



PPGAN
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
UNIRIO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

Carolina Thomaz dos Santos D'Almeida

**Impacto da extrusão no perfil metabolômico e na polimerização de
kafirinas de farinhas integrais de sorgo adicionadas de *Curcuma longa***

Rio de Janeiro

2020

Carolina Thomaz dos Santos D’Almeida

Impacto da extrusão no perfil metabolômico e na polimerização de kafirinas de farinhas integrais de sorgo adicionadas de *Curcuma longa*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Simões Larraz Ferreira

Rio de Janeiro

2020

D148

D'Almeida, Carolina Thomaz dos Santos

Impacto da extrusão no perfil metabolômico e na polimerização de kafirinas de farinhas integrais de sorgo adicionadas de Curcuma longa / Carolina Thomaz dos Santos D'Almeida. -- Rio de Janeiro, 2020.

73

Orientadora: Mariana Simões Larraz Ferreira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do

1. perfil fenólico. 2. UPLC-MSE. 3. solubilidade de proteínas. 4. SE-HPLC. I. Ferreira, Mariana Simões Larraz, orient. II. Título.

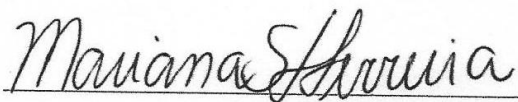
Carolina Thomaz dos Santos D'Almeida

**Impacto da extrusão no perfil metabólico e na polimerização de kafirinas de
farinhas integrais de sorgo adicionadas de *Curcuma longa***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

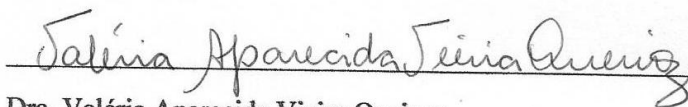
Aprovada em: 16/06/2020

BANCA EXAMINADORA



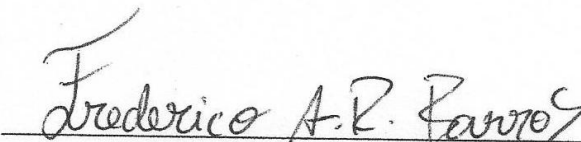
Dra. Mariana Simões Larraz Ferreira

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO



Dra. Valéria Aparecida Vieira Queiroz

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA



Dr. Frederico Augusto Ribeiro de Barros

Universidade Federal de Viçosa – UFV

Agradecimentos

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida para execução do Mestrado.

À FAPERJ e ao CNPq por financiarem a pesquisa, permitindo a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição por todo suporte que me foi oferecido durante esses dois anos.

À Embrapa Milho e Sorgo pelo fornecimento das amostras.

Agradeço especialmente à minha orientadora Profa. Dra. Mariana Simões Larráz Ferreira por me apresentar à carreira científica, por confiar no meu trabalho e pelas exigências que me fizeram aprender e crescer muito. É uma honra fazer parte da sua equipe. Quero, mais uma vez, expressar o meu reconhecimento e admiração pela sua competência.

À Dra. Cristina Yoshie Takeiti por todo auxílio com o projeto/artigo e por me dar total liberdade de propor e realizar as análises que antes não estavam previstas.

Aos meus pais Carlos Alberto e Claudia com todo o meu amor. Não tenho palavras para expressar a minha gratidão por tudo o que fizeram por mim ao longo da vida.

Ao meu namorado Rafael por ter sido a minha “válvula de escape” durante esses dois anos. Sempre sendo obrigado a ouvir as minhas explicações sobre sorgo, reclamações sobre análises que não deram certo e sendo compreensivo com a minha rotina. Não tenho como mensurar a sua importância nessa etapa. Obrigada por tudo.

A todos os membros do Laboratório de Bioativos por toda colaboração e cafés acompanhados de uma fatia de bolo. Sinto-me honrada em fazer parte desse *team* com pessoas tão incríveis e dedicadas. Vocês fazem o meu dia mais leve.

À Millena e Luciana por terem me abraçado no time da metabolômica, por dividirem todo conhecimento comigo e por todas as colaborações. Foram muitos processamentos refeitos, muitas brigas para reservar o Progenesis e noites viradas para cumprir prazos; mas com vocês se tornou fácil. Sem vocês não seria possível.

A Deus pelas oportunidades e por ter colocado na minha vida todas as pessoas acima citadas Sou grata por Seu amor infinito.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão dessa etapa da minha vida.

Muito obrigada!

RESUMO

O sorgo (*Sorghum bicolor* L.) apresenta-se como potencial substituto para cereais alergênicos pelos seus benefícios nutricionais, funcionais e também agrônômicos. Devido às transições demográficas e ambientais, há esforços para aumentar o consumo humano de sorgo. No entanto, os compostos fenólicos (CF) do sorgo, principalmente taninos, são capazes de formar complexos com as proteínas (kafirinas), diminuindo sua digestibilidade em até 50%. Os taninos também podem impactar na palatabilidade de produtos à base de sorgo, por isso a adição de flavorizantes pode enriquecer as propriedades sensoriais. Neste trabalho avaliou-se o efeito da extrusão no perfil de CF por UPLC-ESI-QTOF-MS^E e na solubilidade/polimerização das kafirinas por SE-HPLC em extrudados de sorgo integral, adicionados ou não de cúrcuma em pó em dois genótipos (rico em tanino - SC319, sem tanino - BRS330). Os CF livres e ligados foram extraídos separadamente. A capacidade antioxidante, pelos métodos DPPH, FRAP e teores de fenólicos por Folin-Ciocalteu (TPC), de proantocianidinas (TPAC) e flavonoides (TFC) foram determinados em microplacas. Os resultados de TPC variaram de 8,2 a 434,3 mg GAE/100 g (bs), foram superiores nos extratos ligados e mostraram forte correlação com a atividade antioxidante por FRAP e DPPH ($R > 0,90$; $p < 0,50$). No genótipo rico em tanino, a extrusão foi capaz de aumentar CF livres (+60%), que estavam ligados na matriz celular (-40%); enquanto no genótipo sem tanino esse processamento reduziu o teor em ambas as frações pela degradação de CF (-40%; -90%, respectivamente). Isso indica forte influência dos taninos nas alterações dos CF após extrusão. TPAC e TFC mostraram uma forte correlação negativa (0.9573, $p < 0.05$), indicando que a extrusão degradou as proantocianidinas e, conseqüentemente aumentou o teor de flavonoides. O perfil de CF por UPLC-ESI-QTOF-MS^E foi capaz de identificar tentativamente 58 CF livres e 100 CF ligados, além dos 23 CF em ambos os extratos. Além do maior número de identificações, os CF ligados apresentaram maior abundância (58%). Análises estatísticas multivariadas (PCA e OPLS-DA) indicaram diferenças no perfil de CF. Dos 10 CF discriminantes para cada extrato, destacaram-se os ácidos gentísico e 4-hidroxibenzoico exclusivos das amostras extrudadas em ambos os extratos. A análise metabolômica também revelou a presença de compostos bioativos como as isoflavonas (daidzein e genistein) pela primeira vez no sorgo. Por fim, o grau de polimerização das kafirinas foi analisado por SE-HPLC. O teor de kafirinas do BRS330 aumentou 1,2 vezes após a extrusão, enquanto que no genótipo SC319, este aumento foi de 2,6 vezes, especialmente devido à fração solúvel. O aumento da solubilidade das proteínas pode estar associado à desnaturação, despolimerização e descomplexação da proteína durante o processo térmico. A adição de cúrcuma aumentou a capacidade antioxidante e teor de fenólicos, sem impactar no processo de extrusão. Conclui-se que a extrusão mostrou-se eficaz na liberação de CF previamente ligados à matriz celular, na quebra de proantocianidina oligomérica e também na despolimerização levando à solubilização de kafirinas por mudanças estruturais. Estes resultados indicam que a extrusão impacta positivamente na digestibilidade das kafirinas, tornando-as mais acessíveis em extrudados de sorgo.

Palavras-chave: perfil fenólico; SE-HPLC; solubilidade de proteínas; UPLC-MS^E.

ABSTRACT

Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) is a potential substitute for allergenic cereals to its nutritional, functional and agronomic benefits. Due to demographic and environmental transitions, there are efforts to increase human consumption of sorghum. However, phenolic compounds (PC) of sorghum, mainly tannins, are able to form complexes with proteins (kafirins), decreasing their digestibility by up to 50%. Tannins can also impact the palatability of sorghum-based products, so the addition of flavorings can enrich sensory properties. In this work, the effect of extrusion on the PC profile by UPLC-ESI-QTOF-MS^E and on the solubility/polymerization of kafirins by SE-HPLC in extruded whole sorghum, added or not of turmeric powder in two genotypes (rich in tannin - SC319, non-tannin - BRS330) was evaluated. The free and bound PC were extracted separately. Antioxidant capacity by DPPH, FRAP and Folin-Ciocalteu (TPC) methods and proanthocyanidins (TPAC) and flavonoid (TFC) contents were determined in microplates. The results of TPC ranged from 8.2 to 434.3 mg GAE/100 g (bs), were higher in the bound extracts and showed a strong correlation with antioxidant activity by FRAP and DPPH ($R > 0.90$; $p < 0.50$). In the tannin-rich genotype, extrusion was able to increase free CF (+60%), which were bound in the cell matrix (-40%); while in the non-tannin genotype this processing reduced the content in both fractions by degradation of PC (-40%; -90%, respectively). This indicates a strong influence of tannins on PC changes after extrusion. TPAC and TFC showed a strong negative correlation (0.9573 , $p < 0.05$), indicating that extrusion degraded proanthocyanidins and consequently increased flavonoid content. The CF profile by UPLC-ESI-QTOF-MS^E was able to tentatively identify 58 free and 100 bound PC, in addition to the 23 PC in both extracts. In addition to the higher number of identifications, the bound PC presented higher abundance (58%). Multivariate statistical analyses (PCA and OPLS-DA) indicated differences in the PC profile. Metabolomic analysis also revealed the presence of bioactive compounds such as isoflavones (daidzein and genistein) for the first time in sorghum. Finally, the degree of polymerization of kafirins was analyzed by SE-HPLC. The kafirin content of BRS330 increased 1.2 times after extrusion, while in genotype SC319, this increase was 2.6 times, especially due to the soluble fraction. Increased protein solubility may be associated with denaturation, depolymerization and protein decomplexing during the thermal process. The addition of turmeric increased antioxidant capacity and phenolic content without impacting the extrusion process. It was concluded that extrusion was effective in releasing CF previously bound to the cell matrix, in the breakdown of oligomeric proanthocyanidin and also in depolymerization leading to the solubilization of kafirins by structural changes. These results indicate that extrusion positively impacts the digestibility of kafirins, making them more accessible in sorghum extruded.

Keywords: phenolic profile; SE-HPLC; protein solubility; UPLC-MS^E.

Lista de ilustrações

- Fig. 1:** Tecidos e composição do grão de sorgo. Fonte: Bean *et al.* (2016). 6
- Fig. 2:** Estrutura dos flavonoides na forma C6-C3-C6. 8
- Fig. 3:** Estrutura da 3-desoxiantocianidina..... 9
- Fig. 4:** Reações de um ácido fenólico com cadeias laterais amino de polipeptídeos. Fonte: Strauss and Gibson (2004). 13
- Fig. 5:** Scanning materials obtained in extrusion processing with cross and longitudinal section, where: 1 = Control (corn); 2 = Sorghum BRS330; 3 = Sorghum BRS330+turmeric; 4 = Sorghum SC319; and 5 = Sorghum SC319+turmeric. The scale bar is 1:3 cm. 29
- Fig. 6:** Metabolomic analysis: (A) number of identification of each sample; (B) total relative ion abundance of phenolic compounds; (C) distribution of phenolic classes in free (FPC) and bound (BPC) extracts. F: flavonoids; PA: phenolic acids; OP: other polyphenols; L: lignans; NI: non-identified. Different lowercase and uppercase letters mean a significant difference ($p < 0.05$) between free and bound extract samples, respectively. Bars represent standard deviation ($n=3$). 37
- Fig. 7:** Principal component analysis (PCA) biplot of sorghum samples in (A) free and (B) bound extracts. The samples (symbols) are distributed according to relative intensity of identified phenolic compounds (red circles). 44
- Fig. 8:** S-plot of orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) of (A) free and (B) bound extracts. In x axis is represented the relative magnitude of variables (phenolic compounds), and in y axis, the confidence/reliability. Variables farthest from the origin in the plot are deemed significant markers of raw flours (lower square) and extrudates (upper square). Insert graph represents the total relative ion abundance of discriminant compounds in red. 46
- Fig. 9:** Elution profiles obtained by SE-HPLC of soluble and insoluble kafirins from the sequential extraction of BRS330 (A and B) and SC319 (C and D) genotypes of sorghum samples and the content of monomers and polymers in each fraction (E and F). 48

Lista de tabelas

Tab. 1: Indexes for the evaluation of sample expansion.	30
Tab. 2: Phenolic content and antioxidant activities determined by different methods in sorghum extracts.....	33
Tab. 3: Most abundant phenolic compounds and reference standard compounds identified.....	39
Tab. 4: Percentage of protein extracted in each sample and in each extract.	50

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1. Origem e importância econômica do grão de sorgo.....	4
2. Estrutura e composição química	5
3. Compostos fenólicos no sorgo	7
4. As proteínas do sorgo e digestibilidade.....	10
5. Efeito da extrusão nas proteínas e compostos fenólicos do sorgo	13
6. Ferramentas metabolômicas para identificação de compostos fenólicos.....	15
CAPÍTULO 2 – NON-TARGETED METABOLOMIC OF PHENOLIC PROFILING AND KAFIRINS POLYMERIZATION IN WHOLEMEAL SORGHUM EXTRUDATES ADDED OF <i>CURCUMA LONGA</i>	18
1. Introduction.....	20
2. Material and methods	22
2.1. Chemicals and Reagents	22
2.2. Samples.....	22
2.3. Extrusion conditions	23
2.4. Free and bound phenolic compounds extraction	23
2.5. Total phenolic content (TPC)	24
2.6. Determination of antioxidant activity	24
2.7. Flavonoids acidified acetone extraction.....	25
2.8. Total proanthocyanidin content (TPAC)	25
2.9. Total flavonoid content (TFC).....	25
2.10. Metabolomic analysis of sorghum phenolic profile by UPLC-MS ^E	26
2.11. Kafirins size distribution analysis	27
2.11.1. Nitrogen content determination and kafirin extraction	27
2.11.2. Size Exclusion - High Performance Liquid Chromatography of kafirins....	27
2.12. Statistical analysis	28

3. Results and discussion.....	28
3.1. Evaluation of sample expansion	28
3.2. Phenolic compounds and antioxidant activity	31
3.3. Total proanthocyanidin and flavonoids content.....	34
3.4. Identification of phenolic compounds by UPLC-MS ^E	35
3.5. Changes in phenolic profile during sorghum extrusion.....	42
3.6. Changes in kafirin size distribution and solubility	47
4. Conclusions	52
CONCLUSÃO GERAL	53
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICES	63
TRABALHOS PUBLICADOS E FORMAÇÃO COMPLEMENTAR.....	63
MATERIAL SUPLEMENTAR	65

INTRODUÇÃO

Desde 1961 até 2009 a contribuição dos grãos para a manutenção da segurança alimentar mundial aumentou consideravelmente, enquanto a participação de cereais minoritários como o sorgo diminuiu (Khoury *et al.*, 2014). O sorgo (*Sorghum bicolor* L.) tem sido cultivado há séculos na África e na Ásia e, por ser um cereal especialmente adaptado à seca e ao calor (Steduto *et al.*, 1997; Kim & Day, 2011), países europeus como França e Itália têm voltado sua atenção para ele ao considerarem o aquecimento global e à estagnação da produção de grandes culturas, como o trigo.

