percentagem (%). Enquanto o poder de dilatação, expresso pela relação da massa final intumescida (g) por massa inicial da amostra (g).

#### 2.3.4. *Capacidade de Absorção de Água (CAA) e Capacidade de Absorção de Óleo (CAO)*

A CAA e CAO foram determinada de acordo com a metodologia descrita por Beuchat (1977)/Köhn et al. (2015), e Lin et al. (1974), respetivamente, com modificações. 1,50 g de farinha de sorgo *in natura* e germinado foram adicionados a tubos Falcon de 50 mL, com 7,5 mL de água destilada ou 7,5 de óleo alimentar (Fula®, Algés, Portugal), para determinação de CAA e CAO, respetivamente. Em seguida, foi realizada a agitação das amostras em vórtex (LBX V05 series, LBX Instruments, LABBOX LABWARE S.L., Barcelona, Spain) durante 1 min, seguido por um repouso de 30 min, precedido por uma centrifugação a 25°C a 5000 rpm, durante 30 min (Centrífuga refrigerada K24OR, Centurion, Sussex Ocidental, Reino Unido). O sobrenadante foi decantado cuidadosamente durante 20 min e descartado. Por fim, pesou-se o tubo com o resíduo numa balança analítica (KERN, ALS 160-4A Série, Alemanha). Os resultados de CAA foram expressos pela relação da massa de água absorvida (g) por massa inicial da amostra (g). Por fim, os resultados de CAO foram expressos pela média  $\pm$  desvio padrão pela relação da massa de óleo absorvida (g) por massa inicial da amostra (g).

#### 2.3.5. *Perfil de viscosidade (RVA, Rapid Viscosity Analyser)*

O perfil de viscosidade aparente das amostras foi determinado usando um instrumento visco-analisador rápido (RVA série 4500, Perten Instruments, EUA) conforme descrito por Curti et al. (2022). Para a realização do ensaio, 3,5 g de cada amostra (14% base de humidade)<sup>1</sup> foram suspensos em 25 g de água destilada, formando uma pasta de água) e colocados nas latas de alumínio do próprio equipamento.

Para obter os parâmetros da pasta utilizou-se o software Thermocline (V 3.15, Perten Instruments, Austrália). Os parâmetros de colagem de pastas de água incluíram temperatura de colagem (PT, temperatura no momento do aumento da viscosidade) dado

---

<sup>1</sup> A correção da humidade das amostras para 14% com água destilada foi realizada com base na humidade inicial das amostras, determinada conforme secção 2.4.1.1. e adicionado água destilada.

em °C e pico de viscosidade (PV, viscosidade máxima da pasta quente), viscosidade final (FV, viscosidade no final do ensaio), decomposição (BD) e recuo (SB) dados em cp.

#### *2.3.6. Microscopia dos grânulos de amido*

A microestrutura dos grânulos de amido da farinha de sorgo *in natura* e germinado foi determinada seguindo a metodologia descrita por Guerra-Oliveira et al. (2022). Foi utilizado um microscópio DM750 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) com aumento de 20x combinado com o software LAS-EZ (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) para a captura das imagens.

### **2.4. Estudo da composição nutricional, perfil químico e propriedades bioativas das farinhas de sorgo *in natura* e germinado**

#### *2.4.1. Composição nutricional*

Para avaliação da composição nutricional nas amostras liofilizadas de farinhas de sorgo *in natura* e germinado, avaliou-se a percentagem de humidade e composição em cinzas, gordura total, proteína bruta, fibras dietéticas totais, hidratos de carbono e valor energético.

##### *2.4.1.1. Humidade*

A determinação de humidade foi realizada seguindo o método oficial de análise nº 925.45b (AOAC, 1999). Numa balança de humidade eletrónica (ADAM, PMB 163, Oxford, EUA) pesou-se aproximadamente 2 g de amostra de farinha, até remoção completa da humidade por radiação infravermelha. O cálculo da percentagem de humidade foi obtido pela diferença de massa inicial e final da amostra e os valores foram expressos em g/100g de peso seco (ps).

#### *2.4.1.2. Cinzas*

Para a obtenção do teor em cinzas, realizou-se o protocolo descrito no método oficial de análise n° 935.42 (AOAC, 1999). Foi colocada 1 g de amostra de farinhas em cadinhos de porcelana, previamente calcinados, pesados e identificados. As amostras foram então colocadas numa mufla (IVYMEN, N-8L, Barcelona, Espanha) a 550 °C durante 6 horas até obtenção de cinzas brancas (calcinação completa). Os cadinhos com as amostras calcinadas foram colocados num exsiccador até atingirem arrefecimento à temperatura ambiente (~25°C), e posteriormente pesados até obtenção de peso constante. O cálculo da percentagem de cinzas foi obtido pela diferença de massa inicial e final da amostra e os valores foram expressos em g/100g de peso seco (ps).

#### *2.4.1.3. Gordura total*

A determinação do teor de gordura total foi realizada segundo o descrito no método oficial de análise n° 989.05 (AOAC, 1999). Inicialmente, pesaram-se, aproximadamente, 3 g de amostra de farinha para um cartucho de papel colocado num equipamento extrator de gorduras do tipo Soxhlet (modelo), usando éter de petróleo para a extração, a uma temperatura de aproximadamente 120 °C, com um ciclo de 6 horas. Os resultados foram expressos em g/100g ps e calcularam-se por diferença gravimétrica da massa inicial e a massa de gordura.

#### *2.4.1.4. Proteína bruta*

O teor em proteína bruta foi obtido pelo método de macro-Kjeldahl protocolado pelo método oficial de análise n° 991.02 (AOAC, 1999), usando um fator de conversão de 6,5 para converter o teor de azoto (N) em proteínas totais, como indicado por Xu et al. (2019). Para o processo de digestão foram pesados aproximadamente 0,25 g de amostra para um tubo de Kjeldahl, onde, posteriormente, foram adicionadas duas pastilhas catalisadoras (Kjeltabs) e 15 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado. De seguida, colocaram-se os tubos num bloco digestor a uma temperatura de 420 °C durante 70 min. Após a digestão completa e arrefecimento das amostras, adicionou-se 25 mL de água destilada. Usando o analisador de Kjeldahl (Velp Scientifica UDK 152), é adicionado

NaOH, aos tubos com a amostras digerida, por volumetria de retrocesso, que irá libertar o azoto sob forma de NH<sub>3</sub>, posteriormente coletado por destilação a vapor numa solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N. Finalmente, é feita uma titulação com NaOH 0,1N, usando vermelho de metilo como indicador para calcular a quantidade de azoto, utilizando como fator de correção *N* (quantidade de azoto) x 6,25, **Equação (2)**, e os resultados expressos em g/100 g peso seco.

**Equação 2:** Cálculo do teor de proteína bruta (g/100g ps).

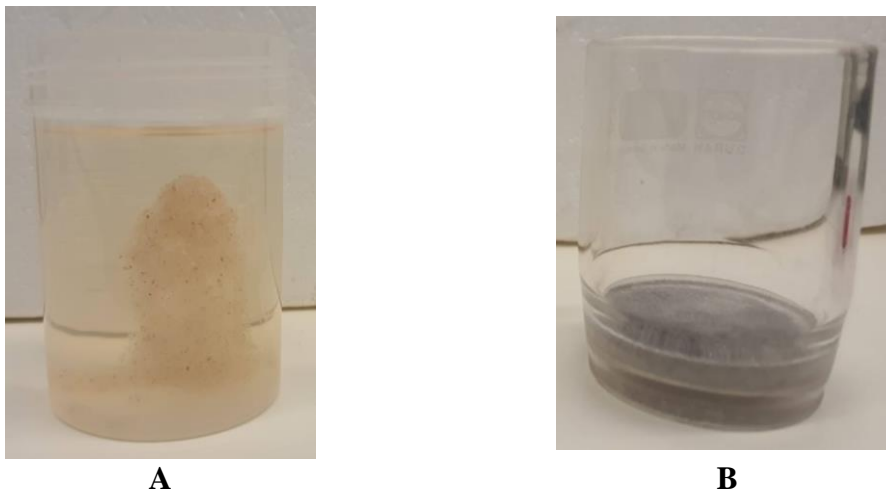
$$\text{Proteína (g/100g ps)} = \% \text{ de azoto (N)} \times \text{Fator de conversão}$$

#### 2.4.1.5. Fibras dietéticas totais

O teor em fibras dietéticas totais (solúveis e insolúveis) foi determinado pelos métodos oficiais de análise n° 991.43 e 992.16 (AOAC, 1999). Em tubos Falcon 50 mL, previamente envolvidos em papel de alumínio, foram pesados 250 mg de amostra e adicionados 12,5 mL de tampão fosfato 0,08 M a pH 6,0 e adicionado 10 µL de solução α-amilase de *Bacillus licheniformis*. Os tubos foram então colocados num banho termostaticado (Julabo, SW22; Seelbach, Germany) a 95 °C, com agitação em intervalos de 5 min. Após 15 min de aquecimento foram retirados e arrefecidos até atingirem a temperatura ambiente (~25°C). Em seguida o pH da solução foi ajustado para 7,5 ± 0,2 pH pela adição de solução de hidróxido de sódio 0,275 N, à qual, imediatamente após o ajuste, foram adicionados 25 µL de prótase de *Bacillus licheniformis*, e colocada novamente num banho termostaticado a 60 °C. Após 30 min de aquecimento, a solução foi arrefecida à temperatura ambiente, à qual se adicionou ácido clorídrico 0,325 M, gota a gota, de modo a ajustar o pH até 4,0 ± 0,6 e mais. Finalmente, foram adicionados 10 µL de amiloglicosidase de *Aspergillus niger*, e colocadas num banho termostaticado a 60 °C durante 30 min. Após arrefecimento foram adicionados quatro volumes de solução 95:5 (v/v) de etanol:água, e deixado em temperatura ambiente por aproximadamente 12 h para a completa precipitação da solução das fibras insolúveis (**Figura 9A**).

Em cadinhos de filtração previamente calcinados, pesados e identificados (**Figura 9B**), aplicou-se sucção com uma bomba de vácuo para total remoção de resíduos (quatro cadinhos foram usados). Em seguida, procedeu-se à filtração da solução etanol:água, transferindo-se quantitativamente o precipitado da solução enzimática para o cadinho. De seguida, procedeu-se a três lavagens sucessivas do resíduo com 20 mL de solução 78:12

(v/v) etanol:água, duas vezes com 10 mL de solução 95:5 (v/v) etanol:água e duas vezes com 10 mL de acetona (100%, secagem total do resíduo). Em seguida, os cadinhos de filtração foram secos numa estufa (Jouan, Berlin, Germany) a 105 °C para total remoção da humidade.



**Figura 8:** **A:** Precipitação da solução das fibras insolúveis; **B:** Cadinhos de filtração (Autoria própria, 2023).

As amostras secas foram pesadas, e dos quatro cadinhos utilizados, o resíduo de dois deles foram encaminhados para determinação de cinzas e os outros deles para determinação de proteína bruta (métodos descritos acima). O teor de fibras dietéticas totais foi determinado seguindo a **Equação (3)** e os valores expressos em g/100g ps.

**Equação 3:** Teor de fibras dietéticas totais (g/100g ps).

$$\text{Fibras (g/100g ps)} = \left( \frac{\text{massa do residuo} - \text{massa de proteina} - \text{massa de cinzas}}{\text{massa da amostra}} \right) \times 100$$

#### 2.4.1.6. Hidratos de carbono

O teor de hidratos de carbono totais foi estimado por diferença e expresso em g/100g ps de acordo com **Equação (4)**.

**Equação 4:** Cálculo do teor de hidratos de carbono (g/100g ps).

$$\text{H. carbono} \left( \frac{\text{g}}{100\text{g}} \text{ps} \right) = 100 - (\text{Humidade} + \text{Cinzas} + \text{Fibras} + \text{Gordura} + \text{Proteínas})$$

#### 2.4.1.7. Valor energético

O valor energético foi calculado segundo o descrito pelo Regulamento (UE) n° 1169 (2011), e expresso em kcal por 100 g de peso seco de acordo com a **Equação (5)**.

**Equação 5:** Cálculo do valor energético (kcal/100g ps).

$$\text{Energia} \left( \frac{\text{kcal}}{100 \text{ g ps}} \right) = 4 \times (\text{g Proteína} + \text{g Hidratos de carbono}) + 2 \times (\text{g de Fibras dietéticas totais}) + 9 \times (\text{g Gordura})$$

#### 2.4.2. Caracterização fitoquímica

A par da avaliação nutricional realizada às farinhas desenvolvidas com sorgo in natura e germinado, foi também realizado uma caracterização química, nomeadamente avaliação dos teores de açúcares livres, ácidos orgânicos, ácidos gordos, tocoferóis e compostos fenólicos, recorrendo a várias técnicas de cromatografia líquida e gasosa.

##### 2.4.2.1. Açúcares livres

A determinação dos açúcares livres foi realizada com base na metodologia descrita por Obodai et al. (2017), utilizando um sistema de HPLC acoplado a um detetor de índice de refração (*RI-Refracton Index*).

Para a extração, num tubo Falcon de 50 mL adicionou-se aproximadamente 1 g da cada amostra (resíduo sólido restante da extração de ácidos gordos, Secção 2.4.1.3.) e 1 mL de padrão interno (PI; melezitose, 25 mg/mL) e posteriormente procedeu-se à extração com 40 mL de uma solução 80:20 (v/v) etanol: água, num banho termostático (Julabo, SW22; Seelbach, Germany) a 80 °C durante 1 h 30 min, com agitação intercalada a cada 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (Centrífuga refrigerada K24OR, Centurion, Sussex Ocidental, Reino Unido) durante 10 min a 3500 rpm, filtradas, e o sobrenadante transferido para um balão de vidro no qual se procedeu a evaporação do etanol a 50 °C sob pressão reduzida em rotaevaporador (Büchi R-210, Flawil, Suíça). O sobrenadante obtido foi submetido a um processo de deslipidificação, tendo sido lavado três vezes consecutivas com 10 mL de éter etílico. Após concentração, as amostras foram

colocadas numa estufa a 50 °C para a remoção do éter etílico residual, após o qual o resíduo foi redissolvido em água destilada para um volume final de 5 mL. Finalmente, foi filtrado através de filtros de nylon de 0,2 µm para vials, procedendo-se à análise por HPLC-RI, a 35 °C, utilizando um sistema de HPLC (Knauer, sistema Smartline) equipado com um detetor de RI (Knauer Smartline 2300) e com uma coluna 100-5 NH2 Eurospher (4,6 × 250 mm, 5 µm, Knauer). A fase móvel utilizada foi acetonitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v) com um caudal de 1 mL/min.

A identificação dos açúcares foi realizada usando o método do padrão interno e por comparação cromatográfica com padrões autênticos: frutose ( $y=1,04x$ .  $R^2 = 0,999$ ; LD = 0,05 mg/mL; LQ = 0,18 mg/mL); glucose ( $y=0,935x$ .  $R^2 = 0,999$ ; LD = 0,08 mg/mL; LQ = 0,25 mg/mL); e sacarose ( $y=0,977x$ .  $R^2 = 0,999$ ; LD = 0,06 mg/mL; LQ = 0,21 mg/mL). A quantificação foi realizada pela normalização interna da área do pico cromatográfico usando o pico da melezitose (PI) como padrão. Os resultados foram expressos em g por 100 g de peso seco da amostra.

#### 2.4.2.2. Ácidos orgânicos

A determinação dos ácidos orgânicos foi realizada por cromatografia líquida ultra-rápida acoplada a um detetor de diodos (UFLC-DAD; Shimadzu Cooperation, Kyoto, Japão) como previamente descrito por Barros et al. (2013)

Para a extração dos ácidos orgânicos 1 g de amostra foi colocada num gobelé, previamente envolto em papel de alumínio, ao qual adicionou-se 25 mL de ácido metafosfórico (4,5%, v/v). A mistura foi colocada sob agitação magnética durante 20 min, a uma temperatura ambiente de cerca de 25 °C, e posteriormente filtrada para um tubo de ensaio de 20 mL. Para análise cromatográfica, as amostras foram filtradas em filtros de nylon de 0,2 µm para um vial âmbar (1,5 mL) para posterior análise.

A análise cromatográfica foi realizada num sistema Shimadzu 20A series UFLC (Shimadzu Cooperation, Kyoto, Japão). A separação dos compostos foi efetuada através de uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> SphereClone (250 mm x 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex), termostaticada a 35 °C. A deteção ocorreu através de um detetor de díodos (DAD) utilizando 215 nm e 245 nm (para o ácido ascórbico) como comprimentos de onda preferíveis. A fase móvel utilizada em modo isocrático foi ácido sulfúrico 3,6 mM (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) usando um caudal de 0,8 mL/min.

A identificação dos ácidos orgânicos e a respetiva quantificação foi determinada por comparação dos tempos de retenção, dos espectros com padrões comerciais e respetivas retas de calibração (retas de cinco níveis): ácido oxálico ( $y = 1 \times 10^7 x + 231891$ ;  $R^2 = 0,9999$ ; LD = 6,3 µg/mL; LQ = 20,8 µg/mL); ácido quinico ( $y = 671557x + 14583$ ;  $R^2 = 0,9998$ ; LD = 11,3 µg/mL; LQ = 37,6 µg/mL); ácido málico ( $y = 950041x + 6255,6$ ;  $R^2 = 0,9999$ ; LD = 15,9 µg/mL; LOQ = 52,9 µg/mL); ácido cítrico ( $y = 1 \times 10^6 x - 10277$ ;  $R^2 = 0,9997$ ; LD = 4,4 µg/mL; LQ = 14,5 µg/mL); e ácido fumárico ( $y = 154862x + 1 \times 10^6$ ;  $R^2 = 0,9977$ ; LD = 42,5 µg/mL; LQ = 141,7 µg/mL). Os resultados foram expressos em mg por 100 g ps.

#### 2.4.2.3. Ácidos gordos

O perfil dos ácidos gordos foi determinado por cromatografia gasosa acoplado a um detector de ionização por chama (GC-FID, instrumento DANI modelo GC 1000, Milão, Itália), conforme descrito por Barros et al. (2013).

O extrato lipídico resultante da extração por Soxhlet (ver secção 2.4.1.3.) foi submetida a um processo de transterificação para obtenção de FAMES (*Fatty acid methyl ester* - ésteres metílicos de ácidos gordos). Para tal, à gordura total das amostras foi adicionada 5 mL de uma solução de metanol/ácido sulfúrico/tolueno na proporção 2:1:1 (v/v/v), e foram colocadas num banho termostaticado (Julabo, SW22; Seelbach, Germany) a 50 °C com agitação a 160 rotações por minuto (rpm) durante 12 horas. De seguida, para recuperação da fase lipofílica, adicionou-se 3 mL de água destilada aos tubos, para a obtenção das diferentes fases, e de seguida 3 mL de éter etílico com agitação em vórtex (LBX V05 series, LBX Instruments, LABBOX LABWARE S.L., Barcelona, Espanha) para recuperação dos FAMES. Após separação das fases, transferiu-se o sobrenadante para um tubo de ensaio com sulfato de sódio anidro para desidratar o sobrenadante, filtrando, com filtro de nylon de 0,2 µm, para um vial de 2 mL com tampa de membrana de teflon.

O perfil individual de ácidos gordos foi obtido num sistema GC modelo DANI 1000 equipado com um injetor *split/splitless*, detetor de ionização de chama (FID), com detetor a 260 °C e uma coluna Macherey Nagel (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm df). O programa de temperatura do forno obedeceu à seguinte configuração: a temperatura inicial da coluna foi 100 °C, durante 2 min; em seguida, aumentou-se a temperatura a 10

°C/min até 140 °C, 3 °C/min até 190 °C, 30 °C/min até 260 °C durante 2 min. O hidrogénio (gás de transporte) tinha um caudal de 4,0 mL/min (0,61 bar), medido a 50 °C. A injeção split (1:50) foi realizada a 250 °C. Para cada análise injetou-se 1 µL da amostra.

A identificação dos ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos da mistura padrão de 37 FAMES e das amostras. Os resultados foram processados usando o software Clarity 4.0.1.7 (DataApex, Podohradská, República Checa) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

#### 2.4.2.4. *Tocoferóis (vitamina E)*

O procedimento de extração e caracterização cromatográfica dos tocoferóis foi realizado de acordo com o procedimento descrito pelos autores Barros et al. (2013).

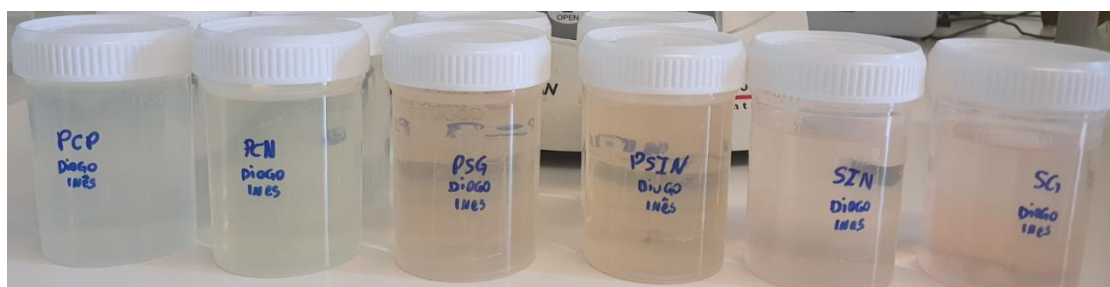
Para a extração, em tubos Falcon 50 mL, envolvidos em papel de alumínio, foram pesados 500 mg de cada amostra e adicionados 100 µL de uma solução BHT (Butilhidroxitolueno, em hexano, 10 mg/mL) e 400 µL do PI (tocol em hexano 50 µg/mL). Em seguida, adicionou-se 4 mL de metanol e homogeneizou no vórtex (LBX V05 series, LBX Instruments, LABBOX LABWARE S.L., Barcelona, Espanha) durante 1 min. Posteriormente adicionou-se 4 mL de hexano e homogeneizou-se mais 1 min no vórtex, adicionando-se mais 2 mL de uma solução aquosa saturada de cloreto de sódio e então, homogeneizado no vórtex mais 1 min. Centrifugou-se (Centrífuga refrigerada K24OR, Centurion, Sussex Ocidental, Reino Unido) durante 5 min a 4000 rpm e transferiu-se, cuidadosamente, o sobrenadante para um tubo falcon de 15 mL, contendo duas colheres de sulfato de sódio anidro, envolvido em papel de alumínio e mantido sob refrigeração num banho de gelo. A amostra foi re-extraída mais duas vezes com metanol e hexano, centrifugada e recolhida o sobrenadante de cada vez. Em seguida, o extrato foi seco e concentrado através de uma corrente de azoto. Por fim, o extrato obtido foi redissolvido em 2 mL de hexano, filtrado através de filtros de nylon 0,22 µm para vials âmbar e analisados por HPLC.

Para a análise cromatográfica utilizou-se um sistema HPLC integrado de bomba quaternária a (Smartline 1000, Knauer), um desgaseificador (Smartline 5000), um amostrador automático (AS-2057 2500) e um detetor de fluorescência (FL, Jasco), com uma coluna em fase normal de Poliamida II (250 x 4,6 mm, 5 µm, YMC da Waters) a 35 °C (forno 7971 R Grace), programado para excitação ao comprimento de onda de 290 nm

e emissão a 330 nm. A fase móvel utilizada foi uma mistura de hexano/acetato de etilo (70:30, v/v) com um caudal de 1 mL/min. Os dados foram analisados usando o software Clarity 2.4 (DataApex, Praga, República Checa). A quantificação foi baseada na resposta do sinal de fluorescência, usando o método do padrão interno e por comparação cromatográfica com padrões:  $\alpha$ -tocoferol ( $y = 1,295x$ ,  $R^2 = 0,991$ ; LD (Limite de Detecção) = 18,06 ng/mL; LQ (Limite de Quantificação) = 60,20 ng/UP);  $\beta$ -tocoferol ( $y = 0,396x$ ,  $R^2 = 0,992$ ; LD = 25,82 ng/mL, LQ = 86,07 ng/mL); e  $\gamma$ -tocoferol ( $y = 0,567x$ ;  $R^2 = 0,991$ ; LD = 14,79 ng/mL, LQ = 49,32 ng/mL). Os resultados foram expressos em mg por 100 g de ps.