Os grãos de sorgo têm ganhando ainda mais destaque, visto que este cereal se apresenta como uma alternativa não alergênica ao trigo e também devido ao efeito benéfico dos seus compostos fenólicos (CF) na saúde humana, principalmente na diminuição dos riscos de desenvolvimento de doenças crônicas (Stefoska-Needham *et al.*, 2015). Por exemplo, Ragaee *et al.* (2006) comparou os cereais trigo, cevada, milho e centeio com o sorgo e este mostrou o maior teor de compostos fenólicos.

Mesmo com esse importante potencial bioativo, os compostos fenólicos presentes nos grãos de sorgo, como os taninos, possuem grupos funcionais em suas estruturas que permitem a formação de complexos insolúveis com as proteínas (kafirinas ou prolaminas) por meio da formação de interações covalentemente hidrofóbicas que reduzem sua digestibilidade (Dunn *et al.*, 2015).

A digestibilidade é usada como um indicador da suscetibilidade de uma proteína à proteólise, permitindo melhor absorção de aminoácidos (Duodu *et al.*, 2003). As kafirinas, principal fração proteica do grão de sorgo (70-80%), são significativamente menos digeríveis do que as proteínas de outros cereais, como trigo e milho. Isso ocorre porque, além das interações com CF, as kafirinas têm maior propensão a formar pontes dissulfeto intermoleculares devido a maior proporção de frações reticuladas. Esse alto grau de polimerização aumenta a resistência dessas proteínas à protease (Belton *et al.*, 2006).

Em busca de soluções que apontem alternativas para um maior consumo humano do sorgo, vários processamentos térmicos, principalmente a extrusão, têm sido aplicados (Al-Rabadi *et al.*, 2011; Vargas-Solórzano *et al.*, 2014; Cardoso *et al.*, 2015; Anunciação *et al.*, 2017). Isso porque geralmente a extrusão promove a desnaturação

das proteínas e aumenta a exposição de sítios suscetíveis ao ataque de proteases, resultando em produtos com proteínas altamente digeríveis (Moreno *et al.*, 2017).

Em matrizes complexas como os cereais, o efeito do processamento pode impactar outros nutrientes e compostos bioativos presentes nestes alimentos. O efeito da extrusão sobre o teor e composição de CF ainda é ambíguo. Enquanto estudos relataram perda de conteúdo de CF e diminuição da capacidade antioxidante em sorgo, outros relataram aumento no conteúdo fenólico total em cereais extrudados (Al-Mamary *et al.*, 2001; Gumul & Korus, 2006; Afify *et al.*, 2012; Cardoso *et al.*, 2015). Mas de maneira geral, a extrusão tem sido vista como um processo promissor na produção de alimentos funcionais à base de cereais (Salazar-López *et al.*, 2016).

Embora o sorgo tenha potencial para substituir cereais que são extremamente utilizados em processos de extrusão, como o milho, sensorialmente o sorgo apresenta sabor amargo e adstringente, que podem ser desejados ou não no produto final (Kobue-Lekalake *et al.*, 2007; Anunciação *et al.*, 2017). No entanto, diversas especiarias utilizadas como flavorizantes, tais como a cúrcuma (*Curcuma longa*), podem ser adicionadas ao cereal durante a extrusão para melhorar a sua palatabilidade. Além disso, a cúrcuma tem ganhado destaque como ingrediente devido às suas propriedades nutricionais e biológicas, estas últimas principalmente relacionadas à diversidade de fitoquímicos presentes (Rajkumari & Sanatombi, 2017).

Dentro deste contexto, a combinação do uso da extrusão termoplástica e da adição de especiarias apresenta-se como uma boa alternativa para promover a utilização do sorgo para o consumo humano. No entanto, para caracterizar de maneira abrangente e compreender as modificações induzidas seja pelo processo da extrusão, pela adição de especiarias ou ainda pelo efeito de diferentes genótipos, o uso de técnicas sensíveis e confiáveis se faz necessária.

Esta complexidade química pode ser resolvida pela utilização de abordagens metabolômicas exploratórias (*non targeted*). As ferramentas metabolômicas destacam-se por serem capazes de identificar e quantificar uma ampla gama de metabólitos (compostos que tipicamente apresentam massa molecular inferior a 1500 Da) de um sistema ou organismo particular, estando entre as mais avançadas abordagens de mapeamento químico. No entanto, este tipo de estratégia foi pouco aplicada para o estudo de sorgo.

Este trabalho apresenta-se como um estudo original contendo uma estratégia moderna aplicada pela primeira vez para avaliar o efeito da extrusão termoplástica no perfil fenólico revelado pela UPLC-ESI-QTOF-MS^E e também na solubilidade das proteínas de reserva por distribuição de tamanho de polímeros (SE-HPLC) em extrudados de sorgo integrais adicionados ou não de cúrcuma em dois genótipos diferentes. Com isso, este trabalho tem como objetivo determinar o perfil e quantificar relativamente os CF do sorgo e avaliar as mudanças após extrusão e adição de cúrcuma em dois genótipos de grãos de sorgo brasileiro, com ou sem tanino.

O primeiro capítulo consiste de uma revisão bibliográfica onde são apresentados os principais aspectos deste trabalho: o sorgo desde sua domesticação até a sua produção, consumo e importância nos dias atuais; o crescente interesse e os desafios da aplicação do sorgo na alimentação humana; a extrusão termoplástica como processamento tecnológico capaz de potencializar o consumo de sorgo e as ferramentas analíticas avançadas para a caracterização dos CF como LC-MS-MS.

No segundo capítulo, será apresentado o artigo original submetido para publicação à revista *Food Chemistry*. O artigo é intitulado “*Non-targeted metabolomic of phenolic profiling and kafirins polymerization in wholemeal sorghum extrudates added of Curcuma Longa*”. Nele, extrudados de sorgo integral de dois genótipos (rico em tanino - SC319, sem tanino - BRS330) foram analisados e a cúrcuma em pó foi adicionada como flavorizante. O efeito da extrusão nos CF por UPLC-MS^E, a atividade antioxidante e a solubilidade das kafirinas (proteínas do sorgo) foram analisadas e análises estatísticas multivariadas foram aplicadas. O trabalho revela os efeitos da extrusão no perfil de compostos bioativos e de proteínas em extrudados de sorgo integral com vistas à sua futura aplicação como alimento funcional.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Origem e importância econômica do grão de sorgo

O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) é um cereal da tribo *Andropogonae*, pertencente à família das gramíneas *Poaceae*. Este grão é nativo da África, e foi domesticado entre 5.000 e 7.000 anos atrás. Nas Américas, o sorgo surgiu apenas durante os séculos XVII e XVIII, com a vinda de escravos africanos para trabalhar nas plantações de cana-de-açúcar e, com eles, foram introduzidas as primeiras sementes de sorgo no Continente (Borém *et al.*, 2014).

No Brasil há relatos de que entre 1920 e 1930 feirantes vendiam grãos de “Milho d’Angola” ou “Milho-da-Guiné”, nomes atribuídos ao sorgo no país, principalmente direcionados para a produção de pipoca. Foi a partir da segunda década do século XX que a cultura foi reintroduzida de forma ordenada no país através de institutos de pesquisa e universidades e foi consolidada entre 1960 e 1970 com a criação do Centro Nacional de Milho e Sorgo, atual Embrapa Milho e Sorgo, quando a produção e distribuição de sementes melhoradas foram desenvolvidas (Borém *et al.*, 2014).

Mesmo com o seu crescimento ao longo dos anos no Brasil, foram nos últimos 15 anos que a cultura de sorgo encontrou nichos de mercado que lhe deram estabilidade e status técnico comercial. Atualmente o Brasil ocupa a oitava posição entre os maiores países produtores de sorgo, alcançando 2 milhões de toneladas por ano (3,7% da produção mundial) e esse grão é o quarto cereal mais cultivado no país, perdendo apenas para trigo, arroz e milho (USDA, 2020).

Ainda que esteja situado entre os 10 maiores produtores mundiais, o Brasil considera a cultura do sorgo como *minor crops*, ou seja, cultura de pequena expressão no país, principalmente quando comparada à do milho e da soja. No entanto estima-se que a demanda pelo grão cresça, movida pela necessidade de reduzir o custo na alimentação animal. Devido ao aporte energético do grão e ao fácil cultivo, a incorporação do sorgo na alimentação animal diminuiria a demanda por milho (principal cereal para alimentação de aves, suínos e bovinos) no Nordeste e no Centro-Sul brasileiro. Ainda estima-se que haveria 10 milhões de hectares agrícolas capazes de expandir a cultura do sorgo no país (Duarte, 2010).

Embora o principal destino do sorgo no mundo seja para alimentação animal, ele ainda faz parte da dieta de aproximadamente 500 milhões de pessoas em mais de 30

países. Nestes, pode ser consumido como grão (para a produção de pipoca) ou transformados em farinha para fabricação de pães, papas e mingaus, com ou sem a adição de outras farinhas (Borém *et al.*, 2014).

2. Estrutura e composição química

O sorgo é uma espécie diploide que apresenta 10 cromossomos e um genoma de estrutura pequena (~800 Megabases) (Paterson *et al.*, 2009). Pertence à ordem *Poales*, família *Poaceae*, subfamília *Panicoidae*, gênero *Sorghum* e à espécie *Sorghum bicolor* L. Moench. O sorgo ainda pode ser dividido em cinco raças básicas: *caudatum*, *guinea*, *bicolor*, *kafir* e *durra*. Esta classificação permite diferenciar as raças utilizando poucas características, como a forma do grão e das glumas e panícula (Hermuth *et al.*, 2016).

A planta de sorgo é de clima tropical, de dias curtos, com temperatura ótima para o seu crescimento oscilando entre 16 e 38 °C e de precipitação anual entre 375 e 625 mm. Ela possui características xerofíticas, o que permite se manter dormente durante a seca, retomando o seu crescimento logo após reestabelecer as condições favoráveis (Wall & Ross, 1970).

Os grãos de sorgo estão localizados na extremidade da planta, na estrutura do tipo panícula. Tem um formato redondo, esférico e elíptico com diâmetro que varia entre 4 a 8 mm e peso entre 3 e 80 mg. O tamanho e peso variam em função do genótipo (Awika *et al.*, 2005). O grão é composto de três partes principais: tegumento (pericarpo, 4% da massa), germe (embrião, 10% da massa) e endosperma (tecido de reserva, 86% da massa) (Figura 1). Entre o pericarpo e o endosperma, existe ainda a membrana da semente, chamada de testa (Waniska, 2000; Earp *et al.*, 2004).

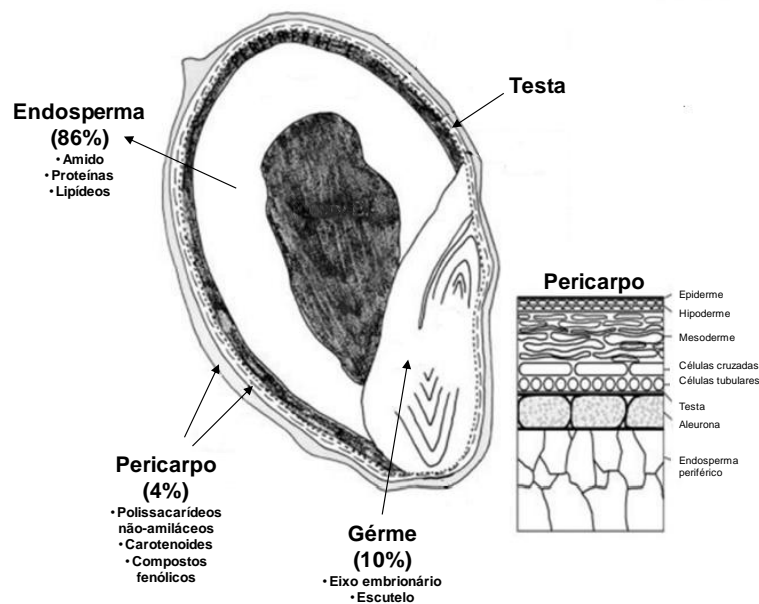


Fig. 1: Tecidos e composição do grão de sorgo. Fonte: Bean *et al.* (2016).

A testa é uma camada de células de paredes espessas, que pode ou não apresentar pigmentação e presença de taninos condensados, características estas que podem influenciar as qualidades nutricionais e sensoriais dos produtos alimentícios feitos a partir do grão. A presença do tanino está associada à tolerância e resistência dos grãos aos fungos, ataque de patógenos e de pássaros. Ressalta-se que a cor do grão não é um indicativo da presença de tanino, o grão pode ser branco ou de cor clara e apresentar tanino. A presença ou ausência da testa pigmentada é controlada pelos genes B_1 e B_2 , sendo necessário que ambos os genes estejam dominantes para o desenvolvimento da pigmentação. Além disso, esses genes, junto com os genes R e Y, também são importantes na determinação da cor do pericarpo, com variações entre branco, preto, amarelo e vermelho (Earp *et al.*, 2004).

O endosperma é um tecido envolto pela camada de aleurona, composto predominantemente por amido (82%), contendo frações de proteínas e lipídeos, 10 e 0,6%, respectivamente. O endosperma pode ser vítreo ou translúcido, contendo majoritariamente grânulos de amido ou corpúsculos proteicos, englobados em uma matriz mais ou menos proteica dependendo do tipo de endosperma, que pode ser vítreo ou translúcido, respectivamente (Waniska, 2000).

O germe do sorgo é firmemente aderido ao grão, e não se separa facilmente durante o processo de moagem. É composto pelo eixo embrionário, que gerará a nova

planta, e o escutelo, cujas células são responsáveis por armazenar nutrientes (Moharram & Youssef, 1995; Waniska, 2000).

Por fim, o pericarpo é a parte mais externa do grão e divide-se em três camadas: o epicarpo, o mesocarpo e o endocarpo. O epicarpo é constituído de células retangulares, geralmente com presença de pigmentos, e pode ser ou não coberto por uma fina camada de cera. O mesocarpo possui pequenos grânulos de amido em suas células, característica exclusiva do sorgo perante aos outros cereais. O endocarpo, a subcamada mais interna do pericarpo, consiste de células cruzadas e uma camada de células tubulares que transportam a umidade para o interior do núcleo. Em geral, o pericarpo é composto de polissacarídeos não-amiláceos, carotenoides e CF (3-desoxiantocianidinas, taninos e ácidos fenólicos, entre outros) (Waniska, 2000; Earp *et al.*, 2004).

3. Compostos fenólicos no sorgo

O sorgo apresenta quantidades apreciáveis de CF, que podem ser definidos como qualquer composto contendo um anel benzênico com uma ou mais hidroxilas. Os CF são produtos secundários do metabolismo das plantas, que agem como proteção contra insetos e doenças, e também possuem ação antioxidante *in vitro*. A composição quantitativa e qualitativa desses compostos varia conforme o genótipo e as condições ambientais de cultivo (Awika & Rooney, 2004; Dykes *et al.*, 2005).

Diversos estudos têm apontado os benefícios à saúde promovidos pelos compostos bioativos dos grãos de sorgo, principalmente devido à elevada capacidade antioxidante (Awika & Rooney, 2004; Dykes & Rooney, 2006). Quase todas as classes de fenólicos são encontradas no sorgo, mas principalmente os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos (Awika & Rooney, 2004; Dykes *et al.*, 2005).

Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são classificados como derivados do ácido hidroxibenzoico e derivados do ácido hidroxicinâmico. Em estudo realizado por Kamath *et al.* (2004), estes ácidos exibiram alta atividade antioxidante *in vitro* e, portanto, são considerados como potenciais promotores de benefícios para a saúde humana. O teor de ácidos fenólicos em algumas variedades de sorgo variou entre 135,5 a 479,4 µg/g (Afify *et al.*,

2011; Chiremba *et al.*, 2012), com grandes quantidades de ácido protocatecuico (150,3 a 178,2 µg/g) e ferúlico (120,5 a 173,5 µg/g) (Svensson *et al.*, 2010; Afify *et al.*, 2011).

Os ácidos fenólicos em cereais, incluindo o sorgo, estão principalmente ligados a cadeias de arabinoxilanos ou lignina (Dykes & Rooney, 2006; Afify *et al.*, 2011; Hole *et al.*, 2012). Esses ácidos fenólicos ligados não são hidrolisados por enzimas digestivas humanas, impactando na diminuição da biodisponibilidade, no entanto podem ser fermentados pela microbiota do cólon (Hole *et al.*, 2012).

Flavonoides

Os flavonoides, dentre os metabólitos secundários das plantas, são considerados o maior grupo de CF (Balasundram *et al.*, 2006). São caracterizados estruturalmente pela presença do esqueleto básico contendo 15 átomos de carbono na forma C6-C3-C6 (Figura 2) (Mazza & Brouillard, 1987).

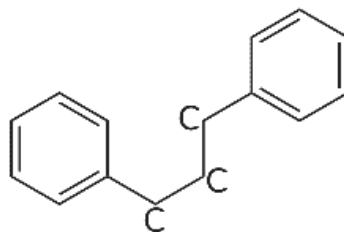


Fig. 2: Estrutura dos flavonoides na forma C6-C3-C6.

A maioria dos flavonoides do sorgo está localizada nas camadas externas do grão, e, portanto, diferenças na cor e espessura do pericarpo tem relação direta com a quantidade e o perfil dos flavonoides (Awika *et al.*, 2005; Dykes *et al.*, 2009). Embora a pigmentação da testa seja determinada por combinações genéticas, estes autores mostraram que farelos de sorgo marrom, que contém tanino, e de sorgo preto apresentaram uma atividade antioxidante 10 vezes superior ao farelo de sorgo branco e ao farelo de trigo vermelho. Ademais, farelo de sorgo preto apresentou o maior teor de 3-desoxiantocianina (19 mg/g) (Awika *et al.*, 2005)

Três subclasses de flavonoides estão presentes em grandes quantidades no sorgo: antocianinas, flavonas e flavanonas. As antocianinas correspondem a 79% do conteúdo de flavonoides e são um dos mais importantes pigmentos vegetais solúveis em água. Essa subclasse é biosintetizada pela via de fenilpropanoides através do metabolismo secundário das plantas, e podem estar na forma de glicosídeo (antocianina) ou aglicona

(antocianidina). Em grãos de sorgo, a principal antocianina encontrada é a 3-desoxiantocianidinas, conforme estrutura química representada na Figura 3 (Dykes & Rooney, 2006).

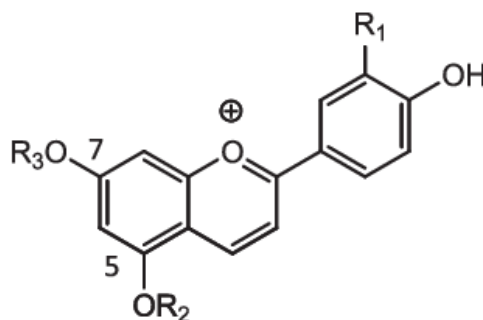


Fig. 3: Estrutura da 3-desoxiantocianidina.

As principais 3-desoxiantocianidinas do sorgo são as luteolinidinas e apigeninidinas, e seus derivados metoxilados, que possuem baixa distribuição na natureza (Awika & Rooney, 2004). Essa antocianina do sorgo apresenta vantagem comercial quando comparada com as antocianinas de frutas e hortaliças, uma vez que as 3-desoxiantocianidinas foram relatadas como mais estáveis em soluções ácidas em relação às antocianidinas presentes em frutas, legumes e outros cereais (Awika & Rooney, 2004), e são também considerados potenciais fontes de corantes alimentícios naturais (Awika & Rooney, 2004; Castañeda-Ovando, 2009).

Outra característica dos flavonoides tem sido apresentada em estudos, que relatam que flavonoides e ácidos fenólicos podem ser oxidados em quinonas por meio de oxigênio molecular em pH neutro a alcalino. As quinonas podem então formar peróxidos que são agentes oxidantes altamente reativos e podem provocar a oxidação de vários resíduos de aminoácidos e a polimerização de proteínas (Duodu *et al.*, 2003). Este poderia ser um mecanismo pelo qual os flavonoides e os ácidos fenólicos impedem a digestão de proteínas no sorgo.

Além disso, esses polifenóis possuem grupamento hidroxila na sua estrutura molecular, que podem interagir e formar complexos com proteínas. No entanto, não há evidências conclusivas de que tais interações causem uma redução na digestibilidade da proteína, diferente de taninos (Duodu *et al.*, 2003).

Taninos

Os taninos são metabólitos secundários encontrados em muitas espécies de plantas, são CF que frequentemente atuam como um mecanismo de defesa contra

patógenos e predadores (Kaufman *et al.*, 2013). No geral, esses compostos estão ausentes em outros cereais importantes, como arroz, trigo e milho, mas estão presentes principalmente em variedades de sorgo que têm testa pigmentada (Awika & Rooney, 2004; Dykes & Rooney, 2006; Wu *et al.*, 2012).

O teor de taninos em sorgo varia entre 0,2 e 48 mg/g e é mais alto justamente em grãos de sorgo com testa escura. Os taninos encontrados no sorgo são do tipo condensado, conhecidos como proantocianidinas e possuem alto peso molecular (Dykes & Rooney, 2006). Além do genótipo, o teor, assim como a atividade de taninos no sorgo, pode ser afetada pelas condições climáticas (Awika *et al.*, 2003; Dykes *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2016).

Os taninos são capazes de reduzir a disponibilidade de minerais, proteínas e amido no sorgo, mas a sua principal ação antinutricional é na diminuição da digestibilidade das proteínas (Al-Mamary *et al.*, 2001; de Mesa-Stonestreet *et al.*, 2010). O efeito antinutricional dos taninos de sorgo reside na sua capacidade de formar complexos menos digeríveis com as proteínas. Geralmente, as proteínas que se ligam fortemente ao tanino de sorgo são relativamente grandes, têm uma estrutura aberta e são ricas em prolina (Butler *et al.*, 1984).

Acredita-se que sob condições ótimas, o tanino do sorgo seja capaz de ligar e precipitar proteínas (devido aos grupamentos hidroxilas) pelo menos 12 vezes o seu próprio peso, ou seja, possui capacidade de ligar toda a proteína do grão (Duodu *et al.*, 2003; Afify *et al.*, 2011). Taylor *et al.* (2007) mostraram que, devido à essa complexação, a digestibilidade da proteína é reduzida em até 50%. Além disso, a moagem, o cozimento e outros métodos de processamento de sorgo com alto teor de tanino aumentam a possibilidade de interação do tanino com a proteína antes que esta encontre enzimas digestivas (Butler *et al.*, 1984).

4. As proteínas do sorgo e digestibilidade

As proteínas do grão de sorgo são classicamente divididas com base na solubilidade em diferentes solventes (Jambunathan *et al.*, 1975): albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em soluções salinas diluídas), kafirinas (prolaminas, solúveis em solução alcoólicas), kafirinas reticuladas (solução alcoólicas com agente redutor), glutelinas reticuladas (detergente com agente redutor em pH alcalino) e

resíduo proteico insolúvel (não extraído). Uma classificação mais simplificada para as proteínas de sorgo tem sido adotada dividindo-as em dois grupos: kafirinas e não-kafirinas, sendo as primeiras as mais abundantes (77-82%) (de Moraes Cardoso *et al.*, 2017).

As kafirinas são classificadas em grupos de acordo com o peso molecular aparente, solubilidade, estrutura e composição de aminoácidos. Dentre as três classes principais no sorgo estão: α -kafirinas (66-84%), β -kafirinas (8-13%) e γ -kafirinas (9-21%). As γ -kafirinas possuem o maior peso molecular (28 kDa), seguida da α - (23 e 25 kDa) e β - (20 kDa) (Belton *et al.*, 2006). Essas proteínas são sintetizadas e translocadas no lúmen do retículo endoplasmático, onde são formados os corpos proteicos. Esses corpos proteicos têm 0,4-2,0 μm de diâmetro e é constituído de β e γ -kafirinas reticuladas na camada externa (corpos proteicos periféricos) e α -kafirinas no seu interior. No endosperma do grão maduro, os corpos proteicos formam uma matriz com grânulos de amido, o que contribui para a dureza, digestibilidade e qualidade do processamento do sorgo (Labuschagne, 2018).

As α -kafirinas são ricas em aminoácidos não polares (prolina, leucina e alanina) e formam principalmente ligações dissulfeto intramoleculares; já as β e γ -kafirinas são proteínas ricas em cisteína que formam ligações dissulfeto intra e intermoleculares. Esse alto grau de polimerização das β e γ -kafirinas leva ao maior grau de resistência dessas proteínas à protease e como estas estão localizadas na periferia dos corpos proteicos, impedem a proteólise de α -kafirinas posicionadas internamente (Labuschagne, 2018). Assim, essa conformação tem sido apontada também como fator determinante na digestibilidade das proteínas do sorgo (Wu *et al.*, 2013). Além disso, as prolaminas do sorgo contêm uma proporção maior de frações reticuladas e são mais hidrofóbicas, explicando sua maior propensão a formar agregados proteicos adicionais em comparação com as prolaminas dos demais cereais (Belton *et al.*, 2006).

Além desse fator endógeno, ou seja da natureza das próprias proteínas e de sua organização dentro do grão, Duodu *et al.* (2003) citaram numerosos fatores exógenos que contribuem para o problema de digestibilidade do sorgo, como interação de proteínas com componentes não-proteicos (polifenóis, amido, polissacarídeos não-amiláceos, fitatos e lipídios). Dentre estes, o que tem chamado atenção é a interação entre proteínas e CF (Belton *et al.*, 2006).

A literatura apresenta possíveis mecanismos onde ácidos fenólicos e flavonoides interagem com as proteínas do sorgo, reduzindo sua digestibilidade (Duodu *et al.*, 2003). As explicações moleculares da interação proteína-CF são apresentadas na Figura 4. A porção difenol de um polifenol (**1**) é oxidada em uma ortoquinona (**2**), seja enzimaticamente, como ocorre nos tecidos vegetais, ou por oxigênio molecular. Essa ortoquinona pode formar um dímero numa reação lateral (**3**) ou reagir com cadeias laterais (amino/tiol) de polipeptídeos para formar ligações covalentes com o anel fenólico, com regeneração da hidroquinona (**4**). Este último pode ser reoxidado e se ligar a um segundo polipeptídeo, resultando em uma ligação cruzada (**5**). Caso contrário, duas ortoquinonas, cada uma carregando uma cadeia, podem dimerizar, produzindo também uma ligação cruzada (**6**) (Strauss & Gibson, 2004). Entretanto não existem evidências conclusivas que tais mecanismos reduzam a digestibilidade proteica.

Com isso, o tanino ainda é relatado como a principal classe de CF responsável pela redução na digestibilidade, devido à formação de complexos protéicos por meio dos grupamentos hidroxilas e à precipitação causada pelo tamanho dos taninos (Duodu *et al.*, 2003). No entanto, pode não ser essa precipitação propriamente dita que causa redução na digestibilidade, mas sim uma possível alteração na conformação das proteínas e seus efeitos estéricos, que impedem a acessibilidade das enzimas (Duodu *et al.*, 2003). Diante disso, vários processos tecnológicos, como a extrusão vem sendo estudados com o objetivo de melhorar a digestibilidade proteica em grão de sorgo (Luzardo-Ocampo *et al.*, 2020).

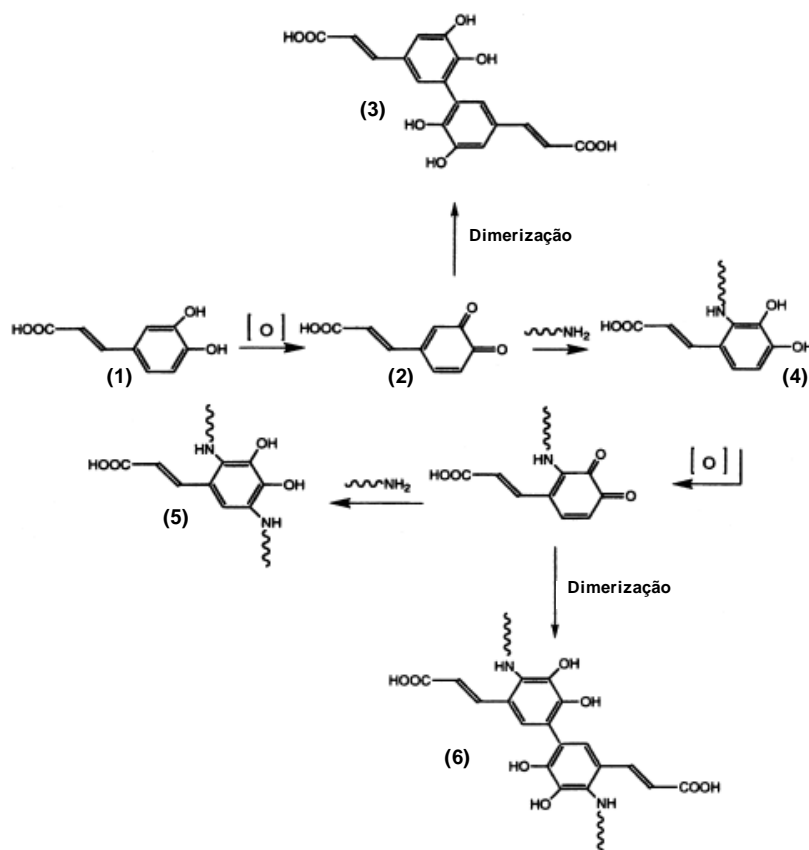


Fig. 4: Reações de um ácido fenólico com cadeias laterais amino de polipeptídeos.
Fonte: Strauss and Gibson (2004).

5. Efeito da extrusão nas proteínas e compostos fenólicos do sorgo

A extrusão é uma tecnologia de processamento relativamente moderna com a aplicação de alta temperatura em curto tempo (high temperature short-time - HTST), que foi inventada na década de 1940 para fabricação de *snacks* (Jozinović et al., 2016). Durante muitos anos, a extrusão foi aplicada para misturar e produzir macarrão e cereais prontos para o consumo, mas atualmente é amplamente utilizada nas indústrias alimentícias e na produção de rações para animais em todo o mundo, resultando numa ampla gama de produtos (Jozinović et al., 2016).

Nessa técnica a combinação de umidade, pressão, temperatura e cisalhamento mecânico resultam em transformações moleculares e reações químicas que permitem obter produtos expandidos e estrutura porosa (Moreno et al., 2017). Com isso, o interesse nos efeitos físico-químicos, funcionais e nutricionais promovidos pelo processamento aumentou, principalmente com relação à melhora nas propriedades

sensoriais e disponibilidade de nutrientes, além da inativação de compostos tóxicos e inibidores enzimáticos (Moreno *et al.*, 2017).

A extrusão tem sido aplicada no sorgo desde a década de 80 com o objetivo de aumentar a digestibilidade proteica (MacLean *et al.*, 1983), com relatos de um aumento de até 30% *in vitro* (Mertz *et al.*, 1984; Fapojuwo *et al.*, 1987). Esse fenômeno pode ser explicado pela desnaturação proteica causada pela temperatura e alto cisalhamento, levando à formação de produtos com proteínas altamente digeríveis (Moreno *et al.*, 2017). Essa técnica também é capaz de despolimerizar as proantocianidinas (taninos condensáveis), que, como relatado anteriormente, podem se complexar as proteínas e reduzir ainda mais a sua digestibilidade (Cardoso *et al.*, 2015).