#### 2.4.2.5 Compostos fenólicos

Para a determinação dos compostos fenólicos presentes nas amostras de farinha desenvolvidas, foram preparados extratos hidroetanólicos. Pesou-se 1 g de amostra e colocou-se em maceração com uma solução de etanol/água (80:20, v/v; 30 mL) à temperatura ambiente, sob agitação magnética constante (150 rpm) durante 1 hora. Posteriormente, a solução foi filtrada através de um papel de filtro (Whatman n.º 4; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e o processo foi repetido, usando o mesmo volume da solução hidroetanólica e tempo de agitação. Por fim, a fração alcoólica dos extratos obtidos foi evaporada a pressão reduzida (Büchi R-210, Flawil, Suíça) e a fração aquosa obtida (**Figura 9**), foi congelada e posteriormente liofilizada (47 °C, 0.045 bar; FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EUA).



**Figura 9:** Fração alcoólica dos extratos hidroetanólicos (Autoria própria, 2023).

Os extratos hidroetanólicos liofilizados foram redissolvidos numa solução 20:80 etanol/água (v/v) para uma concentração final de 10 mg/mL para análise cromatográfica.

O perfil fenólico foi avaliado através da análise cromatográfica de acordo com o procedimento descrito pelos autores (Bessada et al., 2016), no qual foi usado um equipamento HPLC Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) composto por uma bomba quaternária e dupla detecção on-line: detetor de díodos (DAD), tendo como comprimentos de onda preferências, 280 nm e 370 nm, e em sequência um detetor de espectrometria de massas (MS). Para a separação utilizou-se uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (3 µm, 150 × 4,6 mm, Waters Milford, MA, USA), numa temperatura de operação de 35 °C. A fase móvel foi 0,1% de ácido fórmico em água (A) e acetonitrilo (B). O gradiente de eluição foi de 15% B (5 min), 15% B a 20% B (5 min), 20-25% B (10 min), 25-35% B (10 min), 35-50% B (10 min), e a coluna foi reequilibrada (10 min) utilizando um fluxo de 0,5 mL/min.

A detecção MS foi realizada por um espectrómetro de massa Ion Trap Linear LTQ XL (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA), com uma fonte de ionização electrospray ESI. O azoto foi utilizado como gás de arrasto a 50 psi. O sistema operou com uma voltagem de spray a 5 kV à 325 °C com tensão capilar de -20 V. Foi mantida a voltagem de -66 V do tube lens offset. Os espectros foram gravados em modo ião negativo entre 100 e 1500 *m/z*. A energia de colisão utilizada foi de 35 (unidades arbitrárias).

Os resultados foram analisados no programa Xcalibur® (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA). Para a identificação dos compostos fenólicos estes foram comparados com os tempos de retenção comparando a literatura e/ou quando possível aos espectros de massa UV-Vis. A análise quantitativa foi realizada usando retas de calibração de 7 níveis, nomeadamente: ácido cafeico ( $y = 388345x + 406369$ , LD=0,78 µg/mL; LQ=1.97 µg/mL); ácido clorogénico ( $y = 168823x - 161172$ , LD = 0,20 µg/mL; LQ = 0,68 µg/mL); ácido protocatecuico ( $y = 214168x + 27102$ ,  $R^2 = 0.9999$ ; LD = 0.14 µg/mL; LQ = 0.52 µg/mL); apigenina-6-*C*-glucósido ( $y = 197337x + 30036$ , LD = 0.19 µg/mL; LQ = 0.63 µg/mL); (-)-catequina ( $y = 84,950x - 23,200$ ,  $R^2 = 0.999$ , LD = 0.17 µg/mL; LQ = 0.68 µg/mL); naringenina ( $y = 18433x + 78903$ , LD = 0.17 µg/mL; LQ = 0.81 µg/mL); e quercetina-3-*O*-glucósido ( $y = 34843x - 160173$ , LD = 0.21 µg/mL; LQ = 0.71 µg/mL). tendo como base o sinal UV-Vis dos padrões comerciais em seu comprimento de onda máximo e, quando não disponíveis, a partir de outros compostos com o mesmo grupo fenólico. Os resultados foram expressos em mg por g de extrato.

#### 2.4.3. Avaliação das propriedades bioativas *in vitro*

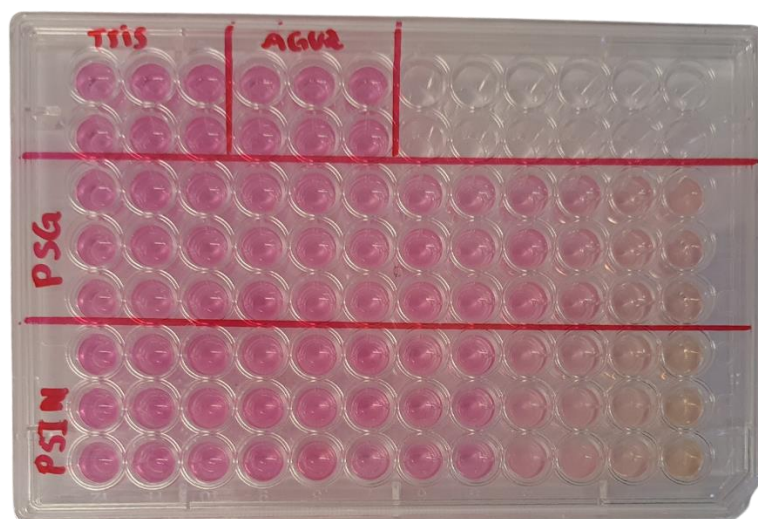
Para a avaliação das propriedades bioativas *in vitro* foram utilizados os extratos hidroetanólicos liofilizados anteriormente preparados na secção 2.4.2.5.

#### 2.4.3.1. Atividade antioxidante

##### 2.4.3.1.1. Inibição da peroxidação lipídica em tecidos cerebrais de porco através da formação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para a avaliação do potencial antioxidante através do ensaio TBARS os extratos hidroetanólicos foram redissolvidos em água para obtenção de uma solução mãe a 10 mg/mL, a qual foi diluída sucessivamente para obtenção de doze concentrações abaixo.

O protocolo procedeu-se conforme descrito por Souilem et al., (2017). Cérebro de porco (*Sus scrofa*), obtido num matadouro local, foram dissecados e homogeneizados com um Polytron em tampão Tris-HCl refrigerado (20 mM, pH 7,4), para produzir um homogeneizado de tecido cerebral 1:2 (*m/v*) que foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 min. Em tubos eppendorf de 2 mL foi colocado 200 µL de cada uma das soluções de extrato hidroetanólico, às quais se adicionaram 100 µL de ácido ascórbico (0,1 mM), 100 µL de sulfato de ferro (FeSO<sub>4</sub> – 10 mM) e 100 µL do sobrenadante do homogeneizado de cérebro de porco e incubou-se à 37,5 °C durante 1 hora. Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 500 µL ácido tricloroacético (28% *m/v*), seguido por 380 µL de ácido tiobarbitúrico (2%, *m/v*, TBA), e a mistura foi aquecida em banho termostaticado (Julabo, SW22; Seelbach, Germany) a 80 °C durante 20 min. Posteriormente, centrifugou-se a mistura a 3000 rpm durante 5 min para remover a proteína precipitada, o complexo malondialdeído-ácido tiobarbitúrico no sobrenadante foi retirado e transferido para microplacas de 96 poços e a intensidade da cor foi medido pela sua absorbância a 532 nm (**Figura 10**).



**Figura 10:** Complexo malondialdeído-ácido tiobarbitúrico na microplaca de 96 poços (Autoria própria, 2023).

A taxa de inibição (%) foi calculada usando a **Equação 6** onde A representa a absorbância do controlo (água) e B a absorbância da solução do composto. Como controlo positivo foi usado o Trolox e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g/mL}$ .

**Equação 6:** Determinação da taxa de inibição em ensaio TBARS.

$$\text{Inibição da peroxidação lipídica (\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

#### 2.4.3.1.2. Inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA)

A atividade anti-hemolítica dos extratos hidroetanólicos foi avaliada através do ensaio de OxHLIA previamente descrito por Lockowandt et al. (2019). Primeiramente, foi efetuada uma colheita de sangue de ovelhas saudáveis, do qual foram obtidos os eritrócitos (plasma e camada leuco-plaquetária foram descartados) por centrifugação a 1000 g durante 5 min a uma temperatura de 10 °C. Após a eliminação do sobrenadante, os eritrócitos recuperados foram submetidos a uma lavagem com NaCl (150 mM) seguida de três lavagens com tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,4), procedendo-se a centrifugação e remoção do sobrenadante a cada lavagem. O sedimento de eritrócito foi depois ressuspensão em PBS 2,8% (v/v).

Numa placa de 48 poços de fundo plano, 200 µL da solução de eritrócitos foram misturados com 400 µL de solução PBS (controlo negativo), ou com os extratos hidroetanólicos dissolvidos em PBS ou água (para hemólise completa). O Trolox foi usado como controlo positivo. Realizou-se uma pré-incubação das placas a 37 °C durante 10 min com agitação, adicionando-se em seguida dicloridrato de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) (AAPH, 160 mM em PBS, 200 µL), incubando-se de seguida nas mesmas condições. A densidade ótica foi então medida a 690 nm em intervalos de 10 min até ao máximo de 10 min (Takebayashi, et al., 2012). O cálculo da percentagem de população de eritrócitos que permanece intacta (P) foi calculada mediante a **Equação 7**.

**Equação 7.** Percentagem de população de eritrócitos intactos.

$$P (\%) = (S_t - CH_0 / S_0 - CH_0) \times 100$$

onde  $S_t$  e  $S_0$  correspondem a densidade ótica da amostra aos tempos  $t$  e 0 min, respetivamente, e  $CH_0$  é a densidade ótica da hemólise completa a 0 min. Os resultados foram expressos como tempo de atraso da hemólise ( $\Delta t$ ), o qual foi calculado de acordo com a

### Equação 8

**Equação 8.** Tempo de atraso da hemólise.

$$\Delta t (\text{min}) = H_{t50} (\text{amostra}) - H_{t50} (\text{controlo})$$

onde  $H_{t50}$  corresponde ao tempo hemolítico de 50% (min) obtido graficamente a partir da curva de hemólise de cada concentração de amostra de antioxidante. Os valores de  $\Delta t$  foram posteriormente correlacionados linearmente com as diferentes concentrações de amostra, a partir das quais foi calculada a concentração com capacidade de retardar a hemólise em 60 min ( $IC_{50}$  (60 min), µg/mL).

#### *2.4.3.2. Atividade citotóxica em células tumorais e hepatotóxica e nefrotóxica em células não tumorais*

Para a avaliação do potencial citotóxico, hepatotóxico e nefrotóxico dos extratos hidroetanólicos das farinhas de sorgo *in natura* e germinado, foi realizado o ensaio da sulforrodamina B (SRB) previamente descrito por Mandim et al., (2021). Foram utilizadas

três linhas celulares tumorais: AGS (adenocarcinoma gástrico), CaCo (adenocarcinoma colorretal) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama). Foram também testadas duas linhas celulares não tumorais: PLP2 (cultura primária de fígado de porco) e Vero (rim de macaco verde africano) com a finalidade de verificar a hepatotoxicidade e nefrotoxicidade dos extratos hidroetanólicos, respectivamente. Todas as linhas celulares foram mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL), com exceção do Vero, mantido em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (10%), glutamina e antibióticos. Os frascos de cultura celular foram incubados a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono), sob atmosfera humidificada. As células foram utilizadas somente quando apresentavam 70 a 80% de confluência. O desprendimento e desaglomeração das células foi garantido pela adição, prévia aos ensaios, de tripsina (enzima proteolítica) às culturas de células aderentes, que após o desprendimento (5 min) foram centrifugadas durante 5 min a 120 rpm, e re-suspensas em meio RPMI.

8mg de cada um dos extratos foi dissolvido em água destilada (1 mL), a fim de obter as soluções mãe com concentração de 8 mg/mL, a partir das quais foram feitas diluições sucessivas, obtendo-se as concentrações a serem testadas de 0,125 a 8 mg/mL. Uma alíquota (190 µL) da suspensão celular de cada uma das linhas testadas com uma concentração celular de  $5 \times 10^4$  células/mL, foi incubada com uma alíquota de cada uma das concentrações dos diferentes extratos (10 µL) em microplacas de 96 poços durante 48 horas. O intervalo de concentrações testadas foi de 6,25 – 400 µg/mL.

Após o período de incubação, as células foram corrigidas com TCA (10% *m/v*; 100 µL) refrigerado, e as placas novamente incubadas por 1 hora a 4°C, lavadas com água e, após secagem, colocadas em contato com uma solução de Sulfarodmina B (SRB, 0,057%, *m/v*; 100 µL) e deixadas à temperatura ambiente por 30 min. Para remover a SRB não aderida, as placas foram lavadas três vezes com uma solução de ácido acético (1% *v/v*) e colocadas a secar. Finalmente, a SRB aderida foi solubilizada com Tris (10 mM, 200 µL) e lida a absorbância a 540 nm num leitor de microplacas Biotek ELX800. Os resultados foram expressos em concentração de extrato com capacidade de inibir o crescimento celular em 50% - IG<sub>50</sub>. Como controlo positivo foi utilizada a elipticina. Todos estes processos e operações foram efetuados em ambiente asséptico numa câmara de fluxo laminar vertical (TLStar, AV-30/70).

#### 2.4.3.3. Atividade anti-inflamatória

O potencial anti-inflamatório foi avaliado através da produção de óxido nítrico formado pelos lipopolissacarídeos da linha celular de macrófagos de rato RAW 264.7 obtidas no DMSMZ – Leibniz – Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Souilem et al., 2017). As concentrações dos extratos a testar foram preparadas de maneira semelhante à avaliação do potencial citotóxico, hepatotóxico e nefrotóxico. As culturas de células de macrófagos de rato RAW 264.7 foram preparadas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (SFB, 10%), glutamina (1%), aminoácidos não essenciais (2mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL), e mantidas numa incubadora a 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera humidificada. As células foram então separadas do meio através de centrifugação a 1200 rpm por 5 min, descartou-se o sobrenadante e realizou-se a contagem das células.

As células com crescimento ativo foram raspadas e ajustadas a uma densidade celular de  $5 \times 10^5$  células/mL, com uma proporção de células mortas inferior a 5%, conforme teste de exclusão de Azul de Tripiano. Colocou-se uma alíquota da suspensão celular de macrófagos (300 µL) em microplacas de 96 poços, de modo que a quantidade de células por poço fosse de  $1,5 \times 10^5$  e deixadas a aderir e multiplicar por 24 h, incubados à temperatura 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, as células foram tratadas com 15 µL dos diferentes extratos e novamente incubadas durante 1 h. Foi adicionado 30 µL de lipossacarídeo (LPS, 1 µg/mL) e incubou-se por mais 24 h. Os controlos negativos foram preparados sem adição de LPS para observação de possível indução destes nas alterações dos níveis basais de óxido nítrico (NO). Para o controlo positivo foi utilizada dexametasona (50 µM).

A quantificação de óxido nítrico foi feita através da utilização de um kit do sistema de reagentes de Griess (soluções de nitrofenamida, etilenodiamina e nitrito) e através da curva de calibração de nitrito (nitrito de sódio 100 mM a 1,6 mM) preparada numa placa de 96 poços. O óxido nítrico produzido foi determinado através da leitura das absorvâncias a 540 nm (leitor de microplacas ELX800 Biotek, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) e pela comparação com a reta de calibração do padrão ( $y = 0,0063x + 0,1368$ ,  $R^2 = 0,9989$ ). Os resultados foram calculados através da representação gráfica da percentagem de inibição da produção de óxido nítrico *versus* a concentração de

amostra, e expressos relativamente à concentração de cada um dos extratos que provoca a inibição, em 50%, da produção de óxido nítrico – IC<sub>50</sub>.

## **2.5. Aplicação da farinha de sorgo *in natura* e germinado em produtos de panificação**

Quatro formulações de pães foram elaboradas: pão de sorgo *in natura* (PSIN), pão de sorgo germinado (PSG), pão com farinha de trigo (100%) denominado pão controlo negativo (PCN) e pão com misturas de farinhas sem glúten denominado controlo positivo (PCP). A formulação utilizada na elaboração dos pães consiste numa adaptação da formulação base disponibilizada por Gava, (2017), que consiste em: farinha (150 g), sal (2,5 g), açúcar (30 g), fermento (5 g), água (175 mL), aquafaba (5 g, preparação descrita na secção seguinte), azeite (18 g) e goma xantana (3,75 g). As farinhas utilizadas para a formulação PCP consistiram numa mistura de farinha de arroz (52 %), fécula de batata (36 %) e polvilho doce (12 %) como descrita por (Santos et al., 2019).

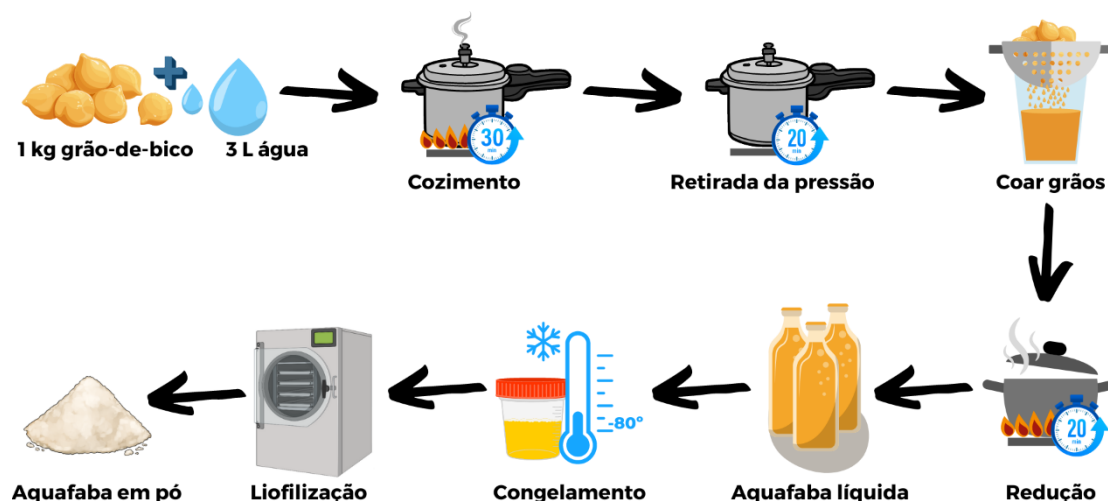
Primeiramente, e apenas para as farinhas de sorgo *in natura* e germinado, que apresentam alto teor de fibras dietéticas totais e isenção de glúten, foi realizado um passo de gelatinização das farinhas, com finalidade de melhorar a qualidade da massa. Num banho termostaticado (Julabo, SW22; Seelbach, Germany) durante 10 min, às quais foi sendo adicionada água até completar 150 mL e atingir a temperatura entre 60 e 65 °C.

De seguida, para a elaboração das quatro amostras de pão foi feita uma pré-fermentação durante 5 min, com açúcar, fermento biológico seco (Fleishman ®) e 10 mL de água. Em seguida misturou-se o sal e a goma xantana com a farinha com a ajuda de um misturador (Bimby, Vorwerk, Alemanha) durante 5 min, ao qual foi adicionado a aquafaba e azeite, misturando durante 10 min. Por fim, o preparado fermentado com mais 10 mL de água foram adicionados, batendo-se por mais 3 min em potência baixa. A massa de pão obtida foi enformada em formas de alumínio de 100 mm de comprimento e 80 mm de largura e realizado um novo passo de fermentação. A fermentação foi realizada em ambiente controlado (80 % HR, 40 °C), durante 32 min. As amostras de pão foram cozinhadas em forno a 150 °C durante 40 min e arrefecido à temperatura ambiente, posteriormente embalados em sacos de polietileno e armazenados à temperatura ambiente em local seco e fresco durante 1 h e 24 h para avaliação das suas propriedades físicas (secção 2.5.2.). Uma amostragem de cada amostra de pão foi congelada, liofilizada e

triturada para avaliação das suas propriedades nutricionais, químicas e bioativas (secção 2.5.3.).

### 2.5.1. Preparação da aquafaba em pó

Para obtenção da aquafaba em pó, foi seguida a metodologia descrita por Silva et al. (2022). Foram utilizadas amostras de grão-de-bico do genótipo Kabuli, compradas num comércio de venda a retalho em Bragança, Portugal, com um tamanho aproximado de 9 mm. Na **Figura 11**, encontra-se descrito o processo de preparação da aquafaba. Primeiramente, os grãos passam por um processo de coacção e de seguida, numa panela de pressão na proporção de 1 kg de grão para 3 litros de água (1:3), foram cozidos durante 30 min (contados a partir do momento em que a panela adquiriu pressão), aguardando-se 20 min para a retirada da pressão e, posteriormente, coaram-se os grãos com auxílio de uma peneira de malha de aço inoxidável. O líquido resultante do cozimento (aquafaba) foi colocado numa panela para redução durante 20 min, em fogo alto. Por fim, a aquafaba foi fracionada em frascos de recolha, congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$  e liofilizada (liofilizador FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EUA.) até obtenção de um pó seco, homogéneo e de cor amarelada. O extrato de aquafaba foi armazenado num local seco e fresco, protegido da luz, até uso no fabrico dos produtos de panificação.



**Figura 11:** Ilustração do esquema de produção de aquafaba líquida

(Autoria própria, 2023).

## 2.5.2. Avaliação das propriedades físicas dos produtos de panificação desenvolvidos

### 2.5.2.1. Textura

O perfil de textura dos pães foi obtido pelo método TPA (Texture Profile Analysis), o qual se aplica a alimentos sólidos e semi-sólidos, e baseado nas condições do método da AACC 74-09, com modificações (AACC, 2000). Foi utilizado o texturômetro (modelo TA HD plus, Stable Micro System, Godalming, Reino Unido) em interface com o computador utilizando o programa Exponent Lite 2016, versão 6.1.16 lite. As análises de textura foram realizadas numa fatia de 25 mm de dois pães de cada formulação, da qual foram retiradas as bordas com auxílio de um cilindro de aço inoxidável de 25 mm para não interferirem nos resultados (**Figura 12**). Uma sonda cilíndrica de alumínio de 75mm de diâmetro (P/100) foi usada num teste de dupla compressão “Texture Profile Analysis” (TPA) para penetrar até 50% da profundidade da amostra a uma velocidade de teste de 2 mm/s, com um atraso de 30 s entre as duas compressões. A dureza (N), mastigabilidade (N), elasticidade (-), coesão (-) e resiliência (-) foram calculados a partir da curva TPA.



**Figura 12:** Amostra de pão preparada para análise de textura no texturômetro (Autoria própria, 2023).

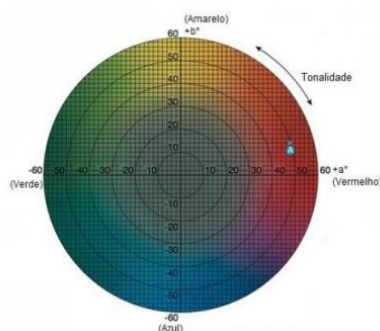
### 2.5.2.2. Atividade de água ( $A_w$ )

A análise de atividade de água dos pães foi realizada segundo método oficial de análise n° 978.18 (AOAC, 1999), onde é criada uma atmosfera especial para a amostra e realizada a medida manometricamente da água livre presente no alimento. A análise de atividade de água foi realizada com auxílio do equipamento medidor de atividade de água (AquaLab – 4TE, Munique, Alemanha), à temperatura constante ( $24 \pm 1$  °C), fazendo-se as medições em duplicado.

### 2.5.2.3. Cor

Os parâmetros de cor dos quatro pães e das duas farinhas foram medidos utilizando colorímetro (modelo CR400, Konica Minolta, Nova Jersey, EUA) com esfera de integração e ângulo de visão de 45°, (iluminação d/45 e iluminante D). Sem necessidade de preparação da amostra, os valores de luminosidade foram determinados na superfície e no miolo das amostras em 3 pontos distintos.