Embora a digestibilidade proteica seja melhorada após o processamento, não há um consenso sobre o efeito da extrusão quanto aos compostos bioativos com propriedades antioxidantes, como os CF. Ao mesmo tempo em que a extrusão pode reduzir o conteúdo fenólico pela decomposição de CF termolábeis e promover a polimerização de outros; o processo também pode melhorar a acessibilidade fenólica por meio do rompimento de ligações com a parede celular e de ligações covalentes em complexos de polifenóis de alto peso molecular (Moreno *et al.*, 2017).

A classe dos flavonoides é a mais atingida pela extrusão devido a sua sensibilidade em altas temperaturas. Cardoso *et al.* (2015) observou a redução nos teores de diversos flavonoides (3-desoxianocianidinas, flavonas, flavononas) ao comparar o sorgo cru com o sorgo extrudado. Entretanto houve redução de polímeros de proantocianidinas e aumento de monômeros e dímeros, o que poderia interferir na digestibilidade. A extrusão também foi eficiente na redução de até 99% dos teores de proantocianidinas em três diferentes genótipos de sorgo com a presença de taninos, mas também reduziu os teores de fenólicos totais livres, o que não é desejado (Dlamini *et al.*, 2007).

Embora a extrusão reduza os fatores antinutricionais presentes no sorgo, os taninos residuais podem influenciar a palatabilidade e aceitação sensorial de novos produtos, principalmente atribuído ao seu gosto adstringente. Neste sentido, especiarias têm sido utilizadas para melhorar as propriedades sensoriais. Dentre as especiarias, a cúrcuma (*Curcuma longa* L.) em pó destaca-se do ponto de vista tecnológico e nutricional. Isso porque a cúrcuma apresenta baixa umidade (~9%) e alto teor de fibras (~10% b.s), o que influencia na dureza, expansão, cor e aceitação global de produtos

extrudados. Spinello *et al.* (2014) desenvolveram *snacks* de mandioca adicionados de 5% de cúrcuma e observaram boa aceitação global e características tecnológicas semelhantes aos produtos comerciais. A cúrcuma também foi capaz de agregar valores sensoriais, nutricionais funcionais a *snacks* de grãos de arroz quebrados (Oliveira *et al.*, 2020).

A cúrcuma é uma especiaria derivada do rizoma da planta *Curcuma longa*, pertencente à família *Zingiberaceae* (Tanvir *et al.*, 2017). Morfologicamente, a cúrcuma caracteriza-se como uma pequena erva aromática composta de um rizoma principal com várias ramificações menores. Cada rizoma mede até 10 cm de comprimento e quando cortados mostram uma superfície de cor alaranjada. Além disso, possui cheiro forte agradável e sabor aromático e picante, sendo amplamente utilizada como planta medicinal ou condimento (Mushtaq *et al.*, 2019).

Do ponto de vista nutricional, a cúrcuma possui alto teor de CF e antioxidantes. Até o momento, aproximadamente 235 compostos, principalmente fenólicos e terpenoides foram identificados de várias espécies de cúrcuma (Tanvir *et al.*, 2017). Esses compostos desempenham um papel importante na prevenção de doenças, como câncer, diabetes, doenças autoimunes, neurológicas e cardiovasculares (Kocaadam Bozkurt & Sanlier, 2015; Chanda & Ramachandra, 2019). Além disso, a cúrcuma é conhecida pela sua boa digestibilidade e, por isso, tem sido aplicada pela indústria no preparo de alimentos para fins especiais e para crianças (Spinello *et al.*, 2014).

Dentro deste contexto, a combinação do uso da extrusão e da adição de cúrcuma apresenta-se como uma boa alternativa para redução dos fatores antinutricionais do sorgo. No entanto, diante das transformações que podem após a extrusão e a adição de cúrcuma, técnicas sensíveis e confiáveis, como a espectrometria de massas, são essenciais para avaliar as alterações no perfil e teor das diferentes classes e subclasses de fenólicos.

6. Ferramentas metabolômicas para identificação de compostos fenólicos

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica utilizada para a identificação e quantificação de espécies químicas em suas formas ionizadas, através da medição de suas razões massa/carga em fase gasosa (m/z). Essa técnica tem sido cada vez mais utilizada na caracterização de matrizes complexas e elucidação de estruturas

comparando cromatogramas e espectros de massa de múltiplos estágios com padrões ou ainda com bibliotecas de dados.

A cromatografia líquida é um processo de separação de componentes de uma amostra por meio da interação diferencial desses componentes entre uma fase móvel e uma fase estacionária. Quando as análises feitas por MS ocorrem através de acoplamento com uma técnica de separação por LC, temos como resultado o aumento da velocidade das análises, seletividade de dados e possibilitando que um grande número de amostras seja analisado em um curto período de tempo (Ramirez-Ambrosi *et al.*, 2013). Por apresentar alta resolução e possibilidade de caracterização de uma ampla gama de compostos, a LC-MS provou ser uma ferramenta poderosa para identificar CF.

Abu-Reidah *et al.* (2015) utilizaram a LC-MS para identificação de CF da planta sumagre, que possui matrizes complexas como o sorgo. O estudo mostrou que a técnica é poderosa analiticamente para a separação e detecção, uma vez que foram identificados 211 compostos. Spínola *et al.* (2015) identificaram 128 metabólitos diferentes em frutas, sendo 39 relatados pela primeira no estudo. Santos *et al.* (2019), por meio da UPLC-MS-MS, identificaram tentativamente 237 fenólicos em sete diferentes genótipos de grãos de trigo brasileiro, incluindo inúmeros isômeros e compostos identificados em extratos nas formas livres e ligados.

No sorgo, o perfil detalhado dos CF foi analisado de maneira abrangente por técnicas de alta resolução como LC-MS-MS em 2016. Os autores identificaram 76 compostos em grãos integrais de sorgo Australiano, sendo a maioria dos CF reportados pela primeira vez (Kang *et al.*, 2016). Posteriormente, Rao *et al.* (2018) avaliaram seis variedades de sorgo Australiano utilizando LC-MS e identificaram 56 CF utilizando uma solução de acetona, água e ácido acético para a extração destes.

Recentemente o efeito da extrusão foi comparado entre dois genótipos de sorgo brasileiro aplicando espectrometria de massa com ionização por spray em papel (PS-MS). Os autores identificaram 49 compostos em modo de ionização negativo (Campelo *et al.*, 2020). Nesse caso, embora a identificação tenha sido eficaz, a utilização de métodos multiplexos como UPLC-MS^E é capaz de separar e aumentar a identificação de compostos com propriedades físico-químicas diferentes.

Neste tipo de método (MS^E), a formação de íons fragmentos, a partir da aplicação de alta energia na câmara de colisão, ocorre de forma simultânea à análise dos

precursores (aplicação de baixa energia) e permite que íons precursores e fragmentos (MS-MS) sejam detectados paralelamente, melhorando a identificação (Souza *et al.*, 2017). A utilização desta ferramenta em amostras complexas garante seletividade, sensibilidade, além da rapidez da análise (Ramirez-Ambrosi *et al.*, 2013). Oliveira *et al.* (2018) utilizaram o método para a análise e quantificação pela abundância relativa de compostos na planta medicinal *C. menthoides* e identificaram 107 compostos. Assim, com uma alta resolução e capacidade para caracterização de uma vasta gama de compostos bioativos polares, técnicas como UPLC-MS^E tem se mostrado uma poderosa ferramenta para identificar e quantificar CF.

Assim, dentro deste contexto, neste trabalho propõe-se a aplicação de ferramentas metabolômicas, utilizando-se da técnica UPLC-MS^E, para caracterizar as farinhas de sorgo integral e avaliar as transformações ocorridas após o processo de extrusão e adição de cúrcuma.

CAPÍTULO 2 – NON-TARGETED METABOLOMIC OF PHENOLIC PROFILING AND KAFIRINS POLYMERIZATION IN WHOLEMEAL SORGHUM EXTRUDATES ADDED OF *CURCUMA LONGA*

Carolina Thomaz dos Santos D’Almeida^{a,b}, Hamza Mameri^c, Neuri dos Santos Menezes^d, Carlos Wanderlei Piler de Carvalho^d, Valeria Aparecida Vieira Queiroz^e, L.C. Cameron^b Marie-Hélène Morel^c, Cristina Yoshie Takeiti^d, Mariana Simões Larraz Ferreira^{a,b*}

^a Laboratory of Bioactives, Food and Nutrition Graduate Program, Federal University of State of Rio de Janeiro, UNIRIO;

^b Center of Innovation in Mass Spectrometry, Laboratory of Protein Biochemistry, UNIRIO.

^c INRAE, Université de Montpellier, Montpellier SupAgro, CIRAD, UMR 1208 IATE, Montpellier, France

^d Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro - RJ, Brazil

^e Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, Brazil

*Corresponding author: E-mail: mariana.ferreira@unirio.br Phone +55 21 25427269

Abstract

Sorghum is a potential substitute for corn/wheat in cereal-based extruded products. Despite agronomic advantages and its phenolic compounds (PC), sorghum presents low digestibility due to the kafirins assembly and complexation with tannins. PC content/profile by UPLC-ESI-QTOF-MS^E and kafirins polymerization by SE-HPLC were applied to wholemeal sorghum extrudates; tannin-rich (#SC319) and tannin-free (#BRS330) genotypes with/without turmeric powder. Total phenolic, proanthocyanidin and flavonoid contents were strongly correlated with antioxidant capacity ($r > 0.9$, $p < 0.05$). Extrusion increased free (+60%) and decreased bound PC (-40%) in SC319, but reduced both (-40%; -90%, respectively) in BRS330. Accordingly, BRS330 presented lower PC abundance after extrusion, while in SC319 reduced only bound PC. Turmeric addition did not significantly impact antioxidants, metabolomic and kafirins profile. Tannins presence/absence impacted PC profiles and polymerization of kafirins which appears related to the thermoplastic process. The extrusion improved proteins solubility and can positively enhance their digestibility (PC-proteins interactions), making more accessible in sorghum extrudates.

Keywords: kafirins, SE-HPLC, *Sorghum bicolor*, turmeric, UPLC-MS^E.

1. Introduction

Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) is the fifth most produced cereal in the world (57 million tons in 2019) and in Brazil appears in the fourth position with 2.8 million tons in 2019 (USDA, 2019). Globally, only 40% of sorghum produced in the world is intended for human consumption, the rest is used for animal feed, alcohol and other industrial products (Palavecino *et al.*, 2019). Due to the demographic and environmental transitions, efforts to increase the contribution of sorghum for human consumption would be crucial since this grain represents a sustainable culture (i.e. drought tolerant and low-input consuming) being an alternative to other crops stagnation, besides to present beneficial health effect, mainly attributed to bioactive compounds (Stefoska-Needham *et al.*, 2015).

Sorghum is considered a rich source of phenolic compounds (PC) which beyond their role in plant metabolism and defense, present also several *in vitro* and *in vivo* bioactivities associated with health benefits. The cellular anti-inflammatory and radical scavenging activity being the most documented attribute (Awika *et al.*, 2009; Kim & Park, 2012; Moraes *et al.*, 2012). PC are mostly concentrated in the outer layers of sorghum grain (pericarp and testa layers), and almost all classes are found in sorghum, being phenolic acids, flavonoids and condensed tannins the most abundant PC.

Despite the well documented health benefits, sorghum presents an important issue for human consumption related to the presence of several digestion-related antinutritional factors such as tannins, trypsin inhibitors and phytic acid that decrease the bioavailability of some nutrients. Studies show that approximately 80% of sorghum PC are bound by covalent bonds to different components of the cell wall, which affects the accessibility of these bioactive compounds (Dykes & Rooney, 2006; Adarkwah-Yiadam & Duodu, 2017). As far as it could be documented in the literature, the main factor that affects this consumption is the presence of tannins in testa layer. Tannins reduce the availability of minerals and starch in sorghum (Al-Mamary *et al.*, 2001), and are also able to complex with sorghum storage proteins (kafirins or prolamins), making them less digestible by gastrointestinal proteases (Taylor *et al.*, 2007).

Kafirins, the main protein fraction of sorghum grain (70-80%), are found covalently cross-linked through intermolecular disulfide bonds in their native state in grain due to the high content of cysteine residues in their primary structure. Moreover,

they were shown to be more hydrophobic than their zein counterparts in corn and could form additional interactions with other molecules like tannins (Belton *et al.*, 2006). Both interactions increase the resistance of kafirins to the action of peptidases and further reduces digestibility. Due to their hydroxyl groups, tannins are able to complex all grain proteins reducing its digestibility by up to 50% (Duodu *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2007).

For that reason, since 1992 the only commercial sorghum cultivars in Brazil became non-tannin red grain hybrids, limiting the consumption of other varieties (Schaffert, 1992). Over time, several technological processes, such as extrusion, have been used to reduce the antinutritional factors and to promote the consumption of a more varieties of sorghum. This technology has been widely used in recent decades to produce food from cereals (Alam *et al.*, 2016). Thermoplastic extrusion is a continuous one-step process used in non-food and food industry that combines shear forces, high pressure and high temperature in a short time (Vargas-Solórzano *et al.*, 2014). Compared with other heat processes, this technology has some unique positive features, as it sterilises the finished product and retains natural colours and flavours of foods.

In addition, the extrusion process is able to break the covalent bonds in biopolymers, modify functional properties of food ingredients, denature undesirable enzymes and inactivate some antinutritional factors (trypsin inhibitors, tannins and phytates) (Singh *et al.*, 2007). Therefore, extrusion performs great technological and nutritional improvement of sorghum and motivates even more its use among cereal-base in this processing. During the process, an increase in water absorption, dough development time and viscous property in sorghum extrudate were reported (Jafari *et al.*, 2017), however the effects of extrusion can differ according to sorghum genotype due to the chemical composition (Vargas-Solórzano *et al.*, 2014).

Sensory acceptance, PC content and antioxidant capacity were increased in snacks sorghum-based extrudates when compared to wheat-based extrudates (Anunciação *et al.*, 2017). In fact, extrusion is able to change the content and profile of PC in cereals, because the decomposition of heat-labile PC and the depolymerization of others. The intense thermal processing of sorghum can improve its digestibility by application of dry heat that can depolymerize the condensed tannins and increase its bioavailability (Cardoso *et al.*, 2015). In addition, the protein digestibility is also improved after extrusion, due to protein denaturation and inactivation of antinutritional factors that impair digestion (Singh *et al.*, 2007).

To study these changes in the PC profile and their possible impacts on digestibility, sensitive tools are needed. Metabolomic approaches have been successfully used to reveal the comprehensive composition of plant metabolites and regulatory mechanisms. Multiplexed methods, such as UPLC-MS^E, are capable of separating compounds with different physicochemical properties and ensure selectivity, sensitivity, and rapid analysis (Ramirez-Ambrosi *et al.*, 2013). In this work, this type of strategy was applied for the first time to evaluate the effect of the thermoplastic extrusion on the PC profile determined by UPLC-ESI-QTOF-MS^E and also on the kafirins solubility by polymers size distribution (SE-HPLC) in wholemeal sorghum extrudates added or not of turmeric powder (*Curcuma longa*) in two different genotypes (tannin-rich and tannin-free).