Os resultados foram expressos em valores  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , onde o parâmetro de luminosidade ( $L^*$ ) varia do preto (0) ao branco (100), componente  $a^*$  do verde (-60) ao vermelho (+60) e componente  $b^*$  do azul (-60) ao amarelo (+60), sendo o resultado a média dessas três componentes. A **Figura 13**, representa o espaço de cor para este sistema.



**Figura 13:** Espaço de cor CIE Lab (Konica Minolta, 2021).

### 2.5.2.4. Perda de peso após cozedura

A perda de peso foi determinada segundo a metodologia proposta por Belorio & Gómez (2020), sendo calculada pela diferença da massa (g) do pão antes e após a cozedura, expresso em percentagem (%) conforme **Equação (9)**.

**Equação 9:** Perda de peso após cozedura.

$$Perda\ de\ peso(\%) = \left( \frac{\text{massa antes da cozedura (g)}}{\text{massa após cozedura (g)}} \right) \times 100$$

#### 2.5.2.5. *Volume específico*

O volume específico do pão foi determinado usando um sensor a laser com o Volscan Profiler (Stable Micro Systems, Godalming, Reino Unido). As medições de volume foram realizadas em dois pães de cada amostra. O volume específico foi calculado como a razão entre o volume do pão e respetiva massa, expressado mL/g conforme **Equação (10)**.

**Equação 10:** Volume específico.

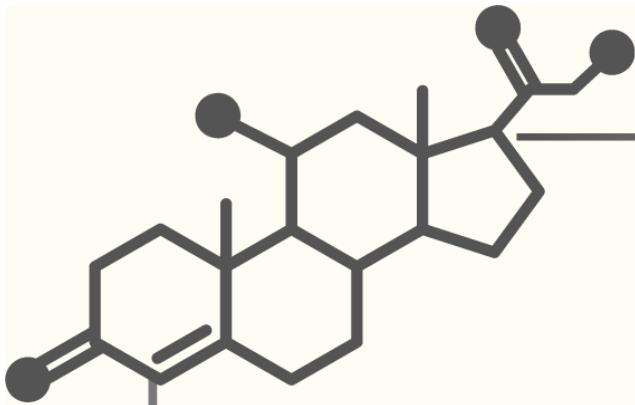
$$\text{Volume específico (mL/g)} = \left( \frac{\text{volume do pão (mL)}}{\text{massa do pão (g)}} \right)$$

#### 2.5.3. *Avaliação das propriedades nutricionais, químicas, e bioativas dos produtos obtidos*

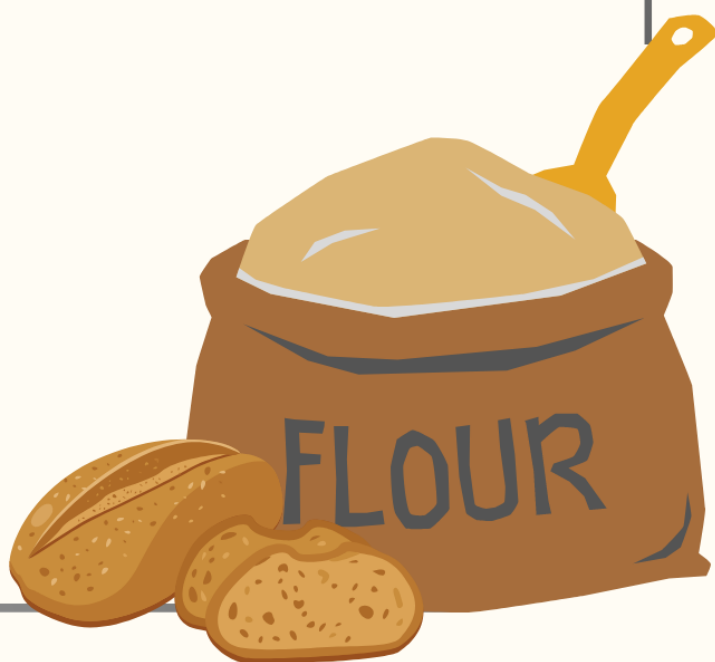
As quatro amostras de pão desenvolvidas após liofilização foram também estudadas quanto ao seu valor nutricional, composição química e propriedades bioativas. A humidade, teor de cinzas, gordura total, proteína bruta, hidratos de carbono e valor energéticas foram determinados seguindo os métodos descritos anteriormente na **secção 2.4.1**. Para a determinação do perfil de ácidos gordos, tocoferóis, açúcares e ácidos orgânicos, foram utilizados os métodos previamente descritos nos sub-títulos **2.4.2.1**, **2.4.2.2.**, **2.4.2.3.** e **2.4.2.4.**, respectivamente. Foram também preparados extratos hidroetanólicos como descritos anteriormente no sub-título **2.4.2.5.**, para posterior estudo do perfil fenólico (**2.4.2.5.**) e propriedades bioativas (secção **2.4.3.**) dos produtos desenvolvidos.

## 2.6. Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicado e os valores expressos como média±desvio padrão (DP). As diferenças significativas entre amostras foram analisadas através do teste *t*-student com um nível de significância de 95%, utilizando o IBM SPSS Statistics for Windows, Versão 23.0. (IBM Corp., Armonk, Nova York, EUA). No caso de haver mais do que dois fatores a serem analisados, foi usada uma análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste HSD de Tukey com  $\alpha = 0,05$ .



# Capítulo 3



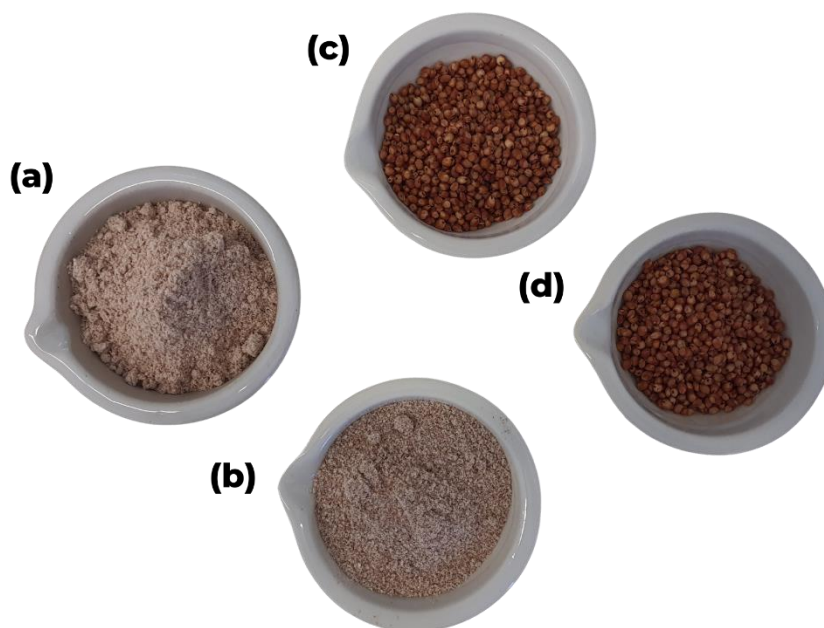
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Caracterização das farinhas de sorgo *in natura* e germinado

##### 3.1.1. Cor, granulometria e propriedades funcionais das farinhas

Os resultados referentes às características físicas das farinhas de sorgo *in natura* e germinado estão presentes na **Tabela 1**.

A coloração da farinha tem um grande impacto na aceitação do produto pelos consumidores. Os produtos de panificação fabricados com farinhas integrais resultam num produto com coloração mais escura em função do alto teor de fibras presentes no grão não processado, o qual proporciona um melhor perfil nutricional com benefícios para a saúde, fator com impacto direto na preferência do consumidor final (Sajdakowska et al., 2019). Na **Figura 14** estão ilustradas as farinhas obtidas dos grãos de sorgo *in natura* e germinado.



**Figura 14:** Grão de sorgo *in natura* e germinado e respectivas farinhas; (a): Farinha de sorgo *in natura*; (b): Farinha de sorgo germinado; (c): Grão de sorgo *in natura*; (d): Grão de sorgo germinado. (Autoria própria, 2023).

**Tabela 1.** Parâmetros de cor, granulometria, CAA, CAO, poder de dilatação, solubilidade, firmeza e propriedades das farinhas de sorgo *in natura* e germinado (Média±DP).

	Sorgo germinado	Sorgo <i>in natura</i>	<i>p</i> -value*
<b>Parâmetros de cor</b>			
<i>L</i> *	73,5 ± 0,3	76,7 ± 0,5	<0,001
<i>a</i> *	0,92 ± 0,07	0,24 ± 0,01	<0,001
<i>b</i> *	20,4 ± 0,4	21,4 ± 0,7	0,001
<b>Granulometria</b>			
<b>Peneira / abertura (µm)</b>	<b>Retenção (%)</b>		
16 / 1,18	0,16 ± 0,05	0,42 ± 0,02	<0,001
20 / 85	7,9 ± 0,9	7,1 ± 0,2	0,002
35 / 5	57 ± 2	78,6 ± 0,8	<0,001
60 / 250	17 ± 3	10,2 ± 0,9	<0,001
Base / <150	17,5 ± 0,3	3,7 ± 0,4	<0,001
<b>CAA (g/g)</b>	2,349 ± 0,001	2,35 ± 0,03	0,793
<b>CAO (g/g)</b>	1,91 ± 0,02	1,77 ± 0,01	<0,001
<b>Poder de dilatação (g/g)</b>	6,59 ± 0,05	7,64 ± 0,05	0,004
<b>Solubilidade (%)</b>	0,89 ± 0,02	0,53 ± 0,02	<0,001
<b>Firmeza (g/cm<sup>2</sup>)</b>			
24 h	23,7 ± 0,8	220 ± 11	<0,001
48 h	40 ± 6	229,024 ± 0,008	<0,001
72 h	52,6 ± 0,1	307 ± 24	<0,001
<b>Propriedades da pasta</b>			
PV (cP)	298	1148	-
BD (cP)	142	121	-
FV (cP)	429	2477	-
SB (cP)	273	1450	-
PT (°C)	84,9	86,6	-

CAA: capacidade de absorção de água; CAO: capacidade de absorção de óleo; PV: *peak viscosity* (pico de viscosidade); BD: *breakdown* (quebra da viscosidade); FV: *final viscosity* (viscosidade final); SB: *set back* (tendência à retrogradação); PT: *peak temperature* (pico de temperatura). Resultados expressos em média ± desvio padrão (DP). \* - Teste *t*-student.

A germinação dos grãos de sorgo não alterou estatisticamente a coloração da farinha no parâmetro *b*\* quando comparado com a farinha de sorgo *in natura*. No entanto, para os parâmetros *L*\* e *a*\*, a farinha oriunda do sorgo germinado apresentou diferenças

significativas ( $p < 0,001$ ) quando comparada com a farinha de sorgo *in natura*. Esta diferença no fator  $a^*$  está relacionada com o aumento de alguns compostos durante a germinação, como o  $\beta$ -caroteno e alguns taninos, que estão presentes no pericarpo do grão (Liu et al., 2017; Olamiti et al., 2020).

Em estudos do efeito da maltagem e fermentação de cereais, Olamiti et al., (2020), relataram que com o aumento no tempo destas duas etapas, aumentou também a luminosidade da farinha, sendo estes semelhantes com os obtidos neste trabalho, indicando uma farinha clara, com tendência para o amarelo. A cor da farinha também pode ter sido influenciada pela sua granulometria, uma farinha com partículas maiores apresenta maiores frações de partículas externas do grão, onde está mais presente a coloração avermelhada, característica do grão de sorgo. Uma farinha mais fina apresenta um aumento do parâmetro  $L^*$ , indicador de uma farinha mais clara (Trappey et al., 2015).

A distribuição do tamanho das partículas da farinha depende das características de moagem e propriedades do grão. A partir da análise gravimétrica da farinha, observou-se que mais de 74 % das partículas estavam retidas nas peneiras de abertura entre 0,500  $\mu\text{m}$  e 250  $\mu\text{m}$ . Martino et al., (2012) analisaram a granulometria de diferentes farinhas de sorgo e obtiveram resultados semelhantes, com uma retenção maior das farinhas na peneira de abertura de 0,42  $\mu\text{m}$ .

A granulometria da farinha é um fator importante para a panificação. Partículas menores aumentam a quantidade de amido acessível que promove um alto grau de gelatinização e retrogradação do amido, que para além de contribuir para as propriedades viscoelásticas da massa, também contribui para o volume e a firmeza do produto final (Curti et al., 2022).

A capacidade de absorção de água (CAA) é um índice da quantidade máxima de água que a farinha pode absorver e reter e está relacionada com a granulometria das farinhas, com a quantidade de fibras (características químicas do produto) e com a capacidade de formação de géis de moléculas de amido (Silva et al., 2022). As farinhas de sorgo estudadas não apresentaram diferenças significativas para CAA, apresentando aproximadamente 2,35 g/g para ambas as farinhas.

Já para a capacidade de absorção de óleo (CAO), a germinação influenciou significativamente a absorção de óleo, e o aumento foi de aproximadamente 8% para a farinha de sorgo germinado. Valores semelhantes foram relatados por Rothschild et al. (2015), uma vez que demonstraram que a germinação em grãos de quinoa não causou

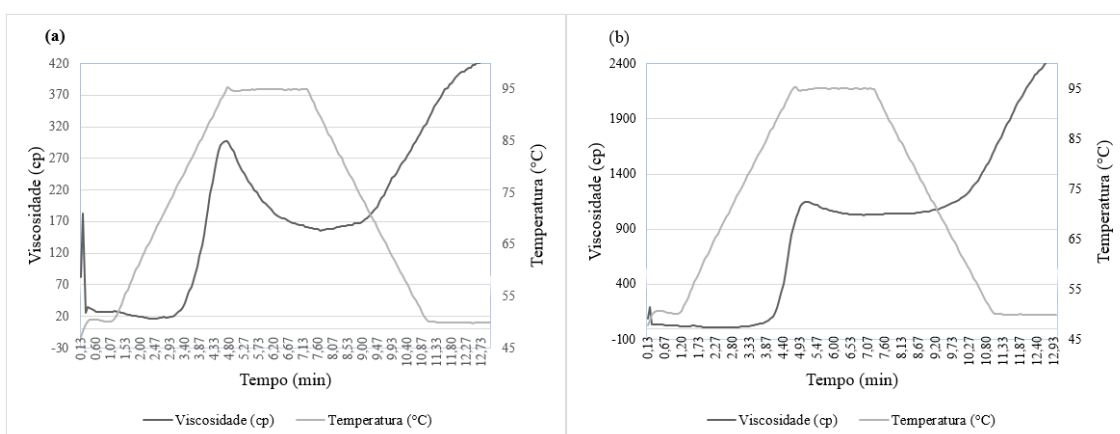
diferenças significativas na CAA antes de 48 h de germinação, enquanto a CAO aumentou a partir de 24 h. O aumento da capacidade de absorção de óleo está associado com a solubilização e dissociação de proteínas levando a uma maior disponibilidade de superfície de proteínas lipofílicas, das quais os aminoácidos hidrofóbicos se ligam às cadeias laterais da cadeia hidrocarbonada do óleo e, portanto, resultam no aprimoramento das farinhas preparadas a partir de grãos germinados (Ocheme et al., 2015).

O poder de dilatação refere-se à capacidade dos grânulos de amido de inchar durante o aquecimento e com excesso de água. Como é possível observar, pelos resultados obtidos, a germinação do sorgo influenciou significativamente este parâmetro da farinha, visto que a dilatação diminuiu. A farinha de sorgo *in natura* apresentou um valor de  $7,64 \pm 0,05$  g/g, já a farinha de sorgo germinada apresentou  $6,59 \pm 0,05$  g/g. Entretanto, para a solubilidade percebe-se que aumentou com o processo de germinação. A mudança no poder de dilatação e solubilidade deve-se a alterações na estrutura do amido causadas principalmente pelo aumento da relação amilose/amilopectina, consequência da atividade enzimática desencadeada durante a germinação do grão, que hidrolisam preferencialmente as cadeias de amilopectina (Marchini et al., 2021). A germinação leva também à formação de dextrinas, oligossacarídeos e açúcares fermentáveis que não têm poder de intumescimento e que também interferem no amido na formação de géis mais compactos e, portanto, as farinhas preparadas a partir de grãos germinados têm baixo poder de dilatação (Singh et al., 2017).

A firmeza do gel de amido é resultante principalmente da retrogradação do amido, a qual depende de fatores como a granulometria da farinha e a cristalinidade da amilopectina (Singh et al., 2017). A firmeza dos géis de farinha de sorgo *in natura* foi maior do que o de sorgo germinado, com valores de  $220 \pm 11$  e  $23,7 \pm 0,8$  g/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Observa-se um aumento da firmeza dos géis ao longo do tempo, e todas as farinhas apresentaram diferenças significativas. A firmeza do gel de farinha de sorgo germinado atingiu  $23,7 \pm 0,8$  g/cm<sup>2</sup> nas primeiras 24 h e chegou a  $52,6 \pm 0,1$  g/cm<sup>2</sup> depois de 72 h de elaboração. A farinha de sorgo *in natura* foi de  $220 \pm 11$  (24 h) para  $307 \pm 24$  g/cm<sup>2</sup> (72 h), portanto, a germinação prolongou e afetou de modo a diminuir a retrogradação e sinérese dos géis de amido de sorgo. Este fenômeno deve-se ao fato de que durante a germinação há a ativação de várias enzimas amilolíticas, como amilases,  $\beta$ -glucanases e proteases, que degradam posteriormente as ramificações mais externas da amilopectina no grânulo de amido (Singh et al., 2017).

O perfil da pasta em água foi afetado pela germinação do grão de sorgo (**Figura 15**). As características da pasta das farinhas de sorgo *in natura* e germinado estão também descritas na **Tabela 1**. O processo de germinação provocou uma diminuição na viscosidade durante as fases de aquecimento e arrefecimento. A temperatura de pasta para a farinha de sorgo *in natura* foi de 86,6 °C, enquanto para a farinha de sorgo germinado foi de 84,9 °C, indicando que a germinação afeta a temperatura para atingir o intumescimento (dilatação) do grânulo de amido. Observou-se também uma diminuição no pico de viscosidade após o processo de germinação do sorgo e um aumento na temperatura de gelatinização. Isto pode dever-se vários fatores, incluindo à degradação do amido em partículas de baixo peso molécula, à atividade da enzima  $\alpha$ -amilase, e, por fim, às alterações nas proteínas e ácidos gordos durante o processo de germinação (Jribi et al., 2019).

O valor de recuo reflete a tendência de retrogradação do amido na pasta. Este valor é menor para a amostra de sorgo germinado, sugerindo uma diminuição na capacidade de retrogradação do amido em comparação com o sorgo *in natura*, confirmando os dados sobre a firmeza do gel de amido. Durante a germinação, ocorre a hidrólise da parte mais externa da amilopectina pela  $\alpha$ -amilase, não sendo mais possível a formação de grandes cristais de amilopectina e que, por consequência, os cristais menores restantes não são suficientes para promover um grande aumento da viscosidade durante o arrefecimento da pasta (Marchini et al., 2021).



**Figura 15:** Perfil de pasta da farinha de sorgo: (a) sorgo germinado (b) sorgo *in natura*. (Autoria própria, 2023).

### 3.1.2. Perfil nutricional, valor energético e composição química das farinhas

#### 3.1.2.1. Composição nutricional das farinhas obtidas

Os resultados do perfil nutricional e valor energético das farinhas de sorgo *in natura* e germinado estão descritos na **Tabela 2**. Relativamente ao teor de hidratos de carbono, não houve diferenças significativas ( $p = 0,05$ ) entre as farinhas do sorgo germinado e *in natura*. No entanto, nos restantes parâmetros houve diferenças significativas, sendo que a farinha de sorgo germinado apresentou maiores valores de humidade, proteínas e cinzas, enquanto a farinha de sorgo *in natura* apresentou maior teor de gordura total e fibras dietéticas totais.

O teor de humidade de ambas as farinhas está dentro dos padrões de qualidade do regulamento europeu para farinhas de acordo com a Portaria nº254/2003 de 19 de março que estabelece um valor máximo de humidade de 14,5%, sendo que a farinha de sorgo *in natura* apresentou um teor menor ( $9,505 \pm 0,005$  g/100 g). Estas diferenças nos teores de humidades, podem ter origem no processo de germinação, uma vez que o grão passa por um processo de hidratação que estimula os processos bioquímicos inerentes ao processo de germinação. A mesma portaria informa ainda que o padrão para cinzas totais nas farinhas é de, no máximo, 1%, sendo que a farinha de sorgo germinado tem um valor ligeiramente superior ( $1,03 \pm 0,01$  g/100 g), enquanto a farinha de sorgo *in natura* permaneceu dentro do padrão ( $0,89 \pm 0,01$  g/100 g).

O processo de germinação aumentou significativamente o teor de proteína bruta, uma vez que a farinha de sorgo *in natura* apresentou valores de  $5,9 \pm 0,1$  g/100 g enquanto a farinha oriunda do sorgo germinado rondou os valores de  $9,03 \pm 0,42$  g/100 g. O aumento do teor de proteína bruta durante a germinação foi anteriormente explicado por Xu et al., (2019), que se deve provavelmente devido à síntese de enzimas pela semente em germinação, uma mudança composicional após a degradação de outros constituintes, e/ou a síntese de proteínas recém-formadas que ocorre durante a germinação. Contudo, Fouad & Rehab, (2015) explicam que o aumento de proteína é plausível se a germinação for realizada com o suplemento de uma fonte de nitrogênio, neste caso, o aumento no teor

de proteína foi atribuído à perda de peso seco, principalmente de hidratos de carbono através da respiração durante a germinação.

Relativamente ao teor de gordura total, a farinha de sorgo germinado apresentou menores quantidades quando comparada com a farinha de sorgo *in natura*, com valores de  $3,018 \pm 0,003$  e  $4,21 \pm 0,09$  g/100 g, respectivamente. No processo de germinação, ocorre o aumento das atividades das enzimas lipolíticas, que hidrolisa a componente de gordura em ácidos gordos e glicerol, o que resulta, precisamente, na diminuição do teor de gordura (Singh et al., 2017). Em conjunto, pode ter sido influenciado pelo desenvolvimento da  $\beta$ -oxidação e do ciclo do glioxilato, utilizado como fonte de energia para a germinação do grão (Ma et al., 2016).

Por último, o valor energético obtido foi de  $417,5 \pm 0,4$  kcal/100 g para a farinha de sorgo *in natura* e de  $384 \pm 1$  kcal/100 g para a farinha de sorgo germinado. Esta diferença no valor energético entre as farinhas deve-se principalmente às mudanças bioquímicas e fisiológicas ocorridas durante a germinação para fornecer energia para o crescimento de novas plantas (Singh et al., 2017).

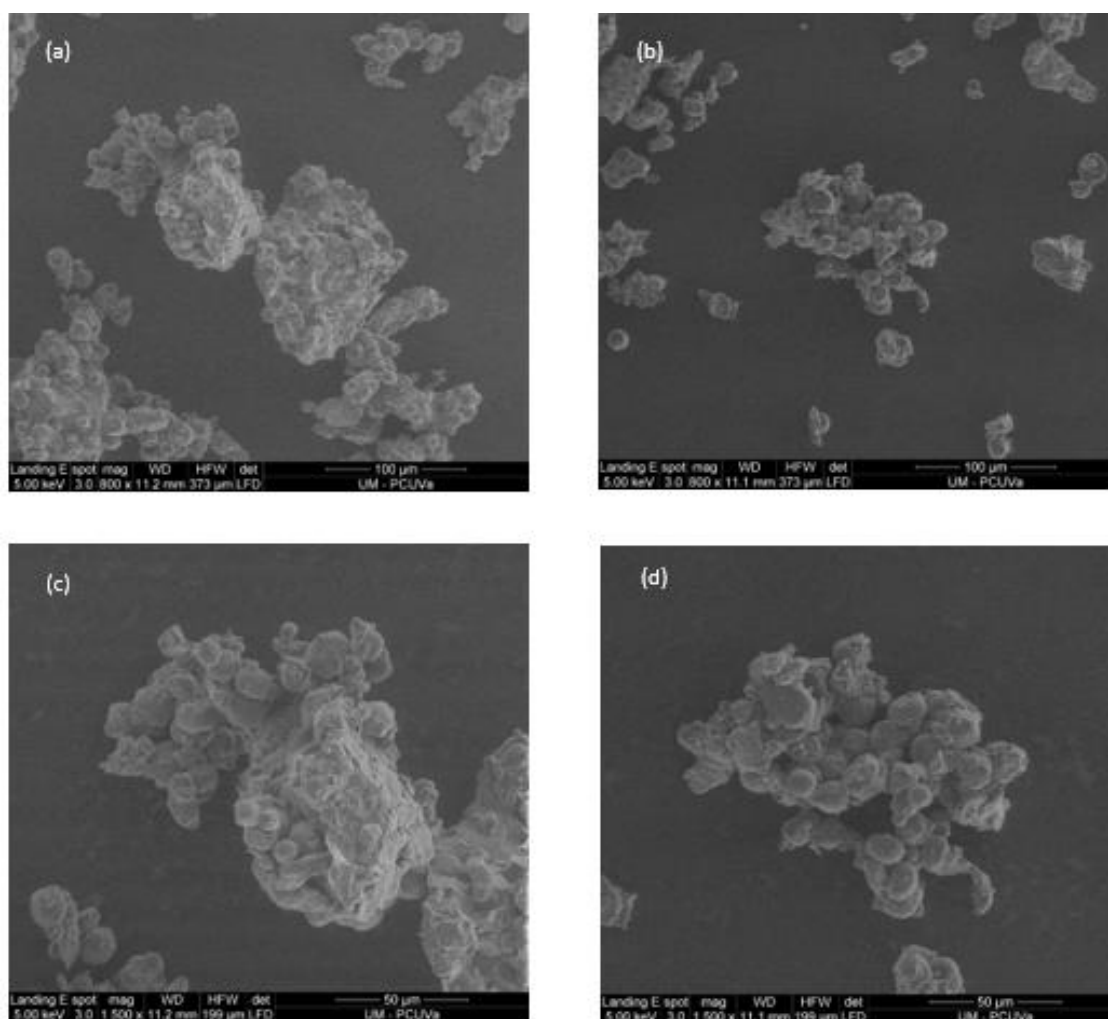
**Tabela 2:** Perfil nutricional e valor energético das farinhas de sorgo germinado e *in natura* (Média±DP).

	Sorgo germinado	Sorgo <i>in natura</i>	<i>p</i> -value*
<b>Perfil nutricional (g/100g ps)</b>			
Humidade	$10,79 \pm 0,01$	$9,505 \pm 0,005$	< 0,001
Cinzas	$1,03 \pm 0,02$	$0,89 \pm 0,02$	< 0,001
Gordura total	$3,018 \pm 0,004$	$4,21 \pm 0,09$	< 0,001
Proteína	$9,03 \pm 0,42$	$5,9 \pm 0,1$	< 0,001
Fibras dietéticas totais	$13,602 \pm 0,58$	$14,9 \pm 0,2$	< 0,001
Hidrato de carbono	$73,315 \pm 0,985$	$74,09 \pm 0,46$	0,005
<b>Valor energético (kcal/100g ps)</b>	$384 \pm 1$	$417,5 \pm 0,4$	<0,001

ps – peso seco. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP). \* - Teste *t*-student.

Apesar das farinhas de sorgo *in natura* e germinado não apresentarem diferenças significativas no teor hidratos de carbono, o processo de germinação provocou diversas mudanças bioquímicas como se pode verificar na micrografia eletrónica de varrimento ilustrada na **Figura 16**. É possível verificar que a germinação alterou a superfície dos grânulos de amido, fracionando em pedaços menores com aumento de poros na superfície dos grânulos (**Figura 16A e C**), características que não estão presentes nos grânulos de

amido dos grãos de sorgo *in natura* (**Figura 16B e D**). As alterações na superfície e aumento dos poros, que ficam evidentes nas micrografias do sorgo durante a germinação, podem estar relacionadas à degradação das moléculas de amilopectina por enzimas, onde degradaram-se em oligossacarídeos que poderiam ser utilizados como fonte de energia para o crescimento da planta (Jribi et al., 2019).



**Figura 16:** Micrografias eletrônicas de varrimento da farinha de sorgo *in natura* e germinado; (a): Amostra nativa (800×), (b): Amostra germinada (800×); (c): Amostra *in natura* (1500×); (d) Amostra germinada (1500×). (Autoria própria, 2023).

O ataque enzimático dos grânulos de amido pode ser atribuído à proporção de amilose e amilopectina, que influencia fortemente a mudança na morfologia dos grânulos de amido durante a germinação (Marchini et al., 2021). O amido de sorgo apresenta maiores proporções de cadeias curtas da amilopectina, que podem resultar numa estrutura

granular mais porosa, que são mais susceptíveis ao ataque enzimático do que os amidos normais (Li et al., 2017).

### 3.1.2.2. Composição química das farinhas obtidas

Os resultados relativos aos açúcares livres e ácidos orgânicos das farinhas de sorgo *in natura* e germinado encontra-se descritos na **Tabela 3**. Relativamente aos açúcares, foram identificados e quantificados apenas os açúcares glucose e sacarose, sendo que na farinha de sorgo *in natura* não foi possível a identificação da glucose. O teor de sacarose não se alterou significativamente com a germinação do grão, o qual permaneceu nas quantidades de 0,75 gramas por cada 100 gramas de peso seco para as duas farinhas. Com a identificação da glucose após a germinação, o teor de açúcares livres totais foi de  $0,82 \pm 0,04$  g/100g ps e  $1,49 \pm 0,04$  g/100 g ps, para as farinhas de sorgo *in natura* e germinado, respectivamente.

**Tabela 3:** Composição química em relação aos açúcares livres, ácidos orgânicos, tocoferóis e ácidos gordos das farinhas de sorgo germinado e *in natura* (Média±DP).

	Sorgo germinado	Sorgo <i>in natura</i>	<i>p</i> -value*
<b>Açúcares livres (g/100 g ps)</b>			
Glucose	$0,64 \pm 0,01^a$	<b>nd</b>	< 0,001
Sacarose	$0,84 \pm 0,03^a$	$0,82 \pm 0,04^b$	0,094
<b>Total</b>	<b><math>1,49 \pm 0,04^a</math></b>	<b><math>0,82 \pm 0,04^b</math></b>	< 0,001
<b>Ácidos orgânicos (g/100 g ps)</b>			
Ácido oxálico	<b>vg</b>	<b>vg</b>	< 0,001
Ácido málico	$1,49 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$	< 0,001
Ácido cítrico	$0,26 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,01$	< 0,001
Ácido succínio	<b>nd</b>	<b>vg</b>	< 0,001
Ácido fumárico	<b>vg</b>	$0,67 \pm 0,01$	< 0,001
<b>Total</b>	<b><math>1,75 \pm 0,01</math></b>	<b><math>0,99 \pm 0,01</math></b>	< 0,001

nd – não detetado. vg – vestígio. ps – peso seco. Resultados expressos em média ± desvio padrão (DP). \* - Teste *t*-student.

Os açúcares das plantas são uma forma de energia para o processo germinativo do grão, portanto, na germinação ocorre a ativação das enzimas amilolíticas, as quais hidrolisam a parte mais externa dos grânulos de amido, e formam açúcares de menor peso

molecular, que são utilizados pelos rebentos como fontes de energia para promover o seu crescimento (S. Liu et al., 2022). O aumento de açúcares totais foi também observado na germinação de trigo sarraceno e variedades de quinoa, salientando que apenas após 12 h de germinação houve alterações significativas (He et al., 2022; Zhang et al., 2015).

Relativamente aos ácidos orgânicos, foram identificados e quantificados no total cinco ácidos orgânicos, sendo eles os ácidos oxálico, málico, cítrico, succínio e fumárico. Na farinha de sorgo germinado observou-se um aumento no teor de ácidos orgânicos totais ( $1,75 \pm 0,01$  g/100 g ps), sendo o ácido málico o principal responsável por esse aumento, o qual foi de  $0,11 \pm 0,01$  g/100 g ps e  $1,49 \pm 0,01$  g/100 g ps na farinha de sorgo *in natura* e germinado, respetivamente. Por outro lado, a germinação diminuiu drasticamente o valor de ácido fumárico, apresentando apenas vestígios na farinha de sorgo germinado, sendo que na farinha de sorgo *in natura* o valor foi de  $0,67 \pm 0,01$  g/100 g ps. Os ácidos orgânicos são sintetizados nas plantas como resultado da oxidação incompleta dos produtos fotossintéticos, no caso da germinação são sintetizados no ciclo do glicoxilato (Igamberdiev & Eprintsev, 2016). Os ácidos orgânicos, além de intervirem na síntese de aminoácidos em cereais durante a germinação, também ajudam a acidificar o endosperma, com a finalidade de auxiliar no processo de degradação do amido, utilizado posteriormente como fonte de energia (Beltrão & Oliveira, 2007; Ma et al., 2016).

Em estudos sobre a concentração de ácidos orgânicos em sementes de cevada durante a germinação, foi observado que o ácido málico foi mais abundante durante os três primeiros dias de germinação, seguido do citrato, diminuindo, para além disso a concentração de ácido fumaríco (Ma et al., 2016), o que está de acordo com o observado no presente estudo. O ácido málico é o ácido orgânico mais encontrado em tecidos vegetais, o qual cumpre muitas funções no metabolismo vegetal, como a fotossíntese, a manutenção do pH interno e o transporte e troca de equivalentes redutores entre os compartimentos celulares (Igamberdiev & Eprintsev, 2016). Por sua vez, os ácidos málico e cítrico, que estão presentes na farinha de sorgo germinado, são amplamente utilizados na indústria alimentar, embora o ácido cítrico ainda seja mais utilizado como acidificante devido ao sabor frutado pronunciado, baixo preço e alta disponibilidade. Em contrapartida, o ácido málico confere sabor suave, capaz até de mascarar os sabores dos adoçantes artificiais. Em produtos de panificação, ambos auxiliam no sabor, textura e vida útil do produto (Marques et al., 2020).

Na **Tabela 4** estão descritos os resultados relativos à composição em ácidos gordos e tocoferóis das farinhas de sorgo *in natura* e germinado. Pode-se observar que, foram identificados na totalidade 20 ácidos gordos para a farinha de sorgo *in natura* e germinado, sendo que uma das principais observações sobre o grupo dos ácidos gordos, é que o processo germinativo diminuiu significativamente o teor dos ácidos gordos saturados (SFA) e monoinsaturados (MUFA) mas que, por outro lado, aumentou a concentração de ácidos gordos polinsaturados (PUFA). Os ácidos palmítico, oleíco e linoleico foram os ácidos gordos maioritários encontrados em ambas as farinhas.

O processo de germinação diminuiu em torno de 14% a percentagem dos ácidos palmítico e eláidico, no entanto, houve um aumento significativo de aproximadamente 36% de ácido linoleico. A mudança no perfil de ácidos gordos no processo germinativo foi também observada em estudos da germinação de sementes de linhaça, indicando que a germinação aumentou a proporção de ácidos gordos insaturados na linhaça (Li et al., 2019). Os ácidos gordos armazenados nos lipídios dos grãos contêm elevadas concentrações de enzimas do ciclo do glioxalato, que permite a conversão de ácidos gordos armazenados em hidratos de carbono durante a germinação (Beltrão & Oliveira, 2007).

O tocoferól, também conhecido como vitamina E, é um antioxidante encontrado naturalmente em muitos alimentos à base de plantas (Pinheiro et al., 2021). As duas farinhas de sorgo estudadas apresentaram  $\alpha$ -tocoferól e  $\gamma$ -tocoferol, no entanto a farinha de sorgo germinada apresentou menor concentração de tocoferol, sobretudo no teor do  $\gamma$ -tocoferól, que diminuiu para  $0,234 \pm 0,003$  g/100 g ps.

Em estudos sobre a prevalência de tocoferóis em 97 genótipos de sorgo, foi observado que o perfil de tocoferol é tão variável quanto a sua grande variabilidade genética (Pinheiro et al., 2021). Os mecanismos envolvidos na alteração da concentração e perfil de vitamina E no sorgo germinado ainda são pouco compreendidos. Em estudos sobre a estabilidade das vitaminas durante a germinação do sorgo, foi observado que a germinação reduziu a concentração total de tocoferol, principalmente o  $\gamma$ -tocoferol, porém aumentou  $\beta$ -tocoferol, é possível que alguns de seus compostos tenham sido utilizados, visando suprir as necessidades de nutrientes durante o desenvolvimento do grão (Pinheiro et al., 2021).

**Tabela 4:** Composição ácidos e tocoferóis gordos da farinha de sorgo *in natura* e germinado (média ± DP).

Percentagem relativa (%)	Sorgo germinado	Sorgo <i>in natura</i>	p-value*
Ácido caprílico (C8:0)	0,082 ± 0,001	0,47 ± 0,02	< 0,001
Ácido cáprico (C10:0)	0,033 ± 0,001	nd	< 0,001
Ácido undecanoico (C11:0)	0,066 ± 0,001	0,66 ± 0,03	< 0,001
Ácido láurico (C12:0)	0,063 ± 0,001	0,208 ± 0,005	< 0,001
Ácido tridecanoico (C13:0)	0,084 ± 0,004	nd	< 0,001
Ácido mirístico (C14:0)	0,101 ± 0,002	0,158 ± 0,002	< 0,001
Ácido pentadecanoico (C15:0)	0,061 ± 0,001	nd	< 0,001
Ácido cis-10-pentadecanoico (C15:1)	0,054 ± 0,001	1,21 ± 0,01	< 0,001
Ácido palmítico (C16:0)	14,35 ± 0,11	28,019 ± 0,008	< 0,001
Ácido palmitoleico (C16:1)	0,397 ± 0,007	0,431 ± 0,006	< 0,001
Ácido heptadecanoico (C17:0)	0,206 ± 0,008	5,627 ± 0,005	< 0,001
Ácido esteárico (C18:0)	1,533 ± 0,002	3,742 ± 0,008	< 0,001
Ácido oleico (C18:1n9c)	36,99 ± 0,05	50,38 ± 0,01	< 0,001
Ácido linolelaídico (C18:2n6t)	0,041 ± 0,001	nd	< 0,001
Ácido linoleico (C18:2n6c)	41,907 ± 0,037	5,159 ± 0,002	< 0,001
Ácido α-linolênico (C18:3n3)	1,709 ± 0,006	0,145 ± 0,001	< 0,001
Ácido araquídico (C20:0)	0,222 ± 0,006	1,034 ± 0,005	< 0,001
Ácido cis-11-eicosenoico (C20:1)	0,441 ± 0,003	0,282 ± 0,001	< 0,001
Ácido cis-11,14-eicosadienoico (C20:2)	0,765 ± 0,007	nd	< 0,001
Ácido heneicosanoico (C21:0)	nd	0,282 ± 0,001	< 0,001
Ácido araquidônico (C20:4n6)	0,091 ± 0,001	0,78 ± 0,01	< 0,001
Ácido beénico (C22:0)	0,228 ± 0,004	0,32 ± 0,01	< 0,001
Ácido cis-11,14,17-eicosatrienoico (C20:3n3)	nd	0,211 ± 0,005	< 0,001
Ácido cis-13,16-docosadienoico (C22:2)	0,117 ± 0,004	0,356 ± 0,002	< 0,001
Ácido tricosanoico (C23:0)	0,219 ± 0,001	0,271 ± 0,002	< 0,001
Ácido lignocérico (C24:0)	0,249 ± 0,001	nd	< 0,001
<b>SFA</b>	<b>17,5 ± 0,1</b>	<b>40,518 ± 0,008</b>	< 0,001
<b>MUFA</b>	<b>37,89 ± 0,06</b>	<b>52,83 ± 0,01</b>	< 0,001
<b>PUFA</b>	<b>44,62 ± 0,05</b>	<b>6,65 ± 0,01</b>	< 0,001
<b>Tocoferóis (g/100 g ps)</b>			
α-Tocoferol	0,142 ± 0,005	0,127 ± 0,001	< 0,001
γ-Tocoferol	0,234 ± 0,003	0,72 ± 0,01	< 0,001
<b>Total</b>	<b>0,376 ± 0,003</b>	<b>0,85 ± 0,01</b>	< 0,001

ps – peso seco; SFA – *saturated fatty acids* (ácidos gordos saturados); MUFA – *monounsaturated fatty acids* (ácidos gordos monoinsaturados); PUFA - *Polyunsaturated fatty acids* (ácidos gordos polinsaturados). Resultados expressos em média ± desvio padrão (DP). \* - Teste *t*-student.

Finalmente, o último grande grupo de compostos a ser caracterizado nas amostras de sorgo *in natura* e germinado, mais propriamente nos seus extratos hidroetanólicos, foram os compostos fenólicos. Os dados cromatográficos (tempo de retenção – Tr,  $\lambda_{\text{máx}}$  na região do visível,  $\lambda_{\text{máx}}$  não desprotonado e principais fragmentos MS<sup>2</sup>), tentativa de identificação e quantificação (mg/g de extrato) obtidos por HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> estão descritos na **Tabela 5**. Nas amostras de sorgo estudadas, foram tentativamente identificados 21 compostos fenólicos, dos quais 5 ácidos fenólicos, 7 dímeros Pirano-flavanona-flavanols, 4 flavonas C-glicosiladas, 3 flavanonas e 2 flavonols. O perfil em compostos fenólicos coincide com o anteriormente publicado por outros autores, pelo que a tentativa de identificação dos picos baseou-se na comparação com os dados da bibliografia (Ironi et al., 2019; Pontieri et al., 2021; Wu et al., 2017a; Wu et al., 2017b; Xiong et al., 2021; Xu et al., 2021).

O perfil de ambas as amostras, em termos qualitativos, é bastante semelhante, à exceção da ausência de ácido protocatecuico nos grãos de sorgo *in natura*. Em termos quantitativos, é na amostra de sorgo *in natura* que se encontra uma maior concentração de fenóis totais ( $15,53 \pm 0,01$  mg/g extracto), sobretudo devido à presença de compostos do tipo flavanona, especificamente derivados O-glicosilados de naringenina que representam 30% dos compostos fenólicos totais desta amostra, precedido pelos derivados C-glicosilados de apigenina, que representam 20%. Relativamente à amostra de sorgo germinado, obtiveram-se valores de compostos fenólicos totais quatro vezes mais baixos de que nas amostras *in natura* ( $3,72 \pm 0,02$  mg/g extracto). Nas amostras de sorgo germinado, os compostos fenólicos maioritários são ácidos fenólicos, do qual o cafeoilglicerol se destaca.

A composição dos compostos fenólicos em plantas e cereais varia em função do seu genótipo, e estudos anteriores demonstram que os genótipos castanho e preto têm, naturalmente, concentrações mais elevadas de compostos fenólicos do que os genótipos de sorgo vermelho e branco (Xiong et al., 2021).

**Tabela 5:** Tempo de retenção (Tr), comprimentos de onda da absorção máxima na região do ultravioleta ( $\lambda_{\text{max}}$ ), dados de espectro de massa, tentativa de identificação e quantificação (mg/g extrato) dos compostos fenólicos presentes nos extratos hidroetanólicos das farinhas de sorgo germinado e *in natura*.

Pico	Tr (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Identificação tentativa	Quantificação (mg/g extrato)	
						Sorgo <i>in natura</i>	Sorgo germinado
1	5.36	253	153	109(100)	Ácido protocatecuico	nd	0,35 ± 0,01
2	7.42	324	415	253(100),179(34),161(46),135(5)	1- <i>O</i> -Cafeoil-2- <i>O</i> -glucosilglicerol	0,782 ± 0,003	0,314 ± 0,001
3	7.83	319	253	179(12),161(5), 135(100)	<i>O</i> -Cafeoilglicerol	0,64 ± 0,02	0,234 ± 0,002
4	9.92	325	253	179(39),161(42),135(100)	<i>O</i> -Cafeoilglicerol	2,21 ± 0,02	0,846 ± 0,005
5	10.47	323	179	135(100)	Ácido cafeico	0,29 ± 0,02	0,047 ± 0,004
6	11.38	320	449	287(100),269(5)	Hexósido de dihidrokaemperol	0,417 ± 0,0001	0,3984 ± 0,0005
7	12.8	321	449	287(100),269(5)	Hexósido de dihidrokaemperol	0,513 ± 0,002	0,3794 ± 0,004
8	13.46	327	563	545(66), 503(86), 473(100), 443(69), 383(88), 353(40)	Apigenina- <i>C</i> -pentosil- <i>C</i> - hexósido	0,169 ± 0,002	0,0138 ± 0,003
9	13.72	323	563	545(50), 503(76), 473(79), 443(100), 383(12), 353(50)	Apigenina- <i>C</i> -pentosil- <i>C</i> - hexósido	1,62 ± 0,001	0,29 ± 0,01
10	13.96	334	563	545(12), 503(14), 473(67), 443(100), 383(37), 353(32)	Apigenina- <i>C</i> -pentosil- <i>C</i> - hexósido	1,44 ± 0,01	0,27 ± 0,01
11	14.27	285	883	721(34), 595(100), 567(13), 433(52), 405(10), 287(10)	Pirano-3',4',5',5,7-pentahidroxiflavanona-(3 → 4)-catequina-7- <i>O</i> -glucósido	0,68 ± 0,01	0,18 ± 0,003
12	15.26	274/331	563	545(17), 503(11), 473(100), 443(47), 413(11) 383(33), 353(25), 311(4)	Apigenina- <i>C</i> -pentosil- <i>C</i> - hexósido	0,0706 ± 0,0001	vg
13	15.97	284	433	271(100)	Naringenina- <i>O</i> -hexósido	1,686 ± 0,003	0,024 ± 0,003
14	16.53	284	851	689(28),563(100),551(55),401(89),389(5)	Pirano-naringenina-(3 → 4)-catequina-7- <i>O</i> -glucósido I	0,16 ± 0,01	0,063 ± 0,001

15	16.83	286	867	705(100), 579(52), 449(12), 417(34), 287(10)	Pirano-eriodictiol-(3 → 4)-catequina-7-O-glucósido I	0,78 ± 0,02	0,067 ± 0,002
16	17.06	283	433	271(100)	Naringenina-O-hexósido	2,8122 ± 0,0003	vg
17	17.75	285	867	705(100), 579(32), 525(5), 449(32), 417(62), 287(26)	Pirano-eriodictiol-(3 → 4)-catequina-7-O-glucósido II	0,15 ± 0,002	0,055 ± 0,0003
18	18.18	287	867	705(100), 579(43), 525(5), 449(29), 417(49), 287(5)	Pirano-eriodictiol-(3 → 4)-catequina-7-O-glucósido III	0,267 ± 0,004	0,102 ± 0,003
19	18.43	284	579	417(50), 271(100)	Naringenina-O-hexosil-deoxihexósido	0,213 ± 0,002	vg
20	20.78	285	851	689(28),563(100),551(55),401(89),389(5)	Pirano-naringenina-(3 → 4)-catequina-7-O-glucósido II	0,64 ± 0,02	0,052 ± 0,001
21	21.27	285	851	689(34),563(100),551(46),401(92),389(6)	Pirano-naringenina-(3 → 4)-catequina-7-O-glucósido III	0,146 ± 0,003	0,0373 ± 0,0004
<b>Ácidos fenólicos</b>						<b>3,93 ± 0,02</b>	<b>1,79 ± 0,01</b>
<b>Flavonoles</b>						<b>0,93 ± 0,002</b>	<b>0,7777 ± 0,0004</b>
<b>Flavonas C-glicosiladas</b>						<b>3,14 ± 0,01</b>	<b>0,5744 ± 0,0002</b>
<b>Flavanonas</b>						<b>4,711 ± 0,001</b>	<b>0,024 ± 0,003</b>
<b>Dímeros Pirano-flavanona-flavanols</b>						<b>2,82 ± 0,02</b>	<b>0,557 ± 0,004</b>
<b>Total compostos fenólicos</b>						<b>15,53 ± 0,01</b>	<b>3,72 ± 0,02</b>

nd – não detectado; vg – quantidades vestigiais. Curvas de calibração usadas para quantificação: Ácido cafeico ( $y = 388345x + 406369$ , LD=0,78 µg/mL; LQ=1.97 µg/mL, pico 5); ácido clorogénico ( $y = 168823x - 161172$ , LD = 0,20 µg/mL; LQ = 0,68 µg/mL, picos 2, 3 e 4); ácido protocatecuico ( $y = 214168x + 27102$ ,  $R^2 = 0.9999$ ; LD = 0.14 µg/mL; LQ = 0.52 µg/mL, pico 1); apigenina-6-C-glucósido ( $y = 197337x + 30036$ , LD = 0.19 µg/mL; LQ = 0.63 µg/mL, picos 8, 9, 10 e 12); (-)-catequina ( $y = 84,950x - 23,200$ ,  $R^2 = 0.999$ , LD = 0.17 µg/mL; LQ = 0.68 µg/mL, picos 11, 14, 15, 17, 18, 20 e 21); naringenina ( $y = 18433x + 78903$ , LD = 0.17 µg/mL; LQ = 0.81 µg/mL, picos 13, 16, e 19); e quercetina-3-O-glucósido ( $y = 34843x - 160173$ , LD = 0.21 µg/mL; LQ = 0.71 µg/mL, picos 6 e 7). Todas os picos mostraram um valor de  $p < 0,001$  para o teste *t*-student.