2. Material and methods

2.1. Chemicals and Reagents

The following reference standards, as well as MS-grade acetonitrile and methanol, were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA): 2,5-dihydroxy benzoic acid, 2-hydroxycinnamic acid, 3,4-dihydroxy phenylacetic acid, 3-methoxycinnamic acid, 4-hydroxy benzaldehyde, 4-hydroxy phenylacetic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzyl alcohol, 4-methoxycinnamic acid, benzoic acid, caffeic acid, catechin, chlorogenic acid, ellagic acid, epicatechin, epigallocatechin, epigallocatechin gallate, flavonone, gallic acid, kaempferol, L-(–)-3-phenylacetic acid, myricetin, p-anisic acid, p-coumaric acid, pyrogallol, quercetin 3-O-glucoside, quercetin, synapinic acid, syringic acid, trans cinnamic acid, trans-ferulic acid, vanillic acid and vanillin. Formic acid was purchased from Fluka (Switzerland) and ultrapure water was obtained by Milli-Q (Millipore, France) purification system. Other unmarked reagents were of analytical grade.

2.2. Samples

Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], genotypes were cultivated from March to June of 2017, in the experimental area of Embrapa Milho and Sorgo, located at Sete Lagoas (Latitude S 19°27'57 ", Longitude W 44°14'49 ", Southeast Region, Brazil), where the climate is tropical in altitude, with hot and rainy summers and dry winters. The SC319 (red pericarp, pigmented testa and condensed tannins) and BRS330

(red pericarp, without pigmented testa and tannin-free) genotypes were harvested in mature stage (120 days after planting) and sent to Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro (Brazil). The whole grains were milled in a LM3600 disk mill (Perten Instruments AB, Huddinge, Sweden) set to aperture 2 between discs. Commercial fine corn grits were kindly donated by Granfino Alimentos (Nova Iguaçu, Brazil) was used as control. Turmeric (*Curcuma longa L.*) powder was commercially purchased in Rio de Janeiro city and chosen due to its high starch content (30-40%), which allowed for greater expansion of the product when compared to other spices such as cumin (*Cuminum cyminum*) and cayenne pepper (*Capsicum annum*) (data not shown). The purpose of adding turmeric is to soften the astringent flavor of sorghum and make it sensorially pleasant for future application as a snack.

2.3. Extrusion conditions

Sorghum whole grains from both genotypes (BRS330 and SC319) were ground in a LM3600 disk mill (Perten Instruments AB, Huddinge, Sweden) set to aperture 2 between discs. Sorghum flours with (BRS330+ and SC319+) and without turmeric powder (3%) and the control (corn grits) were added with 1% of iodized salt (NaCl) and processed using a single screw extruder (19/20DN, Brabender, Germany) fitted on a torque rheometer (Plast-Corder Lab-Station, Brabender, Germany) at 12% moisture content and constant screw speed of 280 rpm and temperature profile of 50, 90 and 130 °C. The solid feed rate was set at 4.5 kg/h, using a screw with 3:1 of compression ratio and circular die of 3 mm. Samples were collected, placed in a metallic trays and dried in a fan oven (60 °C for 4 h). After drying, they were sealed into plastic bags and stored at 7 °C for further analysis.

Expansion was determined by sectional expansion index, longitudinal expansion index (LEI) and volumetric expansion index (VEI) (Alvarez-Martinez *et al.*, 1988). Triplicate measurements were made on 10 randomly chosen pieces of extrudates from each run to calculate these indexes. For each test the diameter of the extrudates was measured with a Vernier caliper. Prior to analysis, samples were ground in a ball mill (Marconi, Brazil) to obtain a smaller particle size.

2.4. Free and bound phenolic compounds extraction

PC extraction was performed in triplicate according to Santos *et al.* (2019), with some modifications. Free PC (soluble) were extracted from 70 mg of sorghum flour

with 1 mL of 80% ethanol and stirred at 25 °C (200 rpm, 10 min). After centrifugation (5,000 x g, 25 °C, 10 min), the supernatant was removed and placed in a new eppendorf. Extraction was performed twice and the extracts obtained were pooled together. The bound PC (insoluble) were extracted from the remaining pellet of the previous extraction and submitted to alkaline (3.5 mL of 4M NaOH) and acid hydrolysis (concentrated HCl until pH 2.0). After centrifugation (5,000 x g, 25 °C, 5 min) the supernatants were washed with 7 mL of ethyl acetate and the supernatants were pooled together. Both extracts obtained (free and bound) were evaporated in an evaporator centrifuge (SpeedVac Savant, ThermoFisher Scientific, USA) and reconstituted in 500 µL of methanol, acetonitrile and Milli-Q water (2:5:93, v/v/v). The reconstituted extracts were filtered (0.22 µm, hydrophilic PTFE) (Analytical) and stored in vials at -80°C. These extracts were used for the determination of total phenolic content, antioxidant activity and metabolomic analysis.

2.5. Total phenolic content (TPC)

The total reducing compounds of Folin-Ciocalteu reagent in the extracts was determined in triplicate according to (Singleton *et al.*, 1999) adapted for microplates. One hundred µL of the extracts (free and bound) were deposited in test tubes and added with of 700 µL of Milli-Q water. After homogenization, 50 µL of Folin-Ciocalteu reagent and 150 µL of 20% sodium carbonate were added. The mixture was incubated (30 min, 40 °C) and 300 µL of the final solution were transferred to a microplate. Absorbance readings at 750 nm were performed on a microplate reader (FlexStation III, Molecular Devices). A gallic acid standard curve was used for the quantification of phenolic content and results were expressed as mg gallic acid equivalents (mg GAE/100 g of sample, in dry basis).

2.6. Determination of antioxidant activity

The antioxidant activities were determined in triplicates by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging method and ferric reducing antioxidant power (FRAP) adapted to microplates (Sompong *et al.*, 2011) For the DPPH method, an aliquot of 20 µL of each extract was combined with 280 µL of DPPH solution (32 µg/mL) in test tubes, incubated for 30 min in the dark at 25 °C and transferred to a microplate. For FRAP assays, freshly prepared FRAP reagent consisting of acetate buffer (0.3 M, pH 3.6), FeCl₃.6H₂O (20 mM) and TPTZ solution (10 mM) in a ratio of

10:1:1 was used. An aliquot of 20 μL of each extract was combined with 15 μL Milli-Q water and 265 μL of FRAP reagent, gently vortexed and incubated for 30 min at 37 °C. Both absorbances were measured at 715 nm and 595 nm, respectively, using a microplate reader. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) was used as standard to quantify and results were expressed as mg trolox equivalents (mg TE/100 g of sample, dry basis).

2.7. Flavonoids acidified acetone extraction

Flavonoids and proanthocyanidins were extracted according to Rao *et al.* (2018), with some modifications. A solution containing acetone, water and acetic acid (70:29.5:0.5, v/v/v) was used at a ratio of 1:20 (w/v) and stirred for 1 h at 25 °C (200 rpm). The extracts were centrifuged (12,000 xg, 10 min, 25°C) and extraction was performed three times. The supernatants were pooled together before acetone evaporation (Savant, SpeedVac., ThermoFisher Scientific, USA). Dried extracts were reconstituted with 500 μL of methanol 50%, filtered (0.22 μm hydrophilic PTFE) (Analytical) and stored in vials at -80°C until use.

2.8. Total proanthocyanidin content (TPAC)

The condensed tannin (proanthocyanidins) content was determined in triplicate based on the vanillin assay according to Rao *et al.* (2018) with some modifications. Fifty μL aliquot of reconstituted sorghum acidified acetone extract was combined with 125 μL of 1% (w/v) vanillin and 125 μL of 25% sulphuric acid, both prepared in methanol. The mixture was then incubated at 37 °C for 15 minutes and the absorbance was measured at 500 nm on a microplate reader. TPAC was carried out using a (+)-catechin standard curve and results were expressed as mg (+)-catechin equivalents (mg CE/ g of sample, dry basis).

2.9. Total flavonoid content (TFC)

The total flavonoid content was determined in triplicate according to Zhou *et al.* (2014) adapted to microplate. An 100 μL aliquot of the acetone extract was mixed in test tubes with 500 μL of Milli-Q water and 30 μL of 5% sodium nitrite. After 5 min incubation, 30 μL of 10% AlCl_3 was added and kept in the dark for 6 minutes. Then 200 μL of 1M NaOH was added, followed by the addition of 200 μL of Milli-Q water. The

absorbance was immediately measured at 510 nm and the standard curve was calculated using a (+)-catechin. TFC content was expressed as mg CE/g of sample (dry basis).

2.10. Metabolomic analysis of sorghum phenolic profile by UPLC-MS^E

The determination of phenolic profile was performed by mass spectrometry according to Santos *et al.* (2019) with modifications. Two μL of each sample were injected into UPLC Acquity system (Waters, USA) coupled with XEVO G2S Q-ToF (Waters, England) equipped with ionization source electrospray. For chromatographic separation, an UPLC HSS T3 C18 column (100 x 2.1 mm, 1.8 μm particle diameter; Waters) at 30 °C and flow rate of 0.5 mL/min of the mobile phases was used: Milli-Q water containing 0.3% formic acid and 5 mM ammonium formate (A); and acetonitrile containing 0.3% formic acid (B), according to the gradient: 0 min - 97% A; 11.80 min - 50% A; 12.38 min - 15% A; 14.23 min - 15% A; 14.70 min - 97% A. Data were acquired in MS^E mode using argon as collision gas, applying low and high collision energy with a ramp from 30 to 55 V. Acquisitions were performed in negative and centroid mode between m/z 50 and 1000 and the ionization conditions: cone voltage 30 V, capillary voltage 3.0 kV; desolvation gas (N_2) 1,200 L/h at 600 °C; cone gas 50 L/h and source at 150 °C. All acquisitions were performed using leucine enkephalin (m/z 554.2615, [M-H]⁻) for lock mass calibration. A mix containing 33 analytical standards of PC was prepared at 10 ppm and injected in triplicate prior to the injection of the samples to ensure the reproducibility of the instrument and to confirm PC identification.

Data processing was performed with the software Progenesis QI (Waters) and the identification based on standards runs parameters such as isotope distribution of neutral mass, exact mass, retention time and MS/MS fragments spectra. Non-targeted identification was carried out with customized database built from PubChem applying MetaScope, an integrated search tool. The following parameters were applied in descending order of importance: exact mass error (<10 ppm); isotopic similarity (>80%); score (>30) and score of fragmentation, generated by the software. Phenol explorer database, data from the literature and chemical characteristics of the molecule were also used to help the tentative identification of unknown compounds. In addition, only compounds present in the three technical replicates (3/3), where each vial contains a pool of three true replicates, and CV <30% were considered as tentatively identified.

2.11. Kafirins size distribution analysis

2.11.1. Nitrogen content determination and kafirin extraction

Nitrogen content was determined according to Kjeldahl method using 5.7 as conversion factor to protein. To compare the degree of polymerization of alcohol-soluble kafirins, before and after extrusion, two extractions protocols were performed in two replicates each one, using a 20:1 solvent-to-sample ratio: 1) sequential extraction to recover respectively soluble kafirins using of 60% tert-butyl alcohol (TB), then pellet extraction of insoluble cross-linked kafirins with 60% tert-butyl alcohol and 20 mM of dithioerythritol (TBD) to reduce disulfide bonds; 2) direct extraction to recover total alcohol-soluble kafirins (TBD) (soluble and cross-linked kafirins). Briefly, (1) soluble kafirins were extracted by dispersing 50 mg of sorghum flour with 1 mL of TB 60% and stirred at 20°C for 60 min. After centrifugation (10 min, 14,000 rpm, 20°C), the supernatant was recovered and stored in a new tube. The procedure was repeated twice but with 20 min stirring and the supernatants were pooled with a final volume of 4 mL (TB); (2) the resulting pellet from the previous extraction was dispersed in 1 mL of TB and 20 mM of dithioerythritol, the extraction followed the same parameters as the extraction (1), resulting in the final volume of 4 mL of insoluble kafirins; (3) in the direct extraction, the flour was dispersed directly in 1 mL of TBD using the same steps as above and the final volume was 4 mL of total kafirins.

2.11.2. Size Exclusion - High Performance Liquid Chromatography of kafirins

SE-HPLC analysis was performed in triplicate after protein extraction for both size distribution and protein content analysis. Prior to analysis, all the supernatants were centrifuged to remove residual insoluble flour and diluted in the mobile phase 50% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid in water. The SE-HPLC analysis was performed using Waters chain equipped with a UV detector to record the absorbance at 214 nm. A volume of 15 μ L was injected to the Phenomenex Bio SEP SEC 2000 column with the flow of 0.5 mL/min. The data were collected with the help of Empower software. The mass calibration of the device was carried out by injecting purified wheat gliadins of the known molecular weight previously determined by mass spectrometry. For protein quantification, the area under the curve was integrated using a response coefficient determined experimentally. The coefficient determination was based on protein content pre-determined by Kjeldahl.

2.12. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using XLSTAT software (Addinsoft, France), where the values of abundance obtained from ion mass spectra were used to relative quantification and for statistical evaluation of the data (One-way Anova, post-test Tukey, $p < 0.05$). The principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) was also employed to the multivariate data generated from the UPLC-MS^E, performed by XLSTAT and EZinfo 3.0 (Waters), respectively.

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of sample expansion

Visually, the control extrudate (corn) showed greater expansion followed by BRS330 and SC319 sorghum extrudates (Figure 5). When turmeric was added, the flavored extrudates show less visual expansion when compared to the extrudates without turmeric addition. Visual results are corroborated by the expansion index values (Table 1). It was noted that the addition of turmeric to both genotypes did not affect the radial (REI) and volumetric expansion; however, the longitudinal expansion of both genotypes decreased with turmeric. These expansion differences result in distinct texture profile. The expansion of corn (control) caused irregular formation of the alveoli in shape and number, besides the noticeable presence of grits in the microstructure, which was translated into higher compression force and observed standard deviation (F); and lower total number of breaking peaks (N_0).



Fig. 5: Scanning materials obtained in extrusion processing with cross and longitudinal section, where: 1 = Control (corn); 2 = Sorghum BRS330; 3 = Sorghum BRS330+turmeric; 4 = Sorghum SC319; and 5 = Sorghum SC319+turmeric. The scale bar is 1:3 cm.

Among all materials, the extruded BRS330+ showed homogeneity of the formed microstructure and thus has the lowest compressive strength and the highest N_0 (most crunchy). The water absorption by the materials was slightly influenced by sorghum genotype or by turmeric powder addition. SC319 extrudates and SC319+ extrudates had the highest values (Table 1), which can be attributed to starch content, amylose: amylopectin ratio and resistant starch content as the turmeric roots have an average of 30% starch, similar to potato starch, that shows higher expansion (Kristiawan *et al.*, 2016).

Tab. 1: Indexes for the evaluation of sample expansion.

Sample	REI	VEI	LEI	F (N)	N ₀	WSI (%)	WAI (%)
Control	3.82±0.02 ^a	0.56±0.01 ^a	8.12±0.28 ^a	9.73±5.97 ^a	47.07±14.3 ^a	13.25±1.25 ^{ab}	5.48±0.06 ^a
SC 319 extrudate	2.62±0.09 ^c	0.99±0.05 ^c	6.79±0.48 ^c	7.15±2.07 ^b	50.21±9.89 ^b	14.99±1.36 ^{ac}	5.11±0.14 ^b
SC319+ turmeric	2.47±0.11 ^c	1.03±0.03 ^c	6.32±0.55 ^c	6.36±1.51 ^b	53.07±4.62 ^{ab}	16.71±0.88 ^c	5.19±0.09 ^b
BRS 330 extrudate	2.94±0.13 ^b	0.88±0.01 ^b	7.54±0.73 ^b	6.23±1.84 ^b	51.93±10.4 ^{ab}	11.55±1.02 ^b	5.34±0.07 ^{ab}
BRS330+ turmeric	2.94±0.13 ^b	0.85±0.03 ^b	7.37±0.51 ^d	6.18±1.84 ^{ab}	57.43±6.25 ^{ab}	12.50±1.20 ^{ab}	5.39±0.08 ^a

Different letters in columns mean significant difference ($p < 0.05$) between samples. REI (radial expansion index), VEI (volumetric expansion index), LEI (longitudinal expansion index), F (maximum compression force), N₀ (total number of peaks), WSI (water solubility index) and WAI (water absorption index).