Para além do fator genético dos grãos de sorgo afetarem a composição fenólica, outros estudos demonstram que a irrigação deficitária afeta significativamente a concentração deste tipo de compostos fenólicos e a sua antioxidante atividade (Wu et al., 2017).

Estudos efetuados com arroz, trigo sarraceno e linhaça, demonstraram um incremento dos compostos fenólicos após germinação (Cáceres et al., 2014; Li et al., 2019; Zhang et al., 2015). Este aumento de compostos fenólicos pode ser explicado pelo fato de que a germinação induzir à síntese enzimática da via fenilpropanóide e hidrólise de polissacarídeos da parede celular que causam a liberação de fenólicos ligados à parede celular (Cáceres et al., 2014). No entanto, no presente trabalho, não foi observada essa tendência, pelo que estudos posteriores serão necessários para averiguar esta incongruência. Uma hipótese para estes resultados poderá estar no facto, de muitos destes compostos fenólicos serem altamente glicosilados e, que, durante a germinação, a ligação glicosídica seja quebrada para fornecimento de açúcar ao sistema a germinar.

### 3.1.3. Propriedades bioativas das farinhas de sorgo *in natura* e germinado

Os resultados da atividade antioxidante, citotóxica, hepatotóxica, nefrotóxica e anti-inflamatória dos extratos hidroetanólicos das farinhas de sorgo *in natura* e germinado estão descritos na **Tabela 6**.

A atividade antioxidante das farinhas de sorgo *in natura* e germinado foi avaliada através dos métodos de inibição da peroxidação lipídica em tecidos cerebrais de porco através da formação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e inibição da hemólise oxidativa em eritrócitos isolados do sangue de ovelha (OxHLIA). Os resultados foram expressos em termos de IC<sub>50</sub> (valor que representa a concentração de uma amostra que fornece 50% de atividade antioxidante) e estão apresentados na **Tabela 6**. Assim, quanto menor a concentração de IC<sub>50</sub>, maior a capacidade de inibição da formação de TBARS e maior a ação anti-hemolítica das amostras. Para o ensaio de TBARS a amostra de farinha de sorgo *in natura* apresentou valor IC<sub>50</sub> de 10,4 ± 0,9 µg/mL, sendo superior ao trolox (3,7 ± 0,5 µg/mL), utilizado como controlo positivo. Já para os ensaios de OxHLIA, as duas farinhas estudadas não apresentaram capacidade anti-hemolítica.

Embora existam trabalhos descritos na literatura que relatam que a farinha de sorgo *in natura* possui atividade antioxidante em outros tipos de ensaios *in vitro*, como por exemplo através do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico sal de diamônio (ABTS) e por meio da redução de ferro (FRAP) (Xiong et al., 2021). Estudos sobre a capacidade antioxidante de seis genótipos de sorgo, demonstraram que a atividade antioxidante está relacionada principalmente com a concentração fenólica, sendo que as variedades castanha e preta do sorgo (com altas concentrações de fenólicos totais, e ricos em 3-desoxiantocianidinas e taninos condensados) apresentam um atividade antioxidante superior que as variedades vermelha e branca do sorgo (Xiong et al., 2019).

**Tabela 6:** Atividade antioxidante, citotóxica, hepatotóxica, nefrotóxica e anti-inflamatória dos extratos hidroetanólicos das farinhas de sorgo *in natura* e germinado (média  $\pm$  DP).

	Sorgo germinado	Sorgo <i>in natura</i>	Controlo positivo
<i>Antioxidante IC<sub>50</sub> (μg/mL)</i>			<i>Trolox</i>
OxHLIA $\Delta t = 60$	sa	sa	21,8 $\pm$ 0,2
TBARS*	1,9 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	10,4 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	3,7 $\pm$ 0,5
<i>Citotoxicidade GI<sub>50</sub> (μg/mL)</i>			<i>Elipticina</i>
AGS	>400	>400	1,23 $\pm$ 0,03
CaCo2	>400	>400	1,21 $\pm$ 0,02
MCF7	>400	>400	1,02 $\pm$ 0,02
NCI-H460	>400	>400	1,01 $\pm$ 0,01
<i>Hepatotoxicidade e nefrotoxicidade GI<sub>50</sub> (μg/mL)</i>			<i>Elipticina</i>
PLP2	>400	>400	1,4 $\pm$ 0,1
VERO	>400	>400	1,4 $\pm$ 0,1
<i>Anti-inflamatória IC<sub>50</sub> (μg/mL)</i>			<i>Dexametasona</i>
RAW 264,7	>400	>400	6,3 $\pm$ 0,4

sa – sem atividade. Os valores de IC<sub>50</sub> correspondem à concentração do extrato que atinge 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorbância na redução do ensaio de potência. Os resultados de citotoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade foram expressos em valores de GI<sub>50</sub>: correspondendo a concentração de amostra necessária para realizar a inibição do crescimento em 50% sob células tumorais humanas ou em cultura primária de células de fígado de porco (PLP2) e rim de macaco (VERO). \* - Teste *t*-student.

A atividade antioxidante do sorgo germinado (1,9  $\pm$  0,4 μg/mL, TBARS), foi quase duas vezes superior à do controlo positivo utilizado (trolox, 3,7  $\pm$  0,5 μg/mL). Em estudos sobre a atividade antioxidante *in vitro* de arroz integral e trigo serraceno

germinados, observou-se também uma maior capacidade antioxidante, pois as enzimas hidrolíticas podem libertar compostos fenólicos livres com atividade antioxidante mais efetiva (Zhang et al., 2015). Para além disso, a germinação a alta temperatura (42 °C) induz várias enzimas de eliminação de radicais, como superóxido dismutases, glutathione S-transferases, catalases, peroxidases e enzimas no ciclo ascorbato-glutathione que mantêm um equilíbrio da homeostase redox (Cáceres et al., 2014).

Em relação às atividades hepatotóxicas, nefrotóxicas e anti-inflamatória dos extratos hidroetanólicos das farinhas de sorgo *in natura* e germinado, estas não apresentaram qualquer atividade até à máxima concentração testada (400 µg/mL). Apesar de não terem uma atividade a nível celular potencial para novos estudos, os resultados obtidos permitem-nos concluir que as farinhas não são tóxicas para linhas celulares normais e que, por isso podem ser usadas para alimentação humana, sem riscos para a saúde do consumidor.

## **3.2. Caracterização dos produtos de panificação desenvolvidos**

### *3.2.1. Parâmetros físicos dos produtos de panificação desenvolvidos*

A utilização de farinhas sem glúten no desenvolvimento de pães é tecnologicamente difícil, pois as suas proteínas não possuem as propriedades viscoelásticas tipicamente encontradas no glúten (Balakireva & Zamyatnin, 2016). Consequentemente, as massas sem glúten carecem da capacidade de reter gás e produzir um produto assado leve (Carini et al., 2015). Os resultados das análises dos parâmetros físicos e coloração dos pães estão apresentados na **Tabela 7**.

Os pães produzidos com 100% de farinha de sorgo germinado (PSG), 100% de farinha de sorgo *in natura* (PSIN), pão controlo positivo com mistura de farinhas sem glúten (PCP) e pão controlo negativo com 100% de farinha de trigo (PCN), estão apresentados na **Figura 17**.

**Tabela 7:** Propriedades físicas e parâmetro de cor dos pães formulados (média ± DP).

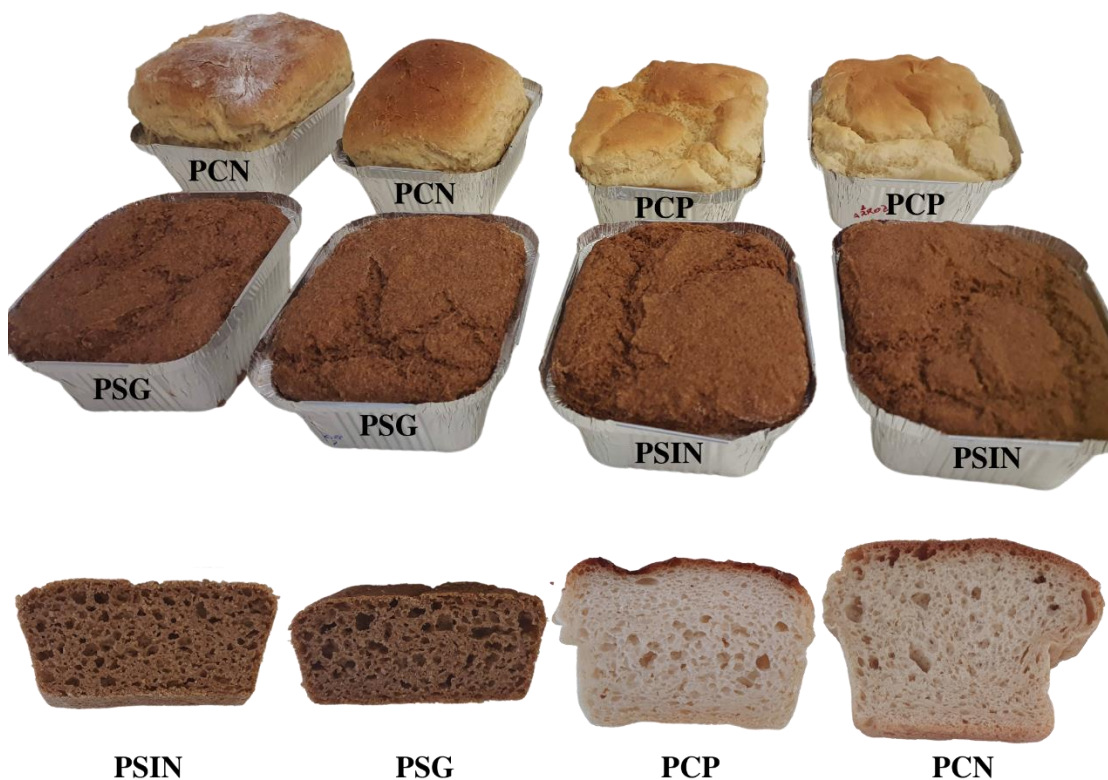
		PSIN	PSG	PCP	PCN
<b>Propriedades físicas</b>					
Perda de peso (%)		14,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	13,1 ± 0,7 <sup>b</sup>	4,85 ± 0,07 <sup>d</sup>	8,2 ± 0,1 <sup>c</sup>
Humidade (g/100 g pf)		36,6 ± 0,6 <sup>b</sup>	37 ± 1 <sup>a</sup>	33,78 ± 1,0 <sup>d</sup>	35,12 ± 1,15 <sup>c</sup>
Volume (mL)		602 ± 6 <sup>c</sup>	562 ± 18 <sup>d</sup>	706 ± 44 <sup>b</sup>	968 ± 43 <sup>a</sup>
Volume específico (g/mL)		1,82 ± 0,02 <sup>c</sup>	1,71 ± 0,09 <sup>d</sup>	2,31 ± 0,02 <sup>b</sup>	2,45 ± 0,01 <sup>a</sup>
Wa		0,972 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,975 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,942 ± 0,009 <sup>b</sup>	0,9439 ± 0,0003 <sup>b</sup>
<b>Parâmetros de cor</b>					
L*	Crosta	53,5 ± 0,6 <sup>b</sup>	51,8 ± 0,5 <sup>c</sup>	58 ± 2 <sup>a</sup>	52,8 ± 0,6 <sup>c</sup>
	Miolo	51,5 ± 0,4 <sup>c</sup>	49,2 ± 0,1 <sup>d</sup>	71,8 ± 0,4 <sup>a</sup>	67,8 ± 0,8 <sup>b</sup>
a*	Crosta	8,7 ± 0,3 <sup>c</sup>	8,5 ± 0,2 <sup>c</sup>	14,6 ± 0,4 <sup>a</sup>	12,1 ± 0,7 <sup>b</sup>
	Miolo	7,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	7,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	-0,92 ± 0,02 <sup>b</sup>	-1,79 ± 0,06 <sup>b</sup>
b*	Crosta	23 ± 1 <sup>c</sup>	20,6 ± 0,4 <sup>d</sup>	34,8 ± 0,5 <sup>b</sup>	37,7 ± 0,3 <sup>a</sup>
	Miolo	21 ± 1 <sup>a</sup>	19,1 ± 0,4 <sup>b</sup>	18,7 ± 0,2 <sup>b</sup>	11,8 ± 0,4 <sup>c</sup>

Resultados expressos em média ± desvio padrão (DP). ANOVA - Letras distintas na mesma linha correspondem a diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Todos os processos pertencentes à panificação são dependentes ou estão diretamente relacionados a reações químicas. Após o processo de fermentação que está diretamente ligado ao resultado final do pão, tem-se o processo de assamento dos pães, onde ocorrem diversas reações e modificações (Galves, 2014). No forno, o volume do pão aumenta devido à produção contínua de dióxido de carbono resultante do processo fermentativo. Com o aumento da temperatura na massa, o amido começa a gelatinizar e ocorre desnaturação enzimática e morte celular das leveduras (Silva, 2016). Por volta dos 100 °C os líquidos livres que ainda estão presentes na massa começam a evaporar, e assim, ocorre a perda de peso da massa (Galves, 2014). Em relação a perda de peso após a cocção, todos os pães estudados apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). O PSIN foi o que apresentou maior perda de peso após a cocção da massa (14,7 ± 0,4 %), seguido do PSG (13,1 ± 0,7 %), sendo o PCP foi o que apresentou menor perda de peso após cocção (4,85 ± 0,07%).

A humidade dos pães elaborados com farinha de sorgo (PSIN e PSG) não apresentaram diferenças significativa entre si, obtendo valores de 36,66 ± 0,66 g/100 g e 37 ± 1 g/100 g para o PSIN e PSG, respetivamente. Em relação ao PCP e PCN apresentaram menores teores de humidade, sendo de 33 ± 1 g/100 g e 35 ± 1 g/100 g,

respetivamente. Os pães de sorgo apresentaram assim maior perda de humidade, comparados com os pães controlo negativo e positivo, após cozedura.



**Figura 17:** Pães e fatias com suas respectivos códigos de cada formulação; PSIN: Pão com farinha de sorgo *in natura*; PSG: Pão com farinha de sorgo germinado; PCP: Pão controlo positivo (mix de farinhas sem glúten); PCN: Pão controlo negativo (trigo). (Autoria própria, 2023).

Os pães elaborados com farinha de sorgo também obtiveram maiores teores de atividade de água, apresentando valores de  $0,972 \pm 0,001$  g/100 g e  $0,986 \pm 0,003$  g/100 g, para o PSIN e PSG, respetivamente. Nos alimentos, quando a atividade de água é superior a 0,8, designa-se que se encontram na fase de alta humidade, onde ocorre o aumento da mobilidade molecular da água e de outros constituintes dos alimentos, favorecendo o aumento nas taxas de reações químicas indesejáveis e o crescimento microbiano, e, portanto, os alimentos são instáveis quimicamente e susceptíveis ao desenvolvimento da carga microbiana no produto (Damodaran & Parkin, 2019).

Todos os pães apresentaram diferenças significativas em relação ao volume e o volume específico dos pães. O PCN, elaborado com farinha de trigo apresentou maior

volume  $2,45 \pm 0,01$  g/100 g e o PSG apresentou menor volume ( $1,71 \pm 0,09$  g/100 g), podendo ser devido ao mais alto teor de fibras. Embora haja um benefício nutricional na incorporação de fibras dietéticas em produtos sem glúten, há uma limitação da diminuição do volume, pelo facto de que as fibras afetam de forma negativa o aprisionamento dos gases que são produzidos durante a fermentação (Trappey et al., 2015).

A análise dos parâmetros de cor apresentados na **Tabela 7**, nomeadamente  $L^*$  (luminosidade),  $a^*$  e  $b^*$  (coordenadas cromáticas), são de todo relevantes, dado que estão diretamente associados à potencial aceitação de novos produtos por parte dos consumidores. Pode-se verificar que os valores médios da luminosidade  $L^*$  para a crosta dos pães nas amostras PSG e PCN não apresentaram diferenças significativas. O PCP foi o pão que apresentou o maior valor de luminosidade ( $58 \pm 2$ ), o que indica que a cor da crosta é mais clara. Já a amostra PSIN ( $51,8 \pm 0,5$ ) foi a que apresentou o menor valor de  $L^*$ , o que significava que a cor da crosta mais escura, que está relacionada a diferentes reações de Maillard e de caramelização que ocorrem durante a cocção (Olojede et al., 2020).

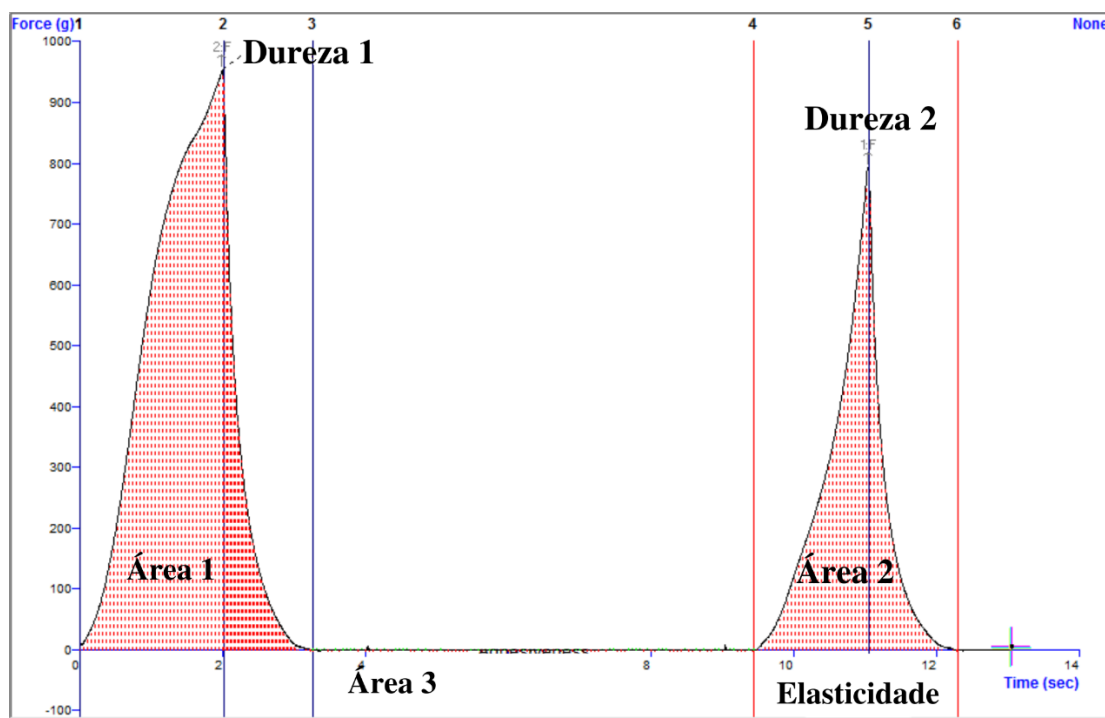
Relativamente à coordenada  $a^*$ , que indica a variação de verde (-60) a vermelho (+60), foi observado que todas as amostras apresentaram valores positivos, sendo indicadores da predominância do vermelho. As amostras PSIN e PSG não apresentaram diferenças significativas nesse parâmetro, com valores de  $8,7 \pm 0,3$  e  $8,5 \pm 0,2$ , respectivamente. Quanto à coordenada  $b^*$ , todas as amostras apresentaram diferenças significativas entre si e valores positivos, indicando uma coloração voltada para o amarelo. A amostra PCN foi a que apresentou maior média,  $37,7 \pm 0,3$ , já a amostra PSG foi a que obteve menor,  $20,6 \pm 0,4$ . Em estudos sobre elaboração e pães de farinha de sorgo sem glúten, (Gava, 2017), foram observados resultados muito semelhantes para o parâmetros de cor  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ .

No que se refere a coloração do miolo, os pães formulados com farinha de sorgo apresentaram menores valores no parâmetro de luminosidade, indicando um miolo mais escuro que os pães controlos negativo e positivo. Em relação ao parâmetro  $a^*$  os pães de sorgo obtiveram valores positivos, indicando a coloração voltada ao vermelho. Por fim, as formulações controlos não obtiveram diferenças significativas quando comparadas entre si, apresentando valores negativos característicos das farinhas utilizadas para a elaboração dos devidos pães. Os pães PSG e PCP, não apresentaram diferenças

significativas no parâmetro  $b^*$ , sendo que a formulação PSIN apresentou maior média,  $21 \pm 1$ , e a formulação PCN menor,  $11,8 \pm 0,4$ .

A textura dos produtos panificados é influenciada por diversas variáveis, incluindo a qualidade das farinhas, quantidade de açúcares, gorduras, proteínas emulsificantes, enzimas, presença de glúten e melhoradores de farinha, assim como, a humidade, temperatura de cozedura, volume do pão e conservação do produto (Trappey et al., 2015).

Para a avaliação da textura instrumental foi aplicado um método que simula a mastigação dos dentes, onde no equipamento as amostras de pão padronizadas, foram comprimidas e descomprimidas duas vezes e se extraiu uma curva força-tempo, como observada na **Figura 18**. A análise foi realizada nas quatro amostras de pão (PSIN, PSG, PCP e PCN), em 1 h e 24 h após a elaboração. Os resultados obtidos estão descritos na **Tabela 8**.



**Figura 18:** Curva de análise de perfil de textura instrumental obtida do teste de pão. (Autoria própria, 2023).

**Tabela 8:** Propriedades físicas instrumental dos pães formulados (média  $\pm$  DP).

		PSIN	PSG	PCP	PCN
Dureza (N)	1 h	7,7 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	8,8 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	2,3 $\pm$ 0,5 <sup>c</sup>	1,21 $\pm$ 0,06 <sup>d</sup>
	24 h	10,7 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	9,7 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	8,53 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>	1,9 $\pm$ 0,2 <sup>d</sup>
Elasticidade*	1 h	0,86 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	0,82 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>	1,3 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	1,8 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
	24 h	0,73 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	0,63 $\pm$ 0,04 <sup>d</sup>	0,91 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	1,03 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
Coesividade*	1 h	0,48 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	0,472 $\pm$ 0,005 <sup>d</sup>	0,85 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,875 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>
	24 h	0,319 $\pm$ 0,007 <sup>c</sup>	0,289 $\pm$ 0,003 <sup>d</sup>	0,46 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,74 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
Mastigabilidade (N)	1 h	3,2 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	3,46 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	2,6 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	1,9 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>
	24 h	2,49 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	1,8 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	3,6 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	1,5 $\pm$ 0,1 <sup>d</sup>
Resiliência*	1 h	0,217 $\pm$ 0,006 <sup>c</sup>	0,215 $\pm$ 0,006 <sup>c</sup>	0,54 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,51 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
	24 h	0,131 $\pm$ 0,002 <sup>c</sup>	0,116 $\pm$ 0,003 <sup>d</sup>	0,22 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,42 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>

\*Termos adimensionais. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP). Letras distintas na mesma linha correspondem a diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Desta forma, foram considerados os parâmetros de dureza, que é definida como a altura do pico de força no primeiro ciclo de compressão (primeira mordida) (BOURNE, 2002). Quanto aos resultados obtidos de dureza, todas as amostras apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), sendo que os pães de sorgo apresentaram maior dureza entre as amostras estudadas ( $7,7 \pm 0,5$  e  $8,8 \pm 0,7$  N) para as amostras de farinha de sorgo *in natura* e germinado, respectivamente. Num estudo sobre a utilização de farinhas de cinco híbridos de sorgo na panificação, os pães isentos de glúten apresentaram valores de dureza que variaram de  $5,38 \pm 0,45$  e  $18,96 \pm 1,92$  N, posto isto, os pães elaborados neste trabalho apresentaram valores semelhantes (Oliveira et al., 2022). Outro parâmetro estudado foi a elasticidade, que é definida como a distância em que os alimentos recuperam a sua altura durante o tempo entre o final da primeira mordida e a segunda, ou seja, a taxa em que o alimento deformado reverte ao estado não deformado (BOURNE, 2002). Neste parâmetro, os pães elaborados com farinha de sorgo não diferiram significativamente entre eles, no entanto, apresentaram menor elasticidade que os pães controlos positivo e negativo. A razão das áreas de força positiva sob a primeira e segunda compressões (A2/A1) foi definida como coesividade. Todas as amostras apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), sendo que o PSG apresentou ligeiramente menor valor para esse parâmetro ( $0,472 \pm 0,005$ ) quando comparado com o PSIN ( $0,48 \pm 0,01$ ).