3.2. Phenolic compounds and antioxidant activity

The total phenolic content (TPC) was determined in both, free and bound forms, in the different extruded sorghum samples but also in raw sorghum flour for comparison purposes (Table 2). The TPC (free + bound) showed variations among different samples ranging from 8.28 to 620 mg GAE/100 g. Among sorghum genotypes, SC319 showed notably higher TPC (607.18 ± 9.52 mg GAE/100 g) than BRS330 (49.25 ± 1.81 mg GAE/100 g) in extrudates. This drastic difference (-92%) can be explained by the absence of tannins in the BRS330 genotype (Rao *et al.*, 2018). In fact, the TPC of SC319 extrudates in the present study, was six fold greater than that found previously (111 mg GAE/100 g) (Anunciação *et al.*, 2017). This change can be attributed to the crop effect between the same genotype harvested in different years (2013 and 2017) and by different extrusion parameters between the two studies.

When each extract (free and bound) were separately analysed, raw flours had higher levels of bound than free phenolics, corresponding to 62% and 56% (SC319 and BRS330, respectively) of the TPC. Indeed, the bound fraction is well known to contribute with the largest fraction of the total phenolic content in cereals (Dykes & Rooney, 2006; Santos *et al.*, 2019). However, after the extrusion process, this profile is reversed free compounds count to 60% and 80% of TPC for SC319 and BRS330, respectively. Moreno *et al.* (2017) reported that extrusion can disrupts cell wall matrices and breaks covalent bonds in high molecular weight polyphenol complexes, improving the phenolic accessibility. The hypothesis is that the high temperature applied in the thermoplastic extrusion led to this rupture and, consequently, the changes in the sorghum phenolic profile (increasing the content of the free PC). Another hypothesis that can be postulated is that Maillard reaction products may have been quantified as PC, since they show a reducing capacity.

The addition of turmeric in SC319 did not change the TPC, however it was observed a reduction in free (-10%) and an increase (+25%) in bound phenolics. This variation was even greater in BRS330 that shows 28% of reduction in free phenolics content and 85% of increase in bound phenolics after turmeric addition. The decrease in free and increase in bound phenolics may be explained by the addition of turmeric that,

during the process, favored the decarboxylation of free phenolic acids that may, in turn, promoted polymerization of phenolic acids (Moreno *et al.*, 2017).

As expected, the antioxidant activity, measured by DPPH and FRAP methods, showed a strong correlation with TPC (0.9933, $p < 0.05$; and 0.9497, $p < 0.05$, respectively). The DPPH showed variations among different samples ranging from 13.5 to 167.7 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ while FRAP showed varied from 15.1 to 97.7 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ (Table 2). After extrusion, for both genotypes, SC319 and BRS330, the free extracts were, respectively, 57% and 74% (DPPH) and 54% and 69% (FRAP) higher than in raw flour samples. This higher antioxidant activity of free extracts can be attributed to the higher TPC in these extracts, but also, to the decarboxylation of PC during extrusion due to the high temperatures, increasing their antioxidant capacity (Moreno *et al.*, 2017).

Through these different methods (TPC, DPPH and FRAP) it is possible to observe that the extrusion of SC319 genotype increased the total phenolic content and the antioxidant activity, whereas for BRS330 genotype a decrease in both results was observed. As both genotypes were subjected to the same extrusion parameters, the hypothesis of this different behavior can be associated with the proanthocyanidin-rich composition of the first genotype. As proanthocyanidins are derived from flavyllic salts and are sensitive to high temperatures, the increased content may due to the formation of monomers and dimers caused by the breakdown of the cell wall of its food matrix, corroborating the previously mentioned free phenolic results (Khanal *et al.*, 2009).

Tab. 2: Phenolic content and antioxidant activities determined by different methods in sorghum extracts.

Sample	Extract	TPC (mg GAE/100 g)	DPPH (μ mol TE/100 g)	FRAP (μ mol TE/100 g)	TPAC (mg CE/g)	TFC (mg CE/g)
Control	Free	11.63 \pm 1.16 ^g	4.12 \pm 2.50 ^f	4.61 \pm 0.36 ^f	0.00 \pm 0.02 ^a	0.00 \pm 0.02 ^a
	Bound	16.23 \pm 2.46 ^F	10.65 \pm 1.61 ^E	18.26 \pm 0.79 ^F		
SC319 raw flour	Free	177.44 \pm 8.60 ^c	55.76 \pm 2.61 ^c	12.56 \pm 1.70 ^{ef}	27.11 \pm 0.98 ^b	5.21 \pm 0.33 ^b
	Bound	283.65 \pm 12.91 ^A	72.42 \pm 5.41 ^A	46.22 \pm 3.50 ^A		
SC319 extruded	Free	434.34 \pm 8.37 ^a	105.62 \pm 1.32 ^b	55.78 \pm 0.83 ^b	9.79 \pm 0.85 ^c	7.63 \pm 0.25 ^c
	Bound	172.34 \pm 0.80 ^C	45.63 \pm 0.99 ^B	25.88 \pm 1.17 ^C		
SC319+ turmeric	Free	390.80 \pm 2.02 ^b	127.65 \pm 3.05 ^a	67.79 \pm 1.17 ^a	12.73 \pm 1.49 ^d	8.29 \pm 0.08 ^d
	Bound	228.65 \pm 5.81 ^B	40.08 \pm 3.80 ^C	29.87 \pm 0.41 ^B		
BRS330 raw flour	Free	68.35 \pm 4.13 ^d	30.47 \pm 0.93 ^d	24.90 \pm 0.91 ^c	0.83 \pm 0.02 ^e	0.21 \pm 0.06 ^c
	Bound	85.58 \pm 2.07 ^D	29.51 \pm 1.63 ^D	23.44 \pm 1.25 ^D		
BRS330 extruded	Free	41.07 \pm 1.67 ^e	10.65 \pm 0.82 ^e	11.50 \pm 0.24 ^e	1.71 \pm 0.06 ^f	0.80 \pm 0.07 ^f
	Bound	8.19 \pm 1.13 ^G	2.80 \pm 2.07 ^F	3.58 \pm 0.98 ^G		
BRS330+ turmeric	Free	29.76 \pm 0.61 ^f	9.30 \pm 0.91 ^f	14.59 \pm 0.78 ^d	1.98 \pm 0.24 ^g	1.25 \pm 0.01 ^g
	Bound	53.21 \pm 2.58 ^E	15.69 \pm 1.72 ^E	21.20 \pm 0.09 ^E		

Results are expressed per g or 100 g sorghum sample in dry basis. Different letters mean a significant difference ($p < 0.05$) in the same column between the same extracts: free (lower case) and bound (upper case). GAE (gallic acid equivalent), TE (Trolox equivalent), CE (catechin equivalent), TPC (total phenolic content), DPPH (2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), FRAP (ferric reducing antioxidant power), TPAC (total proanthocyanidin content) and TFC (total flavonoid content).

3.3. Total proanthocyanidin and flavonoids content

Total condensed tannins (TPAC) and flavonoids (TFC) were performed to confirm the hypothesis of proanthocyanidin degradation leading to the formation of flavonoid monomers and dimers. For that, an acidified extraction is required to obtain these polyphenols, so the analysis of free and bound extracts, as performed for TPC and antioxidant analysis, was not possible. TPAC ranged from zero (control) to 27.1 mg CE/g, while TFC varied from zero (control) to 8.3 mg CE/g (Table 2). The major differences were observed ($p < 0.05$) between genotypes, especially related to the presence/absence of tannin. TPAC and TFC taken together were almost 32 fold higher in SC319 tannin-rich genotype than in BRS330 in raw sorghum flours for instance.

TPAC results (Table 2) corroborate those found by Rao *et al.* (2018) with six different varieties of Australian sorghum (one black, one brown, three red and one white pericarp) showing values ranging from 0.33 to 21.02 mg CE/g. The BRS330 genotype of the present study resembles the Australian genotype of low tannin red pericarp (0.60 ± 0.39), while the raw flour SC319 showed higher TPAC (27.11 ± 0.98 mg CE/g) than Australian genotypes. A previous study with SC319 genotype documented the polyphenol changes according to storage time and temperature and reported a maximum TPAC of 17 mg CE/g raw flour (Oliveira *et al.*, 2017). The higher value found in the present study may be due to the adaptation of the vanillin assay, where sulfuric acid was used in place of hydrochloric acid. Sulfuric acid is stronger and may favor the reaction between vanillin and tannins and, consequently, the formation of colored complexes. In addition, it is known that crop and climate conditions influences phenolic content and composition and may have been a determining factor for this difference.

The TFC also corroborate the literature, being in the same range of previous works. Herald *et al.* (2012) analysed five tannin and non-tannin sorghum flours and found values between 0.69 and 7.26 mg CE/g; while Wu *et al.* (2017) found in six Australian sorghum genotypes TFC values between 0.47 and 7.56 mg CE/g. SC319 raw flour was within both range and the BRS330 genotype presented slight lower values than those found for low tannin sorghum by the mentioned authors.

Besides the difference between crops, there are important changes after processing. The SC319 genotype showed 64% of reduction in TPAC but 32% of

increase in TFC after the extrusion process, corroborating the hypothesis of degradation of the condensed tannins alongside the release of monomeric flavonoids. BRS330 genotype showed a 52% increase of TPAC and 74% of TFC, indicating that for this genotype, the thermal processing favored not only the degradation of proanthocyanidins into flavonoids, but also induced the polymerization of part of these compounds.

This decrease in proanthocyanidin levels after extrusion was also found in a red pericarp sorghum genotype from South Africa. In this case, it was possible to observe that the cooking of sorghum by extrusion decreases the levels of traceable condensed tannins compared to unprocessed ones. The process conditions, such as high temperature, moisture content and intense shear, can break down proanthocyanidin oligomeric species into smaller and more soluble monomeric and dimeric units (Adarkwah-Yiadom & Duodu, 2017). This hypothesis is confirmed by the negative strong correlation between TPAC and TFC (0.9573, $p < 0.05$), where degradation of proanthocyanidins increases the flavonoid content.

As expected, the addition of turmeric increased the TPAC and TFC, since these compounds are the plant pigments responsible for color in *Curcuma longa*. Turmeric is considered a good source of natural flavonoids. Tanvir *et al.* (2017) studied two varieties from Bangladesh and found high content of flavonoids between 2.9 to 96.6 mg CE/g of sample in ethanolic and aqueous extracts, while Malaysian varieties presented 0.1 and 4.0 mg CE/g (Ghasemzadeh *et al.*, 2012). TFC of isolated turmeric was not evaluated in the present study, but its contribution to flavonoid and proanthocyanidin contents can be estimated between 8% to 36% and 23% to 13%, respectively.

3.4. Identification of phenolic compounds by UPLC-MS^E

Globally, a total of 181 PC were tentatively identified, most of them belonged to bound (100) than free (59) extract (Figure 6A), corroborating previous studies in cereals (Dykes & Rooney, 2006; Santos *et al.*, 2019). A total of 22 PC were commonly identified in both extracts. The predominance of bound compounds is also observed in the total relative ion abundance, where the abundance of bound compounds was 28% higher than free (Figure 6B).

Eighteen (18) PC were fully confirmed by reference standards (Supplementary table, compounds presented in bold): vanillic acid, caffeic acid, trans-ferulic acid, kaempferol, 4-hydroxybenzaldehyde, gentisic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 4-

hydroxyphenylacetic acid and p-coumaric acid were present in both extracts (free and bound); pyrogallol, catechin, epicatechin, quercetin 3-O-glucoside and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid was identified only in free extract; and trans-cinnamic acid, myricetin, gallic acid and quercetin was identified only in bound extract.

The identified PC belonged mainly to the flavonoid class (45%), followed by phenolic acids (29%), other polyphenols (12%) and lignans (2%). Twenty-two (12%) compounds could not be assigned a class and were classified as unknown compounds. The abundance of these classes also changes according to the extract, as shown in Figure 6C. Flavonoids and phenolic acids were the most abundant classes in free extracts; while in bound extracts the phenolic acid class corresponded to 4/5 of the total abundance, followed by flavonoids and other polyphenols, as curcuminoids, alkylphenols and phenolic terpenes. The lignan class was unique to the bound extract and in both extracts no stilbenes were identified.

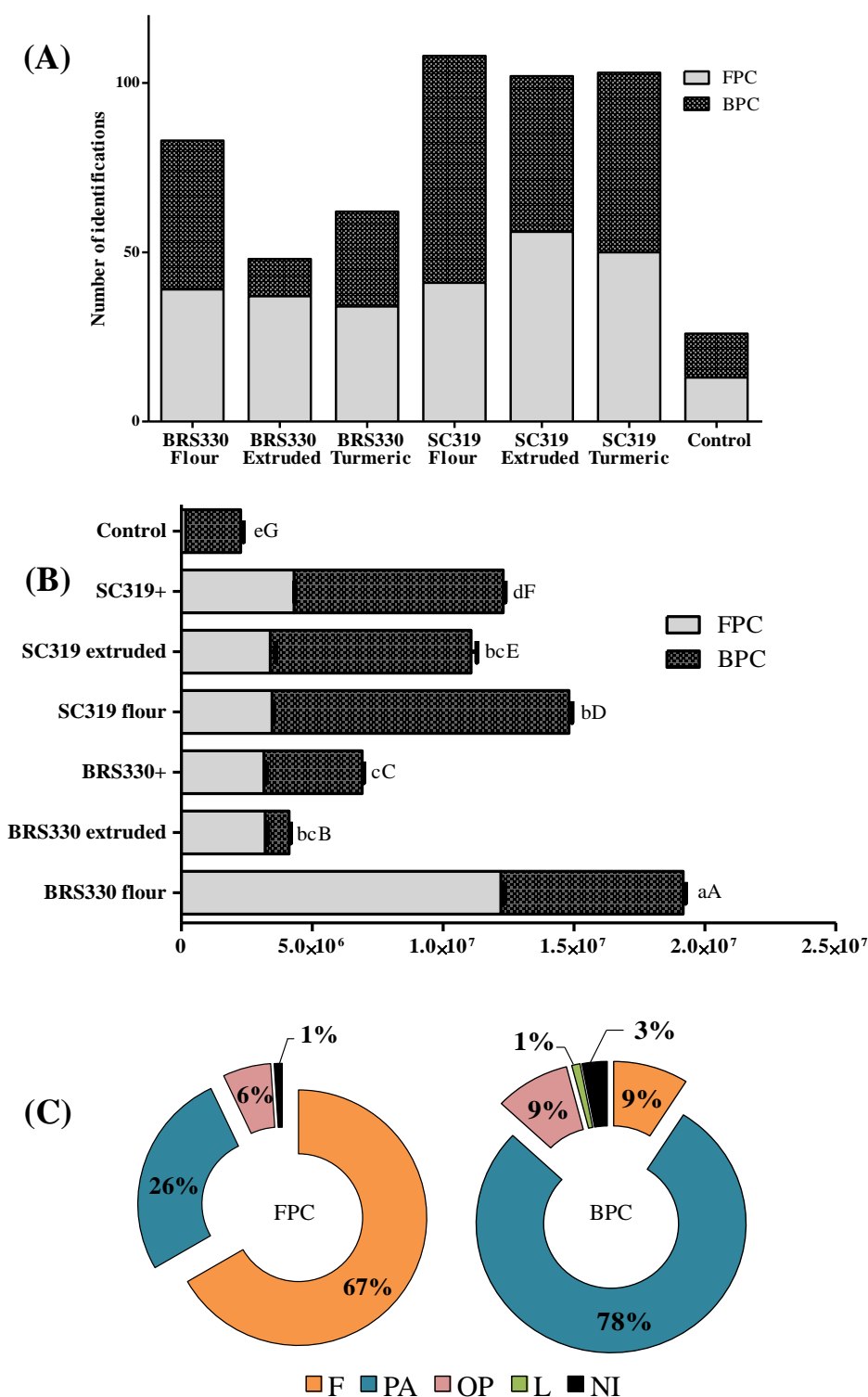


Fig. 6: Metabolomic analysis: (A) number of identification of each sample; (B) total relative ion abundance of phenolic compounds; (C) distribution of phenolic classes in free (FPC) and bound (BPC) extracts. F: flavonoids; PA: phenolic acids; OP: other polyphenols; L: lignans; NI: non-identified. Different lowercase and uppercase letters mean a significant difference ($p < 0.05$) between free and bound extract samples, respectively. Bars represent standard deviation ($n=3$).