A partir desses parâmetros (dureza, elasticidade e coesividade) foi possível calcular a mastigabilidade, definido como o período necessário para mastigar uma amostra a uma constante aplicação da taxa de força para reduzi-la a uma consistência adequada para deglutição (Bourne, 2002). Não houve diferenças significativas entre os pães de sorgo *in natura* e germinado, que apresentaram  $3,2 \pm 0,3$  e  $3,46 \pm 0,02$  N, respectivamente (de notar que são valores superiores aos obtidos para os pães controle negativo e positivo). Finalmente, foi também avaliado o parâmetro de resiliência, semelhante à elasticidade, o qual envolve a velocidade e a força da recuperação do alimento, no qual não houve diferenças significativas entre as amostras PSIN e PSG, após 1 h de elaboração dos mesmos.

O trigo é um cereal que possui as proteínas gliadina e glutenina que junto com água e força mecânica, são capazes de formar o glúten. O glúten tem como finalidade auxiliar na retenção de gases formados pela fermentação, resultando num produto com maior volume e com uma textura macia (Balakireva & Zamyatnin, 2016). Os pães sem glúten, geralmente apresentam menor volume e maior firmeza do miolo pela incapacidade de formar uma rede tridimensional capaz de reter os gases da fermentação (Carini et al., 2015). Além dos pães isentos de glúten serem afetados pela exclusão do mesmo, também são afetados pela adição de farinhas com alto teor de fibras dietéticas totais.

Na literatura, no âmbito da utilização de farinhas integrais isentas de glúten e com alto teor de fibras, observaram pães com volume mais baixo e conseqüentemente com maior firmeza do miolo, devido ao maior índice de absorção de água e à longa estrutura das moléculas das fibras que afetam negativamente o aprisionamento dos gases da fermentação (Lima et al., 2021). Visto isso, justificam-se os valores dos parâmetros físicos avaliados nos pães elaborados com as farinhas de sorgo *in natura* e germinado, onde apresentaram maior dureza, mastigabilidade e resiliência comparado com o PCP, que não apresenta glúten.

A modificação na textura dos produtos panificados ao longo do tempo está relacionada com a retrogradação e com a sinérese, processo no qual ocorre a expulsão da água do interior do amido, interferindo diretamente no volume e aumentando a firmeza do produto. Após 24 h de armazenamento, todos os pães apresentaram um aumento na dureza, sendo que o PCP apresentou um aumento de aproximadamente 270% maior que os demais pães. Os pães PSG e PSIN apresentaram um aumento de aproximadamente 10 e 39%, respectivamente, percentagem menor que o PCN, elaborado com farinha de trigo,

que apresentou um aumento de aproximadamente 57% na dureza após 24 h de elaboração. Sendo assim, o PCP, elaborado com a mistura de de farinhas sem glúten está mais susceptível à retrogradação que os demais pães estudados. A menor dureza do PSG, pode ser explicada pelo fato dele conter enzimas amiolíticas, que auxiliam no retardamento do fenômeno de retrogradação dos produtos panificados (Zhang et al., 2019).

Todos os pães apresentaram diferenças significativas para os parâmetros de elasticidade, coesividade, mastigabilidade e resiliência após 24 h de elaboração. Com o passar do tempo de armazenamento, todas as amostras diminuíram a elasticidade, coesividade e resiliência, no entanto, houve um aumento no valor de mastigabilidade para o PCP, ao contrário dos demais pães que diminuíram após o tempo de armazenamento, em destaque o PSG que foi o que apresentou menor valor para esse parâmetro.

### 3.2.1. Composição nutricional e química dos produtos de panificação desenvolvidos

Os dados relativos aos resultados obtidos sobre a composição nutricional e valor energético das formulações de pães desenvolvidas encontram-se descritos na **Tabela 9**. A composição nutricional dos alimentos é de grande importância para a aceitabilidade pelos consumidores. A informação nutricional influencia a percepção dos produtos à base de cereais, pois destacando os benefícios do alimento com informações claras é fundamental para incentivar os consumidores a escolher um produto que tenha mais benefícios para saúde a médio e longo-prazo (Sajdakowska et al., 2019).

**Tabela 9:** Composição nutricional e valor energético dos pães formulados (média ± DP).

	PSIN	PSG	PCP	PCN
<b>Valor nutricional (g/100 g ps – peso seco)</b>				
Gordura total	10,36 ± 0,09 <sup>b</sup>	10,64 ± 0,07 <sup>a</sup>	7,98 ± 0,03 <sup>c</sup>	5,45 ± 0,08 <sup>d</sup>
Proteína	7,52 ± 0,01 <sup>c</sup>	7,8 ± 0,1 <sup>b</sup>	4,52 ± 0,05 <sup>d</sup>	10,2 ± 0,2 <sup>a</sup>
Cinzas	2,595 ± 0,002 <sup>a</sup>	2,382 ± 0,001 <sup>b</sup>	1,95 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,47 ± 0,01 <sup>d</sup>
Fibras dietéticas totais	20,8 ± 0,3 <sup>b</sup>	21,42 ± 0,07 <sup>a</sup>	8,66 ± 0,05 <sup>c</sup>	6,8 ± 0,2 <sup>d</sup>
Hidrato de carbono	58,7 ± 0,2 <sup>c</sup>	57,77 ± 0,01 <sup>d</sup>	76,88 ± 0,02 <sup>a</sup>	76,1 ± 0,3 <sup>b</sup>
Valor energético (kcal/100 g ps)	400 ± 1 <sup>d</sup>	400,8 ± 0,2 <sup>c</sup>	414,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	407,8 ± 0,9 <sup>b</sup>

Resultados expressos em média ± desvio padrão (DP). ANOVA- Letras distintas na mesma linha correspondem a diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Todas as formulações dos pães obtiveram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), visto que os pães elaborados com farinha de sorgo *in natura* e germinado apresentaram maior teor de gordura total, cinzas, fibras dietéticas totais e menores teores de hidrato de carbono quando comparado com os pães controlo positivo e negativo. Em relação ao teor de proteína dos pães, o valor obtido foi coerente com o teor de proteínas das farinhas utilizadas, sendo o PCN a amostra que obteve maior teor de proteínas ( $10,2 \pm 0,2$  g/100 g). Os pães elaborados com farinhas de sorgo *in natura* e germinado apresentaram valores de  $7,52 \pm 0,01$  g/100 g e  $7,8 \pm 0,1$  g/100 g, respetivamente, sendo estes valores superiores à amostra PCP (elaborado com a mistura de farinhas sem glúten).

Assim como o teor de proteína, a substituição da mistura de farinhas sem glúten pela farinha de sorgo *in natura* e germinado, aumentou o teor de gordura dos pães, provenientes tanto da farinha quanto do azeite utilizado na elaboração dos mesmos. As concentrações de gordura nos de sorgo *in natura* e germinado foram de  $10,36 \pm 0,09$  e  $10,64 \pm 0,07$  g/100 g, respetivamente.

O PSG apresentou um teor de fibras dietéticas totais mais elevado que os demais pães elaborados (de  $21,42 \pm 0,07$  g/100g), que apresentaram valores de  $20,8 \pm 0,3$ ,  $8,66 \pm 0,05$  e  $6,8 \pm 0,2$  g/100g para o PSIN, PCP e controlo negativo, respetivamente. O aumento do teor de fibras com a substituição da farinha de sorgo é justificado pela utilização da farinha integral de sorgo *in natura* e germinado, que apresenta na sua composição maior teor de fibras que as demais farinhas utilizadas para a elaboração dos pães controlo. Segundo o Regulamento (UE) n° 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de Dezembro de 2006, relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos, produtos com teor superior de 6 g de fibras por 100 g pode ser considerado e rotulado como produto rico em fibras, neste caso, mesmo os pães de sorgo apresentando maior teor, todos os pães podem ser considerados ricos em fibras.

Os pães controlos, por sua vez, apresentaram maiores teores de hidratos de carbono, ao contrário do PSG que apresentou a menor quantidade ( $57,77 \pm 0,01$  g/100 g) entre todos os pães estudados. Isto pode ser explicado pelo processo de germinação que degrada os grânulos de amido e que vai utilizar os compostos de degradação como fonte de energia para o desenvolvimento do grão.

No que se refere ao valor energético dos pães elaborados, o PCN, elaborado com farinha de trigo apresentou maior valor energético  $414,78 \pm 0,28$  kcal/100 g, já os pães de sorgo *in natura* e germinado apresentaram  $399,77 \pm 1,01$  kcal/100 g e  $400,82 \pm 0,22$

kcal/100 g, respectivamente. A diferença significativa em relação ao valor energético dos pães pode ser explicada pelo teor de hidratos de carbono nos pães elaborados com farinha de trigo e mistura de farinhas sem glúten ser mais elevado.

Relativamente à composição química dos pães elaborados, os resultados relativos aos açúcares livres e ácidos orgânicos estão descritos na **Tabela 10**. Todas as formulações de pães apresentaram diferenças significativas em todos as variáveis estudadas. Em relação aos açúcares, e comparando com as farinhas de sorgo, é de referir a identificação de trehalose nos pães (açúcar não existente nas farinhas) e que pode ter sido resultante do processamento do pão. A amostra PCP foi o que apresentou maior teor de açúcares livres totais entre as formulações estudadas. O pão elaborado com farinha de sorgo germinado apresentou maior teor de açúcares livres que o PSIN, podendo ser este aumento na concentração de açúcares devido à presença de enzimas amilolíticas que foram ativadas durante a germinação do grão, que hidrolisam o granulo de amido em açúcares de menor peso molecular (Damodaran & Parkin, 2019).

**Tabela 10:** Composição em açúcares livres e ácidos orgânicos dos pães elaborados (média  $\pm$  DP).

	PSIN	PSG	PCP	PCN
<b>Açúcares livres (g/100 g ps)</b>				
Frutose	10,86 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>	12,2 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	12,4 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	8,36 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>
Glucose	6,01 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	7,5 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	7,5 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	4,4 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>
Sacarose	0,33 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	1,42 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	4,9 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	4,9 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
Trealose	0,47 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,06 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	0,28 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,28 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
<b>Total</b>	<b>17,66 <math>\pm</math> 0,09<sup>d</sup></b>	<b>21 <math>\pm</math> 1<sup>b</sup></b>	<b>25,1 <math>\pm</math> 0,2<sup>a</sup></b>	<b>17,9 <math>\pm</math> 0,3<sup>c</sup></b>
<b>Ácidos orgânicos (g/100 g ps)</b>				
Ácido oxálico	vg	vg	vg	vg
Ácido quínico	2,37 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	2,50 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	3,69 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	1,70 $\pm$ 0,02 <sup>d</sup>
Ácido shiquímico	0,89 $\pm$ 0,01	nd	nd	nd
Ácido cítrico	vg	0,40 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,45 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,29 $\pm$ 0,001 <sup>c</sup>
Ácido fumárico	1,00 $\pm$ 0,04	vg	vg	vg
<b>Total</b>	<b>4,24 <math>\pm</math> 0,01<sup>a</sup></b>	<b>2,92 <math>\pm</math> 0,04<sup>c</sup></b>	<b>4,13 <math>\pm</math> 0,01<sup>b</sup></b>	<b>1,98 <math>\pm</math> 0,02<sup>d</sup></b>

nd – não detetado. vg – vestígios. ps – peso seco. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP).

Letras distintas na mesma linha correspondem a diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Em termos de ácidos orgânicos, o PSIN foi o que apresentou maior concentração em ácidos orgânicos ( $4,24 \pm 0,01$  g/100g ps) e em termos qualitativos, aquele que foi identificado o maior número de ácidos orgânicos: oxálico, quínico, shiquímico, cítrico (em quantidades vestigiais) e fumárico, sendo o ácido quínico o predominante tanto nesta amostra quanto nas demais formulações estudadas. Já os ácidos fumárico e shiquímico estiveram presentes apenas na formulação de farinha de sorgo *in natura* numa concentração acima do limite de quantificações. O ácido oxálico, um antinutriente, foi, felizmente, quantificado sempre abaixo do limite de quantificação (quantidades vestigiais). O PSG, além de apresentar o ácido quínico, apresentou quantidades significativas de ácido cítrico ( $0,40 \pm 0,01$  g/100 g), ficando atrás apenas do PCP que apresentou  $0,45 \pm 0,01$  g/100g deste ácido. Várias propriedades bioativas foram correlacionadas com a presença destes dois ácidos, cítrico e quínico, entre as quais se destacam propriedades anti-diabéticas, anti-neuroinflamatórias e antioxidantes (Jang et al., 2017).

Na **Tabela 11** encontram-se descritos os resultados relativos à composição em ácidos gordos e tocoferóis dos pães desenvolvidos.

Os ácidos gordos maioritários identificados nas formulações dos pães foram o ácido palmítico (C16:0), oléico (C18:1n9c) e linoléico (C18:2n6c), provenientes tanto da farinha utilizada quanto do azeite utilizado. Os pães de sorgo *in natura* e germinado apresentaram maiores teores de ácido palmítico, linoleico,  $\alpha$ -linolênico e cis-11,14-eicosadienoico comparados com os pães formulados com farinha de trigo e misturas de farinha de farinhas sem glúten. Foi possível, por isso, observar um resultado positivo com a utilização da farinha de sorgo germinado, pois apresenta maiores teores de gordura total ( $10,63 \pm 0,07$  g/100g), dos quais a maior percentagem é de ácidos gordos monoinsaturados ( $67,34 \pm 0,18$  %). É indicado a diminuição da ingestão de ácidos gordos saturados, já que estes estão associados ao aumento de doenças cardiovasculares, diabetes, cancro e doenças crônicas, ao mesmo tempo que se recomenda a sua ingestão, uma vez que alguns deles desempenham funções fisiológicas relevantes, tais como a prevenção de doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias crônicas, ação anti-inflamatória e antitrombótica, ação sobre o crescimento fetal e desenvolvimento neural e participação em funções imunoduladoras (Schwingshackl et al., 2011).

Em relação aos tocoferóis, o PCP foi o que apresentou maior concentração total de tocoferól ( $0,22 \pm 0,001$  g/100 g), seguido do PSG que apresentou  $0,9 \pm 0,1$  g/100g. O

$\alpha$ -tocoferól foi o composto maioritário entre todos os pães formulados, apresentando em maiores concentrações no PCP.

**Tabela 11:** Composição em ácidos gordos (percentagem relativa) e tocoferóis (g/100g ps) dos pães formulados (média  $\pm$  DP).

	PSIN	PSG	PCP	PCN
<b>Ácidos gordos (% , percentagem relativa)</b>				
Ácido palmitico (C16:0)	13,9 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	12,9 $\pm$ 0,3 <sup>c</sup>	13,45 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	13,9 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
Ácido palmitoleico (C16:1)	0,86 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,77 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,878 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	0,87 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
Ácido heptadecanoico (C17:0)	0,133 $\pm$ 0,005 <sup>c</sup>	0,142 $\pm$ 0,001 <sup>d</sup>	0,168 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>	0,182 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>
Ácido cis-10-heptadecanoico (C17:1)	0,185 $\pm$ 0,006 <sup>c</sup>	0,19 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,233 $\pm$ 0,009 <sup>a</sup>	0,23 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
Ácido esteárico (C18:0)	3,23 $\pm$ 0,02 <sup>d</sup>	3,41 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	3,68 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	3,561 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>
Ácido eláídico (C18:1n9t)	0,63 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	nd	0,61 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	0,66 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
Ácido oleico (C18:1n9c)	62,8 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	66,1 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	70,5 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	67,4 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>
Ácido linoleico (C18:2n6c)	16,17 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	14,06 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	8,62 $\pm$ 0,03 <sup>d</sup>	11,09 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>
Ácido $\alpha$ -linolênico (C18:3n3)	0,99 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,97 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,821 $\pm$ 0,004 <sup>c</sup>	0,928 $\pm$ 0,004 <sup>b</sup>
Ácido araquídico (C20:0)	0,421 $\pm$ 0,004 <sup>c</sup>	0,51 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,49 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,48 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
Ácido cis-11-eicosenoico (C20:1)	0,274 $\pm$ 0,003 <sup>c</sup>	0,31 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,304 $\pm$ 0,007 <sup>b</sup>	0,31 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
Ácido cis-11,14-eicosadienoico (C20:2)	0,239 $\pm$ 0,004 <sup>b</sup>	0,28 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,214 $\pm$ 0,001 <sup>d</sup>	0,231 $\pm$ 0,005 <sup>c</sup>
<b>SFA</b>	<b>17,6 <math>\pm</math> 0,1<sup>c</sup></b>	<b>17,2 <math>\pm</math> 0,2<sup>d</sup></b>	<b>17,8 <math>\pm</math> 0,1<sup>b</sup></b>	<b>18,2 <math>\pm</math> 0,1<sup>a</sup></b>
<b>MUFA</b>	<b>64,7 <math>\pm</math> 0,1<sup>d</sup></b>	<b>67,3 <math>\pm</math> 0,2<sup>c</sup></b>	<b>72,5 <math>\pm</math> 0,1<sup>b</sup></b>	<b>69,5 <math>\pm</math> 0,1<sup>a</sup></b>
<b>PUFA</b>	<b>17,62 <math>\pm</math> 0,01<sup>a</sup></b>	<b>15,51 <math>\pm</math> 0,04<sup>b</sup></b>	<b>9,66 <math>\pm</math> 0,03<sup>d</sup></b>	<b>12,34 <math>\pm</math> 0,05<sup>c</sup></b>
<b>Tocoferóis (g/100 g ps)</b>				
$\alpha$ -Tocoferol	0,22 $\pm$ 0,001 <sup>d</sup>	0,577 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>	0,889 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	0,167 $\pm$ 0,003 <sup>c</sup>
$\beta$ -Tocoferol	nd	vg	nd	vg
$\gamma$ -Tocoferol	nd	0,292 $\pm$ 0,005 <sup>c</sup>	0,775 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	0,372 $\pm$ 0,008 <sup>b</sup>
<b>Total</b>	<b>0,22 <math>\pm</math> 0,001<sup>d</sup></b>	<b>0,9 <math>\pm</math> 0,1<sup>b</sup></b>	<b>1,66 <math>\pm</math> 0,01<sup>a</sup></b>	<b>0,61 <math>\pm</math> 0,01<sup>c</sup></b>

ps – peso seco; vg- quantidades vestigiais; nd – não detectado. SFA – saturated fatty acids (ácidos gordos saturados); MUFA – monounsaturated fatty acids (ácidos gordos monoinsaturados); PUFA - Polyunsaturated fatty acids (ácidos gordos polinsaturados). ANOVA - Em cada linha letras diferentes significam diferenças significativas entre espécies ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.3. Propriedades bioativas dos produtos de panificação desenvolvidos

Os resultados referentes à atividade antioxidante, citotóxica, hepatotóxica, nefrotóxica e anti-inflamatória dos extratos hidroetanólicos dos pães formulados estão descritos na **Tabela 12**. Em relação aos resultados do ensaio de TBARS, todas as formulações apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), sendo que a amostra de PSG apresentou maior capacidade de inibição da peroxidação lipídica ( $92 \pm 4 \mu\text{g/mL}$ ) seguido pelo pão formulado com farinha de sorgo *in natura* ( $413 \pm 18 \mu\text{g/mL}$ ).

Em relação aos ensaios de OxHLIA, todas as formulações apresentaram valores de  $\text{IC}_{50}$  superior ao valor de Trolox, antioxidante utilizado como controlo positivo ( $3,7 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$ ). O PSG e o PCP não apresentaram diferenças significativas ( $90 \pm 4$  e  $90 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ ), respectivamente, sendo que foi o PSIN o que apresentou a melhor capacidade anti-hemolítica, com um  $\text{IC}_{50} = 67 \pm 7 \mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 12:** Atividade antioxidante, citotóxica, hepatotóxica, nefrotóxica e anti-inflamatória dos extratos hidroetanólicos dos pães formulados (média  $\pm$  DP).

	<b>PSIN</b>	<b>PSG</b>	<b>PCP</b>	<b>PCN</b>	
<i>Antioxidante <math>\text{IC}_{50}</math> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</i>					<b>Trolox</b>
OxHLIA $\Delta t = 60$	$67 \pm 7^c$	$90 \pm 4^b$	$90 \pm 2^b$	$193 \pm 3^a$	$3,7 \pm 0,5$
TBARS	$413 \pm 18^b$	$92 \pm 4^c$	sa	$498 \pm 8^a$	$21,8 \pm 0,2$
<i>Citotoxicidade <math>\text{GI}_{50}</math> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</i>					<b>Elipticina</b>
AGS	>400	>400	>400	>400	$1,23 \pm 0,03$
CaCo2	>400	>400	>400	>400	$1,21 \pm 0,02$
MCF7	>400	>400	>400	>400	$1,02 \pm 0,02$
NCI-H460	>400	>400	>400	>400	$1,01 \pm 0,01$
<i>Hepatotoxicidade e nefrotoxicidade <math>\text{GI}_{50}</math> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</i>					<b>Elipticina</b>
PLP2	>400	>400	>400	>400	$1,4 \pm 0,1$
VERO	>400	>400	>400	>400	$1,4 \pm 0,1$
<i>Atividade anti-inflamatória <math>\text{IC}_{50}</math> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</i>					<b>Dexametasona</b>
RAW 264,7	>400	>400	>400	>400	$6,3 \pm 0,4$

sa – sem atividade. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  correspondem à concentração do extrato que atinge 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorbância na redução do ensaio de potência. Os resultados de citotoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade foram expressos em valores de  $\text{GI}_{50}$ : correspondendo a concentração de amostra necessária para realizar a inibição do crescimento em 50% sob células tumorais humanas ou em cultura primária de células de fígado de porco (PLP2) e rim de macaco (VERO).

Num estudo efetuado por Gallo et al. (2021), no qual desenvolveram pães com farinhas de diferentes genótipos de sorgo *in natura*, demonstraram que pão de sorgo integral apresentou uma maior atividade antioxidante do que as outras amostras (ensaio ORAC: 45,49  $\mu\text{mol TE/g}$ ), nomeadamente nos genótipos de sorgo castanho e vermelho, onde há maior concentração de compostos fenólicos.



# Capítulo 4



#### 4. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

A germinação é um processo bioquímico muito complexo, sendo uma forma natural, simples e económica de melhorar a qualidade nutricional dos grãos. Com isto em mente, o presente trabalho teve como objetivo analisar a influência da germinação nas propriedades tecnológicas, nutricionais, químicas e bioativas na farinha de sorgo.

Relativamente às características físicas das farinhas, observou-se que a germinação teve um impacto significativo, nomeadamente numa menor granulometria, coloração mais clara (farinhas com tendência para o amarelo), maior firmeza dos géis (retrogradação e sinérese foram mais evidentes num menor período de tempo e temperatura de germinação), aumento da solubilidade e capacidade de absorção de óleo e diminuição do poder de dilatação.

Para a caracterização nutricional das farinhas de grãos de sorgo *in natura* e germinado efetuou-se a determinação da humidade, proteína bruta, gordura total, fibras dietéticas totais, cinzas, hidratos de carbono e valor energético. A farinha de sorgo *in natura* e germinado não apresentaram diferenças significativas no teor de hidratos de carbono. No entanto, a germinação afetou significativamente os restantes macronutrientes, tendo sido observada uma maior percentagem de humidade no sorgo germinado, assim como maiores teores de cinzas e proteínas. Por outro lado, observou-se um decréscimo nos teores de gordura e fibras dietéticas, que podem ter sido consumidas durante o processo de germinação. O valor energético das farinhas de sorgo germinado também diminuiu, o que pode dever-se à quebra dos hidratos de carbono como fonte de energia para o processo de germinação, à semelhança dos teores de gorduras e fibras.

O processo germinativo do grão de sorgo também modificou as suas características químicas. Com a ativação de algumas enzimas, verificou-se a degradação do amido em moléculas de menor peso molecular, sendo possível observar este fenómeno na micrografia eletrónica dos grânulos de amido *in natura* e germinado, o que levou ao aumento do teor de açúcares livres no sorgo germinado ( $1,49 \pm 0,04$  g/100g), quando comparado com o sorgo *in natura* ( $0,82 \pm 0,04$  g/100g).

Para além do aumento da concentração de açúcares livres, também foi possível observar no sorgo germinado um aumento no teor de ácidos orgânicos, principalmente ácido málico ( $1,49 \pm 0,01$  g/100g ps), e na concentração de ácidos gordos polinsaturados (quase 7 vezes superior), sobretudo devido à presença de ácido linoleico (C18:2n6c,

41,907 ± 0,037%). O efeito contrário foi verificado em relação aos tocoferóis e compostos fenólicos, onde a germinação diminuiu precisamente a concentração deste tipo de composto.

Finalmente, em relação às propriedades bioativas das farinhas desenvolvidas, foi novamente com a farinha de grão de sorgo germinado que se obtiveram os melhores resultados para a capacidade de inibição da peroxidação lipídica (TBARS, IC<sub>50</sub> = 1,9 ± 0,4 µg/mL). No entanto, não apresentou atividade em relação à inibição da hemólise oxidativa em eritrócitos. Relativamente à hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, as farinhas de sorgo *in natura* e germinado não apresentaram atividade até à concentração máxima testada (400 µg/mL), o que revela a não toxicidade das farinhas estudadas, podendo estas, em teoria, ser usadas para consumo alimentar.

Tendo em vista uma possível aplicação industrial, foram desenvolvidos pães isentos de glúten com substituição a 100% da farinha de trigo pela farinha de sorgo *in natura* e germinado. Estes produtos foram comparados com produtos desenvolvidos com 100% de farinha de trigo e com uma mistura de farinhas sem glúten.

Os produtos de panificação desenvolvidos com farinha de sorgo *in natura* e germinado, revelaram uma cloração mais escura, maior dureza do miolo e menor volume específico, resultados característicos de produtos elaborados com farinhas integrais e sem glúten. O pão de farinha de sorgo germinado foi que apresentou um menor aumento na dureza após 24 h de armazenamento.

A utilização da farinha de sorgo germinado originou pães com alto teor de gordura, maioritariamente ácidos gordos insaturados e maior teor de fibras dietéticas totais, além de apresentar menor teor de hidratos de carbono e valor energético, quando comparados com as formulações controlo.

Em relação à composição química dos pães, o pão de sorgo *in natura* foi o que apresentou maior concentração de ácidos orgânicos. No entanto, o pão de sorgo germinado, para além de apresentar o ácido quínico, apresentou quantidades significativas de ácido cítrico (0,40 ± 0,01 g/100g). Em relação aos tocoferóis, o pão controlo positivo foi o que apresentou maior concentração total de tocoferóis (0,22 ± 0,001 g/100 g), seguido do pão de sorgo germinado (0,9 ± 0,1 g/100g). De referir que o α-tocoferol foi o isómero mais abundante em todos os pães desenvolvidos.

Finalmente, em termos de funcionalidade dos pães desenvolvidos, o pão de sorgo germinado revelou maior capacidade de inibição da peroxidação lipídica ( $92 \pm 4 \mu\text{g/mL}$ ), seguida do pão de sorgo *in natura* ( $413 \pm 18 \mu\text{g/mL}$ ). Tal como as farinhas de sorgo, as amostras de pão não revelaram citotoxicidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, nem capacidade anti-inflamatória à máxima concentração estudada ( $>400 \mu\text{g/mL}$ ).

Em suma, este trabalho visou sublinhar a importância do consumo de plantas alimentares não convencionais, como uma alternativa viável e segura às farinhas com glúten, apresentando ainda potencial nutricional, químico e bioativo. A farinha de *Sorghum bicolor* (L.) Moench ganha, assim, destaque para o desenvolvimento de novos produtos de panificação, sobretudo após germinação, que é um método alternativo eficiente e de baixo custo para modificação do amido, com melhor perfil nutricional, químico e bioativo, mas especialmente com propriedades tecnológicas aprimoradas sem recorrer a modificações químicas ou engenharia genética.

**Como perspectivas futuras deste trabalho, seria importante o estudo da(s):**

- Determinação do pH nos produtos desenvolvidos, pois é um fator de grande importância na limitação da capacidade de desenvolvimento de microrganismos no alimento e que contribui para definir procedimentos tecnológicos com vista à conservação;
- Determinação da acidez, pois representa o estado de conservação das farinhas, não somente no aspecto económico, através de perdas devido à diminuição do tempo de prateleira, mas também pela redução da aceitabilidade desses produtos pelos consumidores através de mudanças de cor e sabor, envolvendo tanto aspectos químicos como microbiológicos;
- Análise microbiológica das farinhas de sorgo germinado e *in natura* e do produto elaborado, assim como das suas condições de armazenamento;
- Análise sensorial dos produtos elaborados (estudo em curso);
- Digestibilidade *in vitro*, para avaliar a qualidade da proteína e do amido no processo digestivo;
- Atividade antidiabética *in vitro*, das farinhas e das formulações (estudo em curso).



# Capítulo 5



## 5. REFERÊNCIAS

- AACC. (2000). *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists* (10 Ed.). American Association of Cereal Chemists.
- Abdelhalim, T. S., Abdelhalim, N. S., Kamal, N. M., Mohamed, E. E., & Hassan, A. B. (2021). Exploiting the potential of Sudanese sorghum landraces in biofortification: Physicochemical quality of the grain of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) landraces. *Food Chemistry*, *337*, 127604. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127604>
- Abras, M. F. (2018). *PANC's: a cultura alimentar de hortaliças tradicionais na modernidade* [Dissertação de Mestrado, Universidade FUMEC]. <http://ppg.fumec.br/ecc/wp-content/uploads/2016/08/Disserta%C3%A7%C3%A3o-Michael-Abras.pdf>
- Al-Bawardy, B., Codipilly, D. C., Rubio-Tapia, A., Bruining, D. H., Hansel, S. L., & Murray, J. A. (2017). Celiac disease: a clinical review. *Abdominal Radiology*, *42*(2), 351–360. <https://doi.org/10.1007/s00261-016-1034-y>
- Alves, D. T., Nascimento, M. H. da S., & Martins, E. M. F. (2021). Pães enriquecidos com Ora-Pro-Nóbis: elaboração e avaliação físico-química, microbiológica e sensorial/ Bread enriched with Ora-Pro-Nobis: elaboration and physicochemical, microbiological and sensorial evaluation. *Brazilian Journal of Development*, *7*(2), 12633–12646. <https://doi.org/10.34117/BJDV7N2-061>
- AOAC. (1999). *Official methods of analysis of AOAC International: Vol. Volume 2* (16th edition). AOAC (Association of Official Analytical Chemists) International.
- Arendt, E. K., & Zannini, E. (2013). Sorghum. In *Cereal Grains for the Food and Beverage Industries* (pp. 283–311). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857098924.283>
- Aruna, C., & Visarada, K. B. R. S. (2019). Sorghum Grain in Food and Brewing Industry. In *Breeding Sorghum for Diverse End Uses* (pp. 209–228). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101879-8.00013-9>
- Azevedo, L. C., de Sá, A. S. C., & Fungaro, D. A. (2018). Propriedades do amido e suas aplicações em biopolímeros. *Cadernos de Prospecção*, *11*, 351. <https://doi.org/10.9771/cp.v11i2.23173>

- Balakireva, A., & Zamyatnin, A. (2016). Properties of Gluten Intolerance: Gluten Structure, Evolution, Pathogenicity and Detoxification Capabilities. *Nutrients*, 8(10), 644. <https://doi.org/10.3390/nu8100644>
- Barros, L., Pereira, E., Calhela, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1732–1740. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.07.019>
- Beltrão, N. E. de M., & Oliveira, M. I. P. de. (2007). Biossíntese e degradação de Lipídios, Carboidratos e Proteínas em oleaginosas. *Embrapa Algodão-Documentos (INFOTECA-E)*.
- Benevides, C. M. de J., Costa, C. C. M., Cardoso, Y. P., Lopes, M. V., Montes, S. de S., & Souza, A. C. dos S. (2020). Estudo do efeito do tratamento térmico nos compostos bioativos em PANC. *Research, Society and Development*, 9(11), e46691110045. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i11.10045>
- Bessada, S. M. F., Barreira, J. C. M., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., & Oliveira, M. B. P. P. (2016). Phenolic profile and antioxidant activity of *Coleostephus myconis* (L.) Rchb.f.: An underexploited and highly disseminated species. *Industrial Crops and Products*, 89, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.065>
- Beuchat, L. R. (1977). Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(2), 258–261. <https://doi.org/10.1021/jf60210a044>
- Bhat, I. M., Wani, S. M., Mir, S. A., & Masoodi, F. A. (2022). Advances in xanthan gum production, modifications and its applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 42, 102328. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102328>
- Blomfeldt, T. O. J., Kuktaite, R., Johansson, E., & Hedenqvist, M. S. (2011). Mechanical Properties and Network Structure of Wheat Gluten Foams. *Biomacromolecules*, 12(5), 1707–1715. <https://doi.org/10.1021/bm200067f>
- Bourne, M. (2002). *Food texture & viscosity: Concept and measurement* (2 Ed). Elsevier.
- Brazilian Flora 2020. (2018). Brazilian Flora 2020: Innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). *Rodriguésia*, 69(4), 1513–1527. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201869402>
- Buhl, T. F., Christensen, C. H., & Hammershøj, M. (2019). Aquafaba as an egg white substitute in food foams and emulsions: Protein composition and functional

- behavior. *Food Hydrocolloids*, 96, 354–364.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.041>
- Cáceres, P. J., Martínez-Villaluenga, C., Amigo, L., & Frias, J. (2014). Maximising the phytochemical content and antioxidant activity of Ecuadorian brown rice sprouts through optimal germination conditions. *Food Chemistry*, 152, 407–414.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.156>
- Canal Rural. (2022, May 9). *Sorgo no Brasil: produção e variedades disponíveis*.  
<https://Blogs.Canalrural.Com.Br/Blogdosorgo/2019/08/16/Sorgo-No-Brasil-Producao-e-Variedades-Disponiveis/>.
- Canella-Rawls, S. (2021). *Pão - Arte e Ciência* (6<sup>a</sup> ed). Senac.
- Carco, C., Young, W., Gearry, R. B., Talley, N. J., McNabb, W. C., & Roy, N. C. (2020). Increasing Evidence That Irritable Bowel Syndrome and Functional Gastrointestinal Disorders Have a Microbial Pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00468>
- Carini, E., Scazzina, F., Curti, E., Fattori, F., Mazzeo, T., & Vittadini, E. (2015). Physicochemical, sensory properties and starch *in vitro* digestion of gluten-free breads. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(8), 867–872.  
<https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1098591>
- Carmona, J. A., Lucas, A., Ramírez, P., Calero, N., & Muñoz, J. (2015). Nonlinear and linear viscoelastic properties of a novel type of xanthan gum with industrial applications. *Rheologica Acta*, 54(11–12), 993–1001.  
<https://doi.org/10.1007/s00397-015-0888-1>
- Carsin, A., Agabriel-Parent, C., Boudard, I. C., & Dubus, J.-C. (2015). Démarche diagnostique en allergie alimentaire. *Archives de Pédiatrie*, 22(5), 122–123.  
[https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(15\)30060-9](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(15)30060-9)
- Casemiro, Í. D. P., & Vendramini, A. L. do A. (2020). Unconventional food plants in Brazil: what does Nutrition know about this topic? *DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde*, 15, e42725. <https://doi.org/10.12957/demetra.2020.42725>
- Çatal, H., & İbanoğlu, Ş. (2012). Ozonation of corn and potato starch in aqueous solution: effects on the thermal, pasting and structural properties. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(9), 1958–1963. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03056.x>

- Contreras-Jiménez, B., del Real, A., Millan-Malo, B. M., Gaytán-Martínez, M., Morales-Sánchez, E., & Rodríguez-García, M. E. (2019). Physicochemical changes in barley starch during malting. *Journal of the Institute of Brewing*, *125*(1), 10–17. <https://doi.org/10.1002/jib.547>
- Costa, C., Prates, S., & Carrapatoso, I. (2019). *ALERGIA ALIMENTAR: CONCEITOS, CONSELHOS E PRECAUÇÕES*.
- Crozier, D., Riera-Lizarazu, O., & Rooney, W. L. (2022). Application of X-ray computed tomography to analyze the structure of sorghum grain. *Plant Methods*, *18*(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s13007-022-00837-7>
- Curti, M. I., Belorio, M., Palavecino, P. M., Camiña, J. M., Ribotta, P. D., & Gómez, M. (2022). Effect of sorghum flour properties on gluten-free sponge cake. *Journal of Food Science and Technology*, *59*(4), 1407–1418. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05150-0>
- Damodaran, S., & Parkin, K. L. (2019). *Química de alimentos de Fennema* (5th ed). Grupo A.
- Duodu, K. G., & Awika, J. M. (2019). Phytochemical-Related Health-Promoting Attributes of Sorghum and Millets. In *Sorghum and Millets* (pp. 225–258). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811527-5.00008-3>
- Espitia-Hernández, P., Chávez González, M. L., Ascacio-Valdés, J. A., Dávila-Medina, D., Flores-Naveda, A., Silva, T., Ruelas Chacón, X., & Sepúlveda, L. (2022). Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) as a potential source of bioactive substances and their biological properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *62*(8), 2269–2280. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1852389>
- Fernandes, S. S., & Mellado, M. de las M. S. (2018). Development of Mayonnaise with Substitution of Oil or Egg Yolk by the Addition of Chia (*Salvia Hispânica* L.) Mucilage. *Journal of Food Science*, *83*(1), 74–83. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13984>
- Fernandez, V. E., & Ruiz, M. A. (2021). Contenido de polifenoles, capacidad antioxidante y toxicidad de solanum ferrugineum (Solanaceae) con potencial medicinal. *Acta Biológica Colombiana*, *26*(3), 414–422. <https://doi.org/10.15446/abc.v26n3.87032>
- Föste, M., Verheyen, C., Jekle, M., & Becker, T. (2020). Fibres of milling and fruit processing by-products in gluten-free bread making: A review of hydration

- properties, dough formation and quality-improving strategies. *Food Chemistry*, 306, 125451. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125451>
- Fouad, A. A., & Rehab, F. M. A. (2015). Effect of germination time on proximate analysis, bioactive compounds and antioxidant activity of lentil (*Lens culinaris* Medik.) sprouts. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 14(3), 233–246. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2015.3.25>
- Franco, V. A. (2015). *DESENVOLVIMENTO DE PÃO SEM GLÚTEN COM FARINHA DE ARROZ E DE BATATA-DOCE*. Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás.
- Gallo, L. R. dos R., Reis, C. E. G., Mendonça, M. A., da Silva, V. S. N., Pacheco, M. T. B., & Botelho, R. B. A. (2021). Impact of Gluten-Free Sorghum Bread Genotypes on Glycemic and Antioxidant Responses in Healthy Adults. *Foods*, 10(10), 2256. <https://doi.org/10.3390/foods10102256>
- Galves, M. de C. P. (2014). *Técnica de panificação e massa* (Vol. 1). Saraiva.
- Gao, Y., Janes, M. E., Chaiya, B., Brennan, M. A., Brennan, C. S., & Prinyawiwatkul, W. (2018). Gluten-free bakery and pasta products: prevalence and quality improvement. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(1), 19–32. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13505>
- Gava, M. J. (2017). *APLICAÇÃO DE SORGO (Sorghum bicolor (L.) Moench) E EFEITO NAS PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DE PÃES ISENTOS DE GLÚTEN*. <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/12658>
- Guandalini, S., & Assiri, A. (2014). Celiac Disease. *JAMA Pediatrics*, 168(3), 272. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2013.3858>
- Guerra-Oliveira, P., Belorio, M., & Gómez, M. (2022). Wasted bread flour as a novel ingredient in cake making. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(8), 4754–4762. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15577>
- He, Y., Song, S., Li, C., Zhang, X., & Liu, H. (2022). Effect of germination on the main chemical compounds and 5-methyltetrahydrofolate metabolism of different quinoa varieties. *Food Research International*, 159, 111601. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111601>
- Hu, L., Yang, Y., Chen, F., Fan, J., Wang, B., Fu, Y., Bian, X., Yu, D., Wu, N., Shi, Y., Zhang, X., & Zhang, N. (2022). Soybean protein isolate-rice starch interactions

- during the simulated gluten-free rice bread making process. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(4), 2093–2103. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15494>
- Igamberdiev, A. U., & Eprintsev, A. T. (2016). Organic Acids: The Pools of Fixed Carbon Involved in Redox Regulation and Energy Balance in Higher Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01042>
- Irondi, E. A., Adegoke, B. M., Effion, E. S., Oyewo, S. O., Alamu, E. O., & Boligon, A. A. (2019). Enzymes inhibitory property, antioxidant activity and phenolics profile of raw and roasted red sorghum grains in vitro. *Food Science and Human Wellness*, 8(2), 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.012>
- Jacob, M. C. M. (2020). Biodiversity of underutilized food plants in a community-based learning garden/Biodiversidade de plantas alimenticias nao convencionais em uma horta comunitaria com fins educativos. *Demetra: Food, Nutrition & Health*, 15, 1–18. <https://doi.org/10.12957/DEMETRA.2020.44037>
- Jang, S.-A., Park, D. W., Kwon, J. E., Song, H. S., Park, B., Jeon, H., Sohn, E.-H., Koo, H. J., & Kang, S. C. (2017). Quinic acid inhibits vascular inflammation in TNF- $\alpha$ -stimulated vascular smooth muscle cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, 563–571. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.021>
- Jericho, H., Assiri, A., & Guandalini, S. (2017). Celiac Disease and Wheat Intolerance Syndrome: A Critical Update and Reappraisal. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, 64(1), 15–21. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001312>
- Jribi, S., Sahagùn, M., Debbabi, H., & Gomez, M. (2019). Evolution of functional, thermal and pasting properties of sprouted whole durum wheat flour with sprouting time. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(9), 2718–2724. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14192>
- Kang, J., Price, W. E., Ashton, J., Tapsell, L. C., & Johnson, S. (2016). Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of sorghum wholegrains by LC-ESI-MSn. *Food Chemistry*, 211, 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.052>
- Kelen, M. E. B., Nouhuys, I. S. van, Kehl, L. C. K., Brack, P., & Silva, D. B. da. (2015). *Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs) hortaliças espontâneas e nativas* (Issue 1).

- Kinupp, V. F. (2007). *Plantas alimentícias não convencionais da região metropolitana de Porto Alegre, RS* [Doutorado em Fitotecnia, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL]. <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/12870>
- Kinupp, V. F., & Lorenzi, H. (2014). *Plantas Alimentícias NãoConvencionais (PANCs) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas* *Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas*. Plantarum.
- Köhn, C. R., Fontoura, A. M., Kempka, A., Demiate, I., Kubota, E. H., & Prestes Dornelles, R. (2015). Assessment of different methods for determining the capacity of water absorption of ingredients and additives used in the meat industry. *International Food Research Journal*, *22*, 356–362.
- Konica Minolta. (2021). *Entendendo o Espaço de Cor L\*a\*b\**. <https://sensing.konicaminolta.us/br/blog/entendendo-o-espaco-de-cor-lab/>
- Krupa-Kozak, U., Bączek, N., & Rosell, C. (2013). Application of Dairy Proteins as Technological and Nutritional Improvers of Calcium-Supplemented Gluten-Free Bread. *Nutrients*, *5*(11), 4503–4520. <https://doi.org/10.3390/nu5114503>
- Leal, M. L., Alves, R. P., & Hanazaki, N. (2018). Knowledge, use, and disuse of unconventional food plants. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/S13002-018-0209-8>
- Leyva-López, N., Lizárraga-Velázquez, C. E., Hernández, C., & Sánchez-Gutiérrez, E. Y. (2020). Exploitation of Agro-Industrial Waste as Potential Source of Bioactive Compounds for Aquaculture. *Foods*, *9*(7), 843. <https://doi.org/10.3390/foods9070843>
- Li, C., Oh, S.-G., Lee, D.-H., Baik, H.-W., & Chung, H.-J. (2017). Effect of germination on the structures and physicochemical properties of starches from brown rice, oat, sorghum, and millet. *International Journal of Biological Macromolecules*, *105*, 931–939. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.123>
- Li, W., Cao, W., Wang, P., Li, J., Zhang, Q., & Yan, Y. (2021). Selectively hydrolyzed soy protein as an efficient quality improver for steamed bread and its influence on dough components. *Food Chemistry*, *359*, 129926. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129926>
- Li, X., Li, J., Dong, S., Li, Y., Wei, L., Zhao, C., Li, J., Liu, X., & Wang, Y. (2019). Effects of germination on tocopherol, secoisolarciresinol diglucoside, cyanogenic

- glycosides and antioxidant activities in flaxseed ( *Linum usitatissimum* L.). *International Journal of Food Science & Technology*, 54(7), 2346–2354. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14098>
- Lima, J. F., Dias, M. I., Pereira, C., Ivanov, M., Soković, M. S., Steinmacher, N. C., Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Barbero, F., & Zeljkovic, S. C. (2021). *Characterization of Nonconventional Food Plants Seeds Guizotia abyssinica (L.f.) Cass., Panicum miliaceum L., and Phalaris canariensis L. for Application in the Bakery Industry*. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091873>
- Lin, M. J. Y., Humbert, E. S., & Sosulski, F. W. (1974). Certain functional properties of sunflower meal products. *Journal of Food Science*, 39(2), 368–370. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1974.tb02896.x>
- Liu, S., Wang, W., Lu, H., Shu, Q., Zhang, Y., & Chen, Q. (2022). New perspectives on physiological, biochemical and bioactive components during germination of edible seeds: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 123, 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.029>
- Liu, T., Hou, G. G., Cardin, M., Marquart, L., & Dubat, A. (2017). Quality attributes of whole-wheat flour tortillas with sprouted whole-wheat flour substitution. *LWT*, 77, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.017>
- Lobo, F. A. T. F., Santos, M. A. dos, & Montes, L. T. P. (2021). Alergia Alimentar: Um Problema Crescente. *Revista Saúde Em Foco*, 8(3), 39–53. <https://doi.org/10.12819/rsf.2021.8.3.3>
- Ma, Z., Marsolais, F., Bernards, M. A., Sumarah, M. W., Bykova, N. v., & Igamberdiev, A. U. (2016). Glyoxylate cycle and metabolism of organic acids in the scutellum of barley seeds during germination. *Plant Science*, 248, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.04.007>
- Majid, A., Lakshmikanth, M., Lokanath, N. K., & Poornima Priyadarshini, C. G. (2022). Generation, characterization and molecular binding mechanism of novel dipeptidyl peptidase-4 inhibitory peptides from sorghum bicolor seed protein. *Food Chemistry*, 369, 130888. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130888>
- Mandim, F., Petropoulos, S. A., Dias, M. I., Pinela, J., Kostic, M., Soković, M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R., & Barros, L. (2021). Seasonal variation in bioactive properties and phenolic composition of cardoon (*Cynara cardunculus* var. *altilis*)