Among the fifteen most abundant PC, ten compounds were common to free and bound extracts: vanillic acid, gentisic acid, 4-hydroxybenzoic acid, esculetin, caffeic acid, 4-hydroxybenzaldehyde, p-coumaric acid, trans-ferulic acid, ferulic acid, kaempferol (Table 3), although the order of abundance of these PC was different among the two extracts. Daidzin was the most abundant PC in free extract, followed by caffeic acid and kaempferol. Caffeic acid it was also one of the most abundant PC in bound extract, preceded by trans-ferulic acid and p-coumaric acid.

Tab. 3: Most abundant phenolic compounds and reference standard compounds identified.

Name	Molecular formula	<i>m/z</i>	RT (min)	Score (%)	FS (%)	Fragments	Mass Error (ppm)	IS (%)	Class	Extract
Trans-ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.0494	5.30	46.0	41.1	149.0595 (15.05); 161.0219 (9.21); 178.0260 (22.89)	-6.37	96.01	PA	T
Daidzin	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	415.1028	7.53	50.0	57.3	105.0338 (0.69%); 117.0337 (0.93%); 132.0207 (1.33%); 135.0440 (100%); 161.0234 (82.06%); 253.0712 (11.20%)	-1.57	94.64	F	T
Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	179.0338	3.87	50.7	61.9	109.0284 (86.87); 134.0359 (44.28); 135.0438 (100); 161.0230 (15.58)	-6.61	99.13	PA	T
p-Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	163.0388	4.87	57.1	95.6	93.0336 (6.02); 117.0337 (3.48); 119.0492 (100%); 163.0388 (13.55)	-7.60	98.45	PA	T
4-Hydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	137.0231	3.14	54.8	86.2	136.0153 (78.00); 137.0232 (100)	-9.04	97.96	PA	T
Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0398	7.82	57.3	95.2	105.0337 (1.51%); 107.0129 (7.98%); 121.0283 (3.84%); 132.0205 (10.71%); 133.0284 (100%); 149.0233 (4.37%)	-2.31	94.04	F	T
Puerarin	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	415.1031	7.34	48.1	43.6	117.0338 (0.34%); 133.0285 (3.40%);	-0.87	97.98	F	F

135.0440 (100%);										
Vanillic acid	C₈H₈O₄	167.0337	2.14	54.3	82.0	123.0440 (53.39); 135.0439 (100)	-7.63	98.03	PA	T
Esculetin	C ₉ H ₆ O ₄	177.0181	3.78	45.9	39.4	121.0285 (73.64%)	-7.20	98.20	OP	T
Gentisic acid	C₇H₆O₄	153.0181	2.42	43.7	29.8	108.0207 (19.81); 109.0282 (31.03)	-8.64	98.15	PA	T
4-Hydroxybenzaldehyde	C₇H₆O₂	121.0284	4.09	37.9	0.0	0.00	-9.12	99.32	OP	T
Dihydroxybenzoic acid isomer IV	C ₇ H ₆ O ₄	153.0178	3.28	53.1	77.4	107.0120 (100%); 152.0096 (59.56%)	-9.81	98.99	PA	B
Methylgalangin	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.0605	5.60	40.1	12.3	196.0517 (20.47%)	-2.28	90.80	F	F
Genistein	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.0449	4.98	38.2	0.0	0.00	-2.35	93.98	F	T
Ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.0496	5.55	48.9	52.3	134.0361 (100); 135.0433 (27.06); 149.0590 (4.23)	-5.44	98.46	PA	T

m/z = mass/charge; RT = retention time; FS = fragmentation score; IS = isotope similarity; F = flavonoids; PA = phenolic acids; OP = other polyphenols; F = free extract; B = bound extract T = two extracts. Bold represent reference standards.

Trans-ferulic acid is typically the most abundant phenolic acid in grains. In this work, trans-ferulic acid were found in both extracts (free and bound) in all samples (flour, extrudate and turmeric of both genotypes). However, 99% of total ion abundance of trans-ferulic acid, taking account all samples, was impressively found in the bound extract, while only 1% in free extracts (please refer to Supplementary Material for relative abundance of compounds). In the same way, Wu *et al.* (2017) conducted a study with six sorghum varieties of different pericarp colors and the red color showed phenolic acids mainly in the bound extract compared to the free extract.

On the other hand and unexpectedly, isoflavones such as daidzin and genistein were found among the second and fourteenth most abundant compounds, respectively, being reported on sorghum samples for the first time. These isoflavones are largely found in soybeans and make up the most important dietary source of phytoestrogens for humans, cattle and rodents. In plants, isoflavones play important function as signal molecules for inhibiting pathogen attacks, and are synthesized under environmental stress (Cederroth *et al.*, 2012). It is the first time that the presence of isoflavones, previously attributed only to soy, is detected in sorghum. Some hypothesis could be evaluated to explain the presence of these compounds. The synthesis during the extrusion from naringenin, a precursor of isoflavonoids, can not be applied due to the presence of daidzin and genistein in crude raw flour and extrudates in both extracts (free and bound). A possible cross contamination was also checked and eliminated, since at harvest, storage and grinding there was no contact of soybean, moreover the presence of daidzin and genistein in sorghum raw flour also excluded the hypothesis of contamination during extrusion.

It is worth mentioning that these compounds were tentatively identified based on a non-targeted comparison with a curated database from PubChem with strict parameters of identification (e.g. isotopic similarity, exact mass error) but without fully confirmation with analytical standards. However, there is growing evidence that these compounds can be found in cereals. Indeed, the isoflavones, daidzein and genistein, were successfully quantified in 57 of the 75 cereal samples analysed by GC-MS (Liggins *et al.*, 2002). Even if soy flour could be included as an ingredient of the analysed cereals-based products, raw wholegrain brown rice and shredded wheat presented more than 1 µg/g and could be considered as sources of daidzein and

genistein. Sorghum PC have also been related to estrogenic activity in cells, but attributed to flavones, such as apigenin and luteolin (Yang *et al.*, 2012).

3.5. Changes in phenolic profile during sorghum extrusion

Due to the presence of hydroxylated aromatic rings in PC, there is a high electron density that favors transformations during thermal processes, such as extrusion. At that time, changes in connections, such as saturation, may occur. New compounds can be formed and compounds previously present can be degraded. The first change to be observed after extrusion was the number of PC identifications (Figure 6A). The BRS330 genotype showed a loss of 5% and 75% in free and bound extracts after extrusion, respectively. However, the SC319 genotype presented 37% of increase in free and 31% of reduction in bound extracts. These data show the ambiguous impact of extrusion on the phenolic profile of sorghum: the reduction in the BRS330 genotype can be explained by the decomposition of heat-labile PC, whereas the increase in SC319 could be attributed to the increase in low molecular weight proanthocyanidins, formation of other compounds during the process or increase in extractability due to the breakdown of cell wall structures (Salazar-López *et al.*, 2018).

The relative quantification of these compounds through total ion abundance was also evaluated (Figure 6B). In this case, the difference in the BRS330 genotype before and after extrusion was even clearer; there were losses of 74% and 87% of total ion abundance in free and bound extracts, respectively. In the SC319 genotype, abundance remains constant in the free extract and reduced 32% in the bound extract after extrusion. The reduction of the ion abundance together with the number of PC identified is so justified by the loss of thermolabile compounds (observed in BRS330). The highest identifications taken together with the lowest abundance in the SC319 genotype, confirms the hypothesis of transformations caused by the rupture of the cell wall, releasing a wide range of compounds, but with low abundances in that sample.

To further explore the variation in the data set, the PCA biplot (scores-samples; loadings-phenolic compounds) was applied together with cluster analysis performed to investigate the degree of similarity or dissimilarity between the compounds quantified relatively in each sample. The PCA biplot indicated a clear distinction between flour and extrudate in both genotypes, reaffirming the different patterns of the phenolic profile between them before and after extrusion (Figure 7). The two principal components (PC1 and PC2) explained, in average, 65% of the total variance observed in

both, free and bound extracts. Other analyzes were made comparing only flour vs extruded in each genotype and the PCA was able to explain 99% in both extracts of the BRS330 genotype; and 97% and 99% in the FPC and BPC of SC319 (data not shown). These values confirm the discriminatory characteristic before and after extrusion and reinforce, again, that several changes occurred.

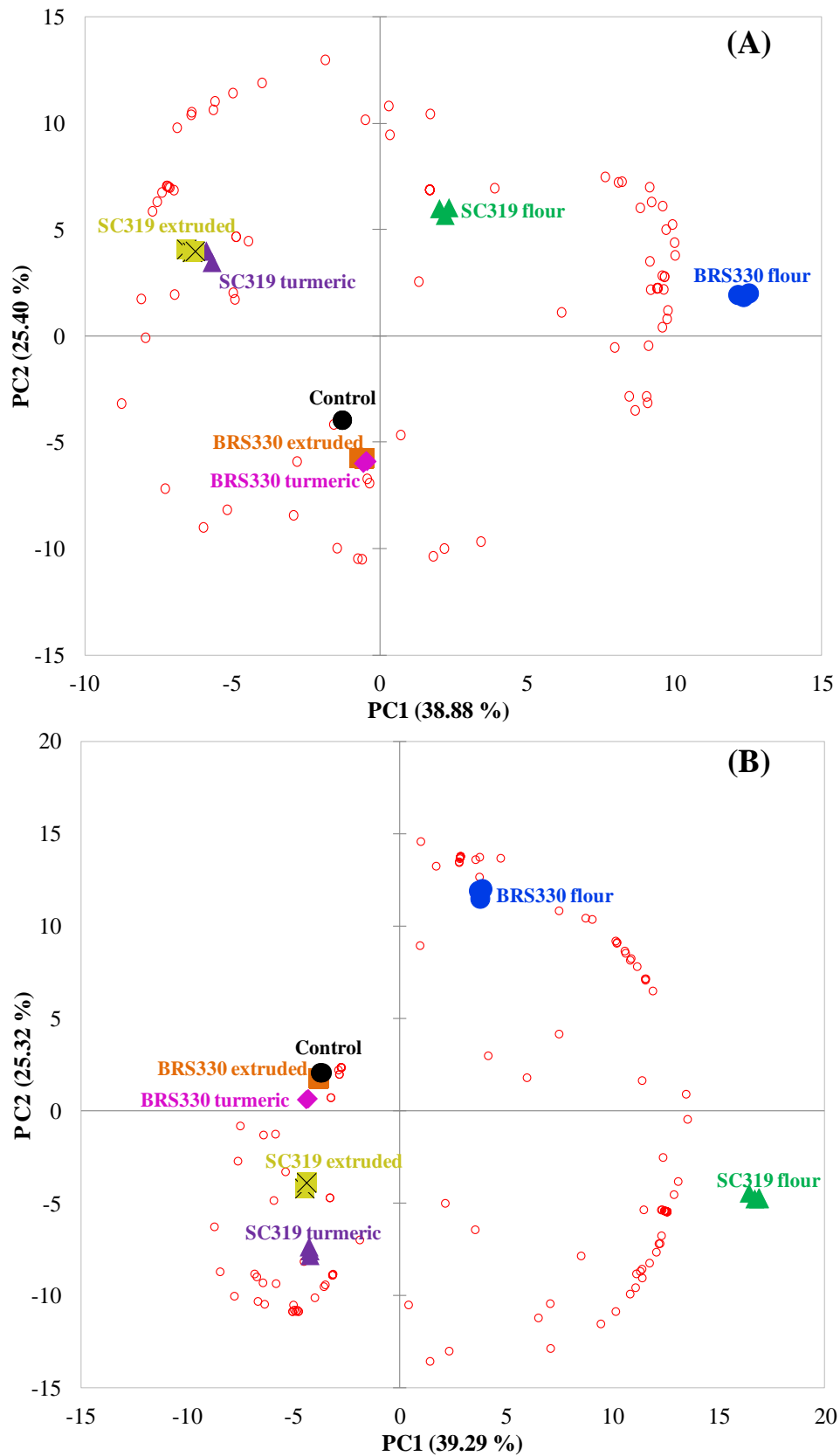


Fig. 7: Principal component analysis (PCA) biplot of sorghum samples in (A) free and (B) bound extracts. The samples (symbols) are distributed according to relative intensity of identified phenolic compounds (red circles).

Finally, the orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA) was applied to characterize the similarities and differences in the profile of PC between raw flours and extrudates, without distinction of the genotype. The S-plot graphs (Figure 8) indicate that the greater distance between the variables, the greater contribution of points located in opposite quadrants to differentiate the samples. Thus, a total of 10 PC in each extract, that made important contributions to the classification of the samples could be selected based on the projection of the importance of the variable (VIP) and p value of the OPLS-DA model. It is noteworthy that from these 10 compounds selected in each extract, four were fully confirmed with a reference standard in the free and six in the bound extracts. Two free PC were exclusive found in flours (quercetin and vestitone) and two in extrudates (gentisic acid and 4-hydroxybenzoic acid). In bound fraction, one compound was found exclusive to flour (dihydroxybenzoic acid isomer 6) and three exclusive to extrudates (gentisic acid, 4-hydroxybenzaldehyde and 4-hydroxybenzoic acid). Six compounds were also selected as VIP, but were common to both samples. In this case, the differentiation was made through the greater relative abundance in the flours, being considered discriminating.