- bracts. *Food Chemistry*, 336, 127744.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127744>
- Maphosa, Y., & Jideani, V. A. (2017). The Role of Legumes in Human Nutrition. In *Functional Food - Improve Health through Adequate Food*. InTech.  
<https://doi.org/10.5772/intechopen.69127>
- Marchini, M., Marti, A., Folli, C., Prandi, B., Ganino, T., Conte, P., Fadda, C., Mattarozzi, M., & Carini, E. (2021). Sprouting of Sorghum (*Sorghum bicolor* [L.] Moench): Effect of Drying Treatment on Protein and Starch Features. *Foods*, 10(2), 407.  
<https://doi.org/10.3390/foods10020407>
- Marques, C., Sotiles, A. R., Farias, F. O., Oliveira, G., Mitterer-Daltoé, M. L., & Masson, M. L. (2020). Full physicochemical characterization of malic acid: Emphasis in the potential as food ingredient and application in pectin gels. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(12), 9118–9129. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.10.036>
- Marquito, M. J. G. (2014). *Influência dos aditivos de panificação na bioacessibilidade dos minerais do pão de trigo*. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.
- Martino, H. S. D., Tomaz, P. A., Moraes, É. A., Conceição, L. L. da, Oliveira, D. da S., Queiroz, V. A. V., Rodrigues, J. A. S., Pirozi, M. R., Pinheiro-Sant’Ana, H. M., & Ribeiro, S. M. R. (2012). Chemical characterization and size distribution of sorghum genotypes for human consumption. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 71(2), 377–344.
- Medeiros, F. M. de, Gleice, M., & Alves, M. (2014). *QUALIDADE DE OVOS COMERCIAIS Commercial egg quality*. [www.nutritime.com.br](http://www.nutritime.com.br)
- Mehboob, S., Ali, T. M., Alam, F., & Hasnain, A. (2015). Dual modification of native white sorghum (*Sorghum bicolor*) starch via acid hydrolysis and succinylation. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 459–467.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.012>
- Minello, L., Sartori, V. C., Touguinha, L. B. A., Agostini, F., Silva, S. M. e, & Salvador, M. (2021). Estudo comparativo de diferentes métodos de extração de compostos bioativos de plantas alimentícias não convencionais (PANC). *Research, Society and Development*, 10(17), e190101724210. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i17.24210>
- Mohamed, H. I., M. Fawzi, E., Basit, A., Kaleemullah, Lone, R., & R. Sofy, M. (2022). Sorghum: Nutritional Factors, Bioactive Compounds, Pharmaceutical and

- Application in Food Systems: A Review. *Phyton*, 91(7), 1303–1325.  
<https://doi.org/10.32604/phyton.2022.020642>
- Mohapatra, D., Patel, A. S., Kar, A., Deshpande, S. S., & Tripathi, M. K. (2019). Effect of different processing conditions on proximate composition, anti-oxidants, anti-nutrients and amino acid profile of grain sorghum. *Food Chemistry*, 271, 129–135.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.196>
- Monge-Morera, M., Lambrecht, M. A., Deleu, L. J., Louros, N. N., Rousseau, F., Schymkowitz, J., & Delcour, J. A. (2021). Heating Wheat Gluten Promotes the Formation of Amyloid-like Fibrils. *ACS Omega*, 6(3), 1823–1833.  
<https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03670>
- Mustafa, R., He, Y., Shim, Y. Y., & Reaney, M. J. T. (2018). Aquafaba, wastewater from chickpea canning, functions as an egg replacer in sponge cake. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(10), 2247–2255.  
<https://doi.org/10.1111/ijfs.13813>
- Muthukumar, J., Selvasekaran, P., Lokanadham, M., & Chidambaram, R. (2020). Food and food products associated with food allergy and food intolerance – An overview. *Food Research International*, 138, 109780.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109780>
- Noti, M., Kim, B. S., Siracusa, M. C., Rak, G. D., Kubo, M., Moghaddam, A. E., Sattentau, Q. A., Comeau, M. R., Spergel, J. M., & Artis, D. (2014). Exposure to food allergens through inflamed skin promotes intestinal food allergy through the thymic stromal lymphopoietin–basophil axis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(5), 1390-1399.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.01.021>
- Obodai, M., Narh Mensah, D., Fernandes, Â., Kortei, N., Dzomeku, M., Teegarden, M., Schwartz, S., Barros, L., Prempeh, J., Takli, R., & Ferreira, I. (2017). Chemical Characterization and Antioxidant Potential of Wild Ganoderma Species from Ghana. *Molecules*, 22(2), 196. <https://doi.org/10.3390/molecules22020196>
- Ocheme, B. O., Adedeji, E. O., Lawal, G., & Zakari, M. U. (2015). Effect of Germination on Functional Properties and Degree of Starch Gelatinization of Sorghum Flour. *Journal of Food Research*, 4(2), 159. <https://doi.org/10.5539/jfr.v4n2p159>
- Ocheme, O. B., Adedeji, O. E., Lawal, G., & Zakari, U. M. (2015). Effect of Germination on Functional Properties and Degree of Starch Gelatinization of Sorghum Flour. *Journal of Food Research*, 4(2), 159. <https://doi.org/10.5539/jfr.v4n2p159>

- Olamiti, G., Takalani, T. K., Beswa, D., & Jideani, A. I. O. (2020). Effect of malting and fermentation on colour, thermal properties, functional groups and crystallinity level of flours from pearl millet (*Pennisetum glaucum*) and sorghum (*Sorghum bicolor*). *Heliyon*, 6(12), e05467. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05467>
- Oliveira, D. C. (2011). *Caracterização e potencial tecnológico de amidos de diferentes cultivares de mandioca (Manihot esculenta Crantz)* [Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina]. <http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/95768>
- Oliveira, L. de L. de, de Oliveira, G. T., de Alencar, E. R., Queiroz, V. A. V., & de Alencar Figueiredo, L. F. (2022). Physical, chemical, and antioxidant analysis of sorghum grain and flour from five hybrids to determine the drivers of liking of gluten-free sorghum breads. *LWT*, 153, 112407. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112407>
- Oliveira, L. M. de, Moro, T. de M. A., Clareto, S. S., Clerici, M. T. P. S., & Moraes, A. L. L. (2020). Influência da adição de linhaça e mucilagem de inhame nas características tecnológicas de bolo do tipo muffin para fenilcetonúricos. *Research, Society and Development*, 9(12), e2791210607. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i12.10607>
- Olojede, A. O., Sanni, A. I., & Banwo, K. (2020). Effect of legume addition on the physiochemical and sensorial attributes of sorghum-based sourdough bread. *LWT*, 118, 108769. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108769>
- Onamine, G. H., & Pinotti, R. (2020). *Alergia alimentar: alimentação, nutrição e terapia nutricional*. Editora Manole.
- Österlund, J., Winberg, A., & West, C. E. (2019). A 10-year review found increasing incidence trends of emergency egg allergy reactions and food-induced anaphylaxis in children. *Acta Paediatrica*, 108(2), 314–320. <https://doi.org/10.1111/apa.14464>
- Otero, D. M., & Ferreira-Ribeiro, C. D. (2019). Potential Bioactive Compounds of Unconventional Food Plants. *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal*, 22(2), 257–259. <https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2019.22.556225>
- Paiva, C. L., Netto, D. A. M., Queiroz, V. A. V., & Gloria, M. B. A. (2022). Germinated sorghum (*Sorghum bicolor* L.) and seedlings show expressive contents of putrescine. *LWT*, 161, 113367. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113367>
- Palacios, C. E., Nagai, A., Torres, P., Rodrigues, J. A., & Salatino, A. (2021). Contents of tannins of cultivars of sorghum cultivated in Brazil, as determined by four

- quantification methods. *Food Chemistry*, 337, 127970. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127970>
- Patel, J., Maji, B., Moorthy, N. S. H. N., & Maiti, S. (2020). Xanthan gum derivatives: review of synthesis, properties and diverse applications. *RSC Advances*, 10(45), 27103–27136. <https://doi.org/10.1039/D0RA04366D>
- Pawlak, C. (2015). *Desenvolvimento e Caracterização Físico-Química, Microbiológica e Sensorial do Pão Transmontano com azeitonas verdes descaroçadas do tipo “alcaparras”* [Dissertação (Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar)]. Instituto Politecnico de Bragança.
- Pinheiro, S. S., Anunciação, P. C., Cardoso, L. de M., della Lucia, C. M., de Carvalho, C. W. P., Queiroz, V. A. V., & Pinheiro Sant’Ana, H. M. (2021). Stability of B vitamins, vitamin E, xanthophylls and flavonoids during germination and maceration of sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Food Chemistry*, 345, 128775. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128775>
- Polesi, R. G., Rolim, R., Zanetti, ; Cândida, Sant’anna, V., & Biondo, E. (2017). Agrobiodiversidade e segurança alimentar no vale do taquari, RS: plantas alimentícias não convencionais e frutas nativas. *Revista Científica Rural*, 19, 118–135.
- Pontieri, P., Pepe, G., Campiglia, P., Merciai, F., Basilicata, M. G., Smolensky, D., Calcagnile, M., Troisi, J., Romano, R., del Giudice, F., Aletta, M., Guida, M., Alifano, P., & del Giudice, L. (2021). Comparison of Content in Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity in Grains of White, Red, and Black Sorghum Varieties Grown in the Mediterranean Area. *ACS Food Science & Technology*, 1(6), 1109–1119. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.1c00115>
- Portaria n.º 425/98 de 25 de julho. (n.d.). *Portaria n.º 425/98 de 25 de julho*.
- Przybylska-Balcerek, A., Frankowski, J., & Stuper-Szablewska, K. (2019). Bioactive compounds in sorghum. *European Food Research and Technology*, 245(5), 1075–1080. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3207-0>
- Quan, J., Panaccione, N., Jeong, J., Underwood, F. E., Coward, S., Windsor, J. W., Ronksley, P. E., Gidrewicz, D., deBruyn, J., Turner, J. M., Lebwohl, B., Kaplan, G. G., & King, J. A. (2021). Association Between Celiac Disease and Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, 72(5), 704–711. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000003051>

- Queiroz, V. A. V., da Silva, C. S., de Menezes, C. B., Schaffert, R. E., Guimarães, F. F. M., Guimarães, L. J. M., Guimarães, P. E. de O., & Tardin, F. D. (2015). Nutritional composition of sorghum [sorghum bicolor (L.) Moench] genotypes cultivated without and with water stress. *Journal of Cereal Science*, *65*, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.06.018>
- Rashwan, A. K., Yones, H. A., Karim, N., Taha, E. M., & Chen, W. (2021). Potential processing technologies for developing sorghum-based food products: An update and comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, *110*, 168–182. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.087>
- Ratnavathi, C. V. (2019). Grain Structure, Quality, and Nutrition. In *Breeding Sorghum for Diverse End Uses* (pp. 193–207). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101879-8.00012-7>
- Ratnavathi, C. V., & Komala, V. V. (2016). Sorghum Grain Quality. In *Sorghum Biochemistry* (pp. 1–61). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803157-5.00001-0>
- Regulamento de Execução (UE) n. ° 828/2014 da Comissão, de 30 de julho de 2014 , relativo aos requisitos de prestação de informações aos consumidores sobre a ausência ou a presença reduzida de glúten nos géneros alimentícios Texto relevante para efeitos do EEE, Jornal Oficial (2014). [http://data.europa.eu/eli/reg\\_impl/2014/828/oj](http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2014/828/oj)
- Regulamento (UE) n. o 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de Outubro de 2011 , relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, Jornal Oficial (2011). <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj>
- Resende, P. V. G., Silva, N. L. de M. e, Schettino, G. C. M., & Liu, P. M. F. (2017). Gluten related disorders. *Revista Médica de Minas Gerais*, *27*. <https://doi.org/10.5935/2238-3182.20170030>
- Riaz, T., Iqbal, M. W., Jiang, B., & Chen, J. (2021). A review of the enzymatic, physical, and chemical modification techniques of xanthan gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, *186*, 472–489. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.196>
- Ribeiro, E. P., & Seravalli, E. A. G. (2007). *Química de alimentos* (2nd ed.). Blucher.

- Rizzello, C. G., Lorusso, A., Montemurro, M., & Gobbetti, M. (2016). Use of sourdough made with quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour and autochthonous selected lactic acid bacteria for enhancing the nutritional, textural and sensory features of white bread. *Food Microbiology*, *56*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.018>
- Rodrigues, W. (2016). Competitividade e mudança institucional na cadeia produtiva de plantas medicinais no Brasil. *Interações (Campo Grande)*, *17*(2). <https://doi.org/10.20435/1984042X2016210>
- Rothschild, J., Rosentrater, K. A., Onwulata, C., Singh, M., Menutti, L., Jambazian, P., & Omary, M. B. (2015a). Influence of quinoa roasting on sensory and physicochemical properties of allergen-free, gluten-free cakes. *International Journal of Food Science & Technology*, *50*(8), 1873–1881. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12837>
- Rothschild, J., Rosentrater, K. A., Onwulata, C., Singh, M., Menutti, L., Jambazian, P., & Omary, M. B. (2015b). Influence of quinoa roasting on sensory and physicochemical properties of allergen-free, gluten-free cakes. *International Journal of Food Science & Technology*, *50*(8), 1873–1881. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12837>
- Saithalavi, K. M., Bhasin, A., & Yaqoob, M. (2021). Impact of sprouting on physicochemical and nutritional properties of sorghum: a review. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *15*(5), 4190–4204. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00969-9>
- Sajdakowska, M., Gębski, J., Żakowska-Biemans, S., & Jeżewska-Zychowicz, M. (2019). Willingness to eat bread with health benefits: habits, taste and health in bread choice. *Public Health*, *167*, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2018.10.018>
- Salazar-López, N. J., González-Aguilar, G., Rouzaud-Sáñez, O., & Robles-Sánchez, M. (2018). Technologies applied to sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench): changes in phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food Science and Technology*, *38*(3), 369–382. <https://doi.org/10.1590/fst.16017>
- Santos, M. R., Zimmer, F. C., Souza, A. H. P., Steinmacher, N. C., Detoni, E., & Rodrigues, Â. C. (2019). Adição de hidrocolóides em pães sem glúten seguido de enriquecimento com polpa de abacate (persea americana mill). *Brazilian Journal of Development*, *5*(7), 8018–8061. <https://doi.org/10.34117/bjdv5n7-033>

- Schnedl, W. J., Tillich, M., Schenk, M., Enko, D., & Mangge, H. (2020). Food intolerance/malabsorption may occur in rare diseases. *Intractable & Rare Diseases Research*, 9(2), 126–129. <https://doi.org/10.5582/irdr.2020.01029>
- Schwingshackl, L., Strasser, B., & Hoffmann, G. (2011). Effects of Monounsaturated Fatty Acids on Cardiovascular Risk Factors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 59(2–4), 176–186. <https://doi.org/10.1159/000334071>
- Sciarini, L. S., Ribotta, P. D., León, A. E., & Pérez, G. T. (2010). Effect of hydrocolloids on gluten-free batter properties and bread quality. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(11), 2306–2312. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02407.x>
- Serna-Saldivar, S. O., & Espinosa-Ramírez, J. (2019). Grain Structure and Grain Chemical Composition. In *Sorghum and Millets* (pp. 85–129). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811527-5.00005-8>
- Serventi, L. (2020). Cooking Water Composition. In *Upcycling Legume Water: from wastewater to food ingredients* (pp. 73–85). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-42468-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-42468-8_6)
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2018). Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(1), 41–58. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.003>
- Silva, B., & Andrade, L. P. de. (2022). Plantas indesejadas ou alimentos nutritivos? análise de aceitação e viabilidade do consumo de plantas alimentícias não convencionais (PANC's). *Diversitas Journal*, 7(1), 0082–0089. <https://doi.org/10.48017/dj.v7i1.2060>
- Silva, A. C. da. (2019). *Estudo do gengibre em pó e ácido láctico como agentes modificadores do amido de milho* [Dissertação de Mestrado, UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ]. <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/45893>
- Silva, P. M. L. da. (2016). *PRODUÇÃO DE PÃES DE FORMA COM ENZIMAS AMILOLÍTICAS:  $\alpha$ -AMILASE FÚNGICA E  $\alpha$ -AMILASE MALTOGÊNICA* [Universidade Federal do Paraná]. <https://hdl.handle.net/1884/45722>
- Silva, P. G., Kalschne, D. L., Salvati, D., Bona, E., & Rodrigues, A. C. (2022). Aquafaba powder, lentil protein and citric acid as egg replacer in gluten-free cake: A model

- approach. *Applied Food Research*, 2(2), 100188.  
<https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100188>
- Singh, A., Sharma, S., & Singh, B. (2017). Effect of germination time and temperature on the functionality and protein solubility of sorghum flour. *Journal of Cereal Science*, 76, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.06.003>
- Solé, D., Silva, L. R., Cocco, R. R., Ferreira, C. T., Sarni, R. O., Oliveira, L. C., & Oliveira, J. C. (2018). Consenso Brasileiro sobre Alergia Alimentar: 2018 - Parte 2. Diagnóstico, tratamento e prevenção. Documento conjunto elaborado pela Sociedade Brasileira de Pediatria e Associação Brasileira de Alergia e Imunologia. *Brazilian Journal Allergy and Immunology*, 2(1), 39–82.
- Souilem, F., Fernandes, Â., Calhêha, R. C., Barreira, J. C. M., Barros, L., Skhiri, F., Martins, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Wild mushrooms and their mycelia as sources of bioactive compounds: Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties. *Food Chemistry*, 230, 40–48.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.026>
- Spier, F., Zavareze, E. da R., Marques e Silva, R., Elias, M. C., & Dias, A. R. G. (2013). Effect of alkali and oxidative treatments on the physicochemical, pasting, thermal and morphological properties of corn starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(9), 2331–2337. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6049>
- Stutts, L. R., & Vermerris, W. (2020). Elucidating Anthracnose Resistance Mechanisms in Sorghum—A Review. *Phytopathology*®, 110(12), 1863–1876.  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-20-0132-RVW>
- Suas, M. (2012). *Advanced bread and pastry: a professional approach* (1 ed). Cengage Learning.
- Tolentino, D. C., Rodrigues, J. A. S., Pires, D. A. de A., Veriato, F. T., Lima, L. O. B., & Moura, M. M. A. (2016). The quality of silage of different sorghum genotypes. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 38(2), 143.  
<https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v38i2.29030>
- Tornisiello, A. L. (2019). *FARINHA DE ARROZ COMO ALTERNATIVA TECNOLÓGICA PARA O DESENVOLVIMENTO DE BISCOITOS SEM GLÚTEN E VEGANOS* [TCC (graduação), UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA]. <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/202944>

- Trappey, E. F., Khouryieh, H., Aramouni, F., & Herald, T. (2015). Effect of sorghum flour composition and particle size on quality properties of gluten-free bread. *Food Science and Technology International*, 21(3), 188–202. <https://doi.org/10.1177/1082013214523632>
- Uche-Anyia, E., & Lebwohl, B. (2021). Celiac disease: clinical update. *Current Opinion in Gastroenterology*, 37(6), 619–624. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000785>
- Regulamento (UE) N. ° 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de outubro de 2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, (2011).
- USDA. United States Department of Agriculture. (2022). *Food Composition Databases*. <https://Ndb.Nal.USda.Gov/Ndb/>.
- Vargas-Solórzano, J. W., Carvalho, C. W. P., Takeiti, C. Y., Ascheri, J. L. R., & Queiroz, V. A. V. (2014). Physicochemical properties of expanded extrudates from colored sorghum genotypes. *Food Research International*, 55, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.023>
- Verbauwhede, A. E., Lambrecht, M. A., Jekle, M., Lucas, I., Fierens, E., Shegay, O., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2020). Microscopic investigation of the formation of a thermoset wheat gluten network in a model system relevant for bread making. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(2), 891–898. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14359>
- Vintilă, I. (2021). Formulation for Food Intolerance. In *Food Formulation* (pp. 211–236). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119614760.ch11>
- Vitti, P. (2001). Pão. In Eugênio Aqualone (Ed.), *Biotechnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos* (Vol. 4, pp. 365–386). Edgard Blucher Ltda.
- Weerasooriya, D. K., Bean, S. R., Nugusu, Y., Ioerger, B. P., & Tesso, T. T. (2018). The effect of genotype and traditional food processing methods on in-vitro protein digestibility and micronutrient profile of sorghum cooked products. *PLOS ONE*, 13(9), e0203005. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203005>
- Wronkowska, M., Haros, M., & Soral-Śmietana, M. (2013). Effect of Starch Substitution by Buckwheat Flour on Gluten-Free Bread Quality. *Food and Bioprocess Technology*, 6(7), 1820–1827. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0839-0>

- Wu, G., Bennett, S. J., Bornman, J. F., Clarke, M. W., Fang, Z., & Johnson, S. K. (2017a). Phenolic profile and content of sorghum grains under different irrigation managements. *Food Research International*, *97*, 347–355. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.04.030>
- Wu, G., Johnson, S. K., Bornman, J. F., Bennett, S. J., & Fang, Z. (2017b). Changes in whole grain polyphenols and antioxidant activity of six sorghum genotypes under different irrigation treatments. *Food Chemistry*, *214*, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.089>
- Wu, Y., Li, X., Xiang, W., Zhu, C., Lin, Z., Wu, Y., Li, J., Pandravada, S., Ridder, D. D., Bai, G., Wang, M. L., Trick, H. N., Bean, S. R., Tuinstra, M. R., Tesso, T. T., & Yu, J. (2012). Presence of tannins in sorghum grains is conditioned by different natural alleles of *Tannin1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(26), 10281–10286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201700109>
- Xiong, Y., Damasceno Teixeira, T. V., Zhang, P., Warner, R. D., Shen, S., & Fang, Z. (2021). Cellular antioxidant activities of phenolic extracts from five sorghum grain genotypes. *Food Bioscience*, *41*, 101068. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101068>
- Xiong, Y., Zhang, P., Warner, R. D., & Fang, Z. (2019). Sorghum Grain: From Genotype, Nutrition, and Phenolic Profile to Its Health Benefits and Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *18*(6), 2025–2046. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12506>
- Xu, J., Blennow, A., Li, X., Chen, L., & Liu, X. (2020). Gelatinization dynamics of starch in dependence of its lamellar structure, crystalline polymorphs and amylose content. *Carbohydrate Polymers*, *229*, 115481. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115481>
- Xu, J., Wang, W., & Zhao, Y. (2021). Phenolic Compounds in Whole Grain Sorghum and Their Health Benefits. *Foods*, *10*(8), 1921. <https://doi.org/10.3390/foods10081921>
- Xu, M., Jin, Z., Simsek, S., Hall, C., Rao, J., & Chen, B. (2019). Effect of germination on the chemical composition, thermal, pasting, and moisture sorption properties of flours from chickpea, lentil, and yellow pea. *Food Chemistry*, *295*, 579–587. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.167>

- Yeşil, S., & Levent, H. (2022). The influence of fermented buckwheat, quinoa and amaranth flour on gluten-free bread quality. *LWT*, *160*, 113301. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113301>
- Zacharias, A. O., Carvalho, H. M. G., & Madeira, N. R. (2021). *Hortaliças PANC: segurança alimentar e nicho de mercado*. Brasília.
- Zhang, G., Xu, Z., Gao, Y., Huang, X., Zou, Y., & Yang, T. (2015). Effects of Germination on the Nutritional Properties, Phenolic Profiles, and Antioxidant Activities of Buckwheat. *Journal of Food Science*, *80*(5), H1111–H1119. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12830>
- Zhang, L., Li, Z., Qiao, Y., Zhang, Y., Zheng, W., Zhao, Y., Huang, Y., & Cui, Z. (2019). Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by a maltohexaose producing  $\alpha$ -amylase. *Journal of Cereal Science*, *87*, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.03.018>
- Ziobro, R., Witczak, T., Juszczak, L., & Korus, J. (2013). Supplementation of gluten-free bread with non-gluten proteins. Effect on dough rheological properties and bread characteristic. *Food Hydrocolloids*, *32*(2), 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.01.006>