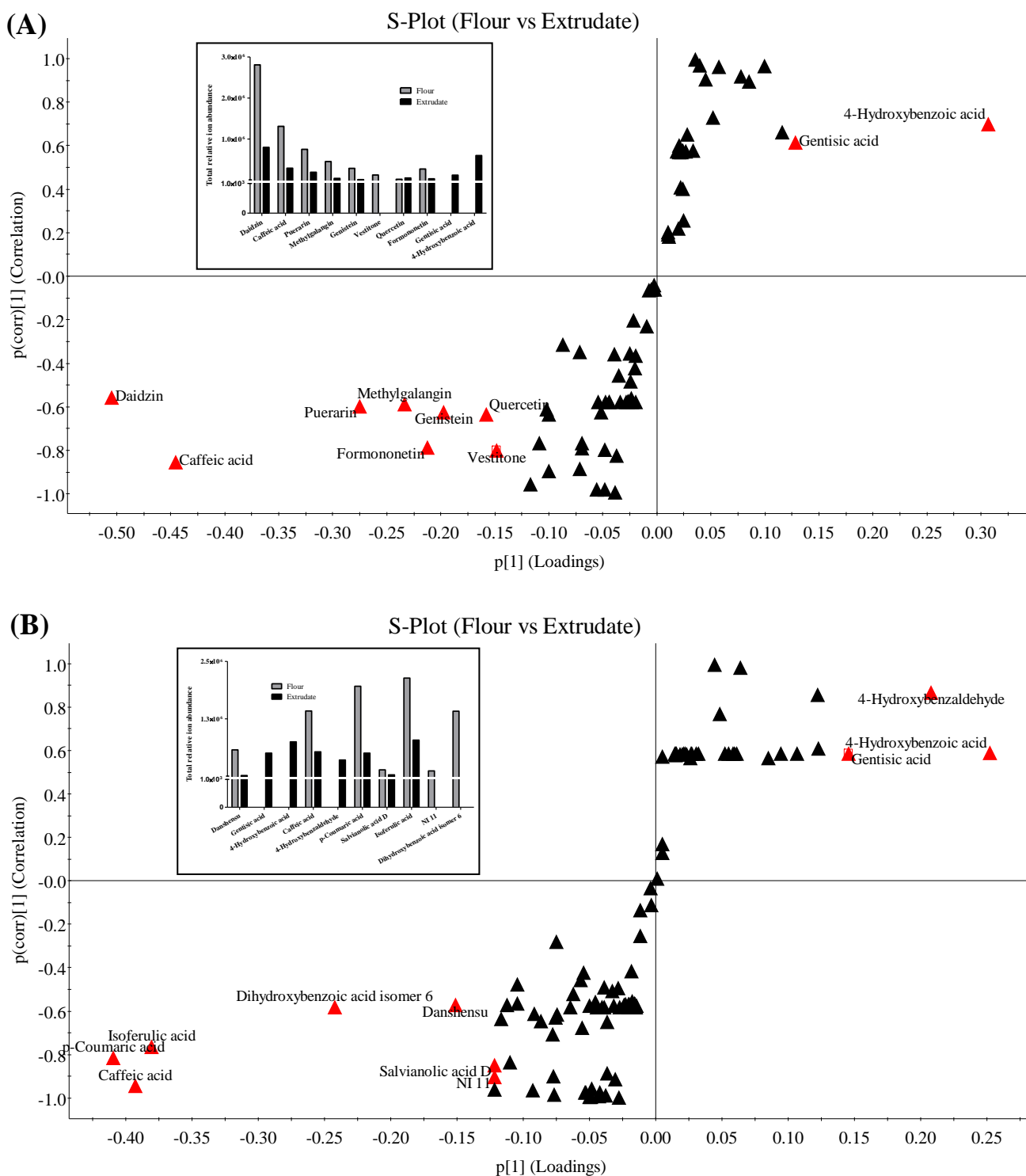


Fig. 8: S-plot of orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) of (A) free and (B) bound extracts. In x axis is represented the relative magnitude of variables (phenolic compounds), and in y axis, the confidence/reliability. Variables farthest from the origin in the plot are deemed significant markers of raw flours (lower square) and extrudates (upper square). Insert graph represents the total relative ion abundance of discriminant compounds in red.

3.6. Changes in kafirin size distribution and solubility

SE-HPLC was applied to quantify and to monitor molecular size distribution of two solubilized protein fractions (alcohol-soluble and cross-linked kafirins). In the Figure 9, is shown the chromatograms obtained after the separation in each genotype and the percentage of protein quantification calculated by the area. The quantification of total proteins in sorghum can be analyzed by applying alcohol and reducing agent directly to the samples or by the sequential extraction through the sum of supernatant alcohol-soluble kafirins and the insoluble kafirins after reduction from the pellet resultant. Interestingly, the comparison between this sum from sequential extraction and the direct extraction showed statistical differences in almost all samples, except for the extruded and turmeric SC319 genotype (Table 4). However, direct extraction did not allow understanding the transformations caused by the extrusion process. For instance, the BRS330 genotype showed an increase in soluble proteins and a decrease in insoluble kafirins, but according to the direct extraction there was no statistical difference before and after extrusion. Thus, the sequential extraction, TB-soluble kafirins and insoluble kafirins are more informative for this evaluation.

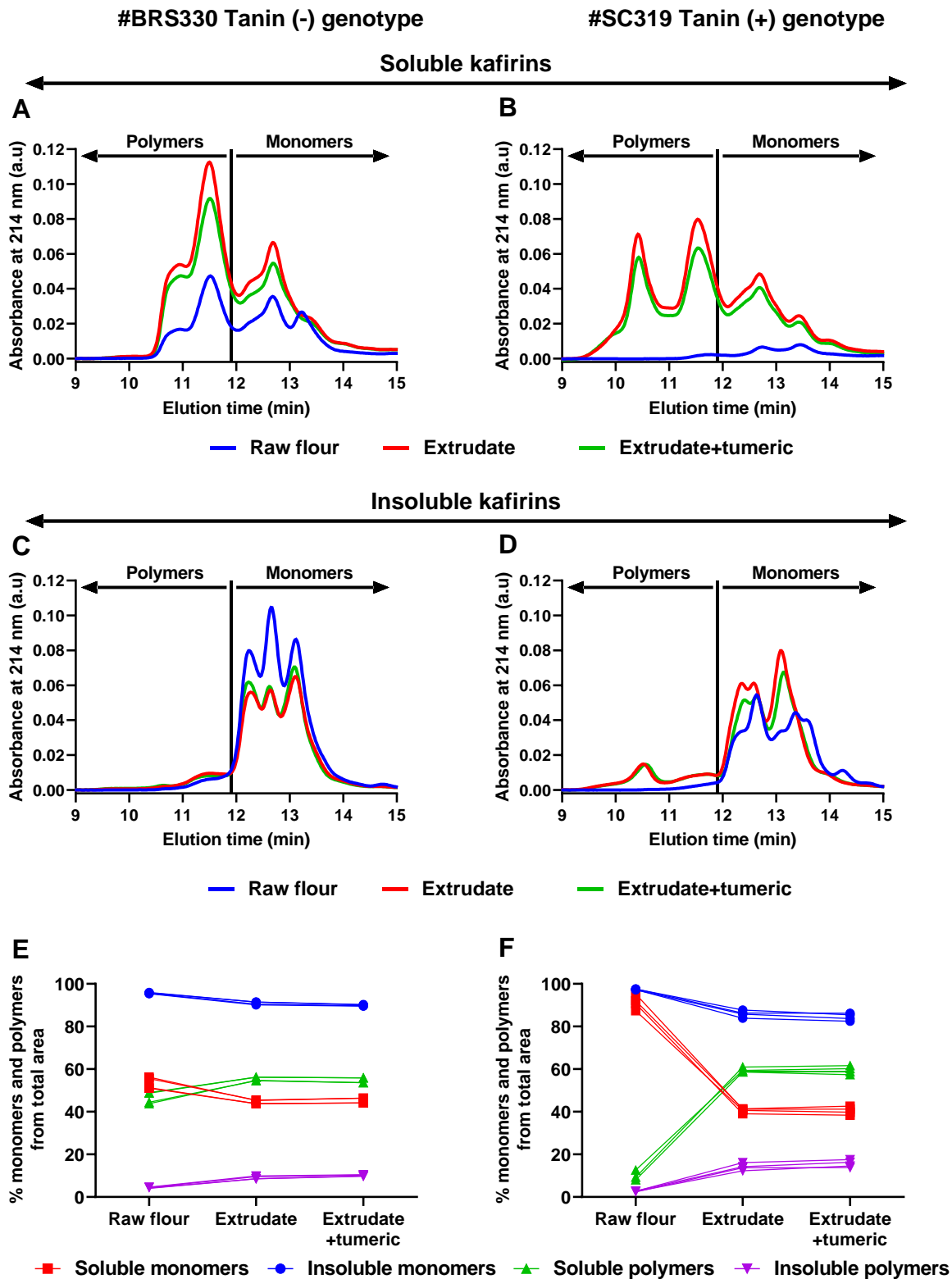


Fig. 9: Elution profiles obtained by SE-HPLC of soluble and insoluble kafirins from the sequential extraction of BRS330 (A and B) and SC319 (C and D) genotypes of sorghum samples and the content of monomers and polymers in each fraction (E and F).

Protein solubility was different between genotypes before and after extrusion. The BRS330 genotype has 32.4% of total alcohol extractible kafirins content (soluble + insoluble) and this value increased 16% after extrusion (Table 4). After the analysis of each fraction (soluble and insoluble, individually) this total increase can be attributed exclusively to soluble proteins. In the SC319 genotype, total protein content increased above the double (Table 4) and it also can be attributed to soluble fraction, as after extrusion this value was sixteen times higher (17% of proteins). However, different from tannin-free genotype, SC319 showed a 49% increase of insoluble kafirins after the process.

Tab. 4: Percentage of protein extracted in each sample and in each extract.

Samples	Protein content (%)	soluble kafirins (TB) (%)	insoluble kafirins (TBD) (%)	Total kafirins (TBA + TBD) (%)	Total kafirins (direct TBD) (%)
SC319 flour	11.84	1.09±0.15 ^a	12.81±0.74 ^a	13.90±0.72 ^a	24.55±1.00 ^a
SC319 extrudate	11.23	16.97±0.56 ^b	19.06±0.87 ^b	36.03±0.56 ^{bc}	37.63±1.96 ^b
SC319 + turmeric	10.74	15.2±0.97 ^c	18.56±1.84 ^b	33.75±1.35 ^{cd}	33.78±1.06 ^c
BRS330 flour	10.46	8.82±0.26 ^d	23.52±1.78 ^c	32.35±1.58 ^d	44.51±2.28 ^d
BRS330 extrudate	10.39	19.55±0.67 ^e	18.05±1.31 ^b	37.59±0.73 ^b	41.73±2.06 ^d
BRS330+ turmeric	10.16	17.21±0.59 ^b	18.08±1.46 ^b	35.29±0.90 ^{bc}	41.31±1.36 ^{bd}

Different letters in columns mean significant difference ($p < 0.05$) between samples. Protein content determined by Kjeldahl (conversion factor 5.7). TB (tert-butyl alcohol extract) represents soluble kafirins, TBD (tert-butyl alcohol + DTE from pellet) represents indirect insoluble kafirins and direct TBD (tert-butyl alcohol + DTE directly added to flour) represents total kafirins.

This protein solubility increase may be associated with the loss of its strongly folded structure, leading to protein degradation and denaturation during the thermal process. These structural transformations after extrusion have been associated with increased protein digestibility since 1984, as it provides higher accessibility of the peptide chain to hydrolytic enzymes or aggregates. Mertz *et al.* (1984) evaluated the digestibility of the decorticated sorghum grain before and after extrusion and observed a 39% increase in porcine pepsin digestibility, showing that this cereal in extruded form is as well digestible as wheat proteins.

However, the presence of tannins in genotype can significantly influence the behavior of proteins, as observed in the SC319 genotype. The increase of insoluble kafirins in this case can be attributed to the formation of newly formed polymers showing irreversible interactions (cross-linking) favored by high temperatures during the extrusion process. Studies on wheat proteins shows that high temperatures favor depolymerization in the first stage of extrusion through denaturation; but after the mixing temperature reach 70 °C leading to polymerization (Pommet *et al.*, 2003; Redl *et al.*, 2003). As the extrusion applied in the present work was thermoplastic with application of temperature up to 130 °C, the hypothesis is that it favored covalent cross-linking.

To understand the hypothesis of polymerization or protein aggregation after extrusion, the concentration of monomers and polymers was also evaluated in each extract (Figure 9 E and F). Both genotypes showed a reduction in monomer:polymers ratio of soluble fraction after processing. However, the SC319 was more impacted by extrusion (9.2 and 0.7, for SC319 raw and extrudate respectively) than BRS330 genotype (1.2 and 0.8, for BRS330 raw and extrudate respectively). This increase in polymers in the soluble extract shows the solubilization of these kafirins by structural changes after thermal processing. The genotypes also showed similar behavior in the monomer:polymers ratio of insoluble fraction, showing a reduction after processing. Again, the highest reduction can be seen in SC319 (37.3 to 6.1, for raw and extrudate respectively) when compared to BRS330 (22.1 to 10.0, for raw and extrudate respectively). This polymers increase in tannin genotype is clearly shown in Figure 4D, when a new peak is formed (elution time: 10.5 min).

As is known from the literature, heating, as extrusion process, can modify the behavior of proteins by exposing additional reactive sites, initially buried in the nucleus

of the hydrophobic protein, and also increases the strength of hydrophobic interactions, such as the protein-tannin interaction. The process of exposition of tannin binding sites could be potentially hindered by the presence of a reducing agent that stabilizes the protein structure (Marangon *et al.*, 2010). However, with this atypical result in the SC319 insoluble kafirins, the hypothesis is that there was an intense exposure of the protein sites and the reducing agent used (DTE) was not able to stabilize the proteins or the newly formed polymers were independent of disulfide bonds formation.

4. Conclusions

The comprehensive analysis of PC in this study was essential to understand the effect of extrusion, genotype and presence of tannin on phenolic content and composition in two sorghum genotypes. Globally, extrusion proved to be an efficient thermal process in the release of PC previously bound to cell matrix and increase the total phenolic content, due to the increased free phenolic compounds. However, this effect can be strongly affected by the genotype due to the presence/absence of tannins, the tannin-free genotype had free showed a degradation of PC caused by thermoplastic extrusion. Metabolomic approach to phenolic profiling also revealed the presence of important bioactive compounds tentatively identified such as the isoflavones (daidzein and genistein), as well as the thermal transformations after processing through identification of exclusive discriminant compounds, data never before reported in the literature.

Extrusion was also effective in the breakdown of proanthocyanidin oligomeric and protein depolymerization leading to the solubilization of the kafirins by structural changes after thermal processing, directly impacting on the protein digestibility of sorghum flour. Although it remains necessary to control the temperature during the process to prevent new protein-phenolic interactions. The addition of turmeric powder did not show major changes, but on the whole increase total bioactive compounds and antioxidant activity and proved to be an excellent natural additive for its technological and nutritional properties. The present work reveals the advantage of sorghum wholegrain compare to corn (control) and stimulates human consumption of this cereal as a potential functional food.

CONCLUSÃO GERAL

Devido às transições demográficas e ambientais, esforços para aumentar a contribuição do sorgo para o consumo humano são importantes para promover a segurança alimentar e nutricional da população, já que este grão representa uma cultura sustentável, além de apresentar propriedades nutricionais e funcionais. Neste trabalho, a aplicação da extrusão termoplástica aliada à adição de especiarias flavorizantes apresenta-se como proposta de valorização do sorgo como matriz alimentar para futura aplicação em produtos alimentícios voltados ao consumo humano. A aplicação de plataformas metabolômicas e da técnica cromatográfica de exclusão por tamanho molecular aparece como ferramenta importante para caracterização abrangente dos compostos fenólicos e do perfil polimérico das proteínas de reserva, aspectos fundamentais para melhor compreensão dos fatores que envolvem a valorização do sorgo como alimento funcional.

A análise metabolômica foi essencial para revelar que os diferentes perfis de CF após a extrusão sofreram influência dos genótipos de acordo com o teor de taninos. No genótipo BRS330, houve uma redução do teor de CF após a extrusão, relacionado principalmente à perda de ácidos fenólicos livres sensíveis ao tratamento térmico aplicado. Em contraste, no genótipo SC319 houve uma redução do teor de CF ligados e conseqüente liberação de CF livres, indicando que o processo promoveu uma ruptura celular liberando mais compostos.

As análises espectrofotométricas mostraram a correlação positiva entre o teor de fenólicos totais e a capacidade antioxidante, assim como a correlação negativa entre o teor de proantocianidina e flavonoides totais, corroborando as hipóteses de degradação e liberação de compostos fenólicos com a extrusão, dependendo do genótipo (rico ou livre de tanino). As análises quimiométricas auxiliaram na identificação dos compostos discriminantes de cada genótipo, bem como na identificação de compostos exclusivamente ligados às amostras extrudadas, provavelmente ligados às transformações térmicas induzidas pela extrusão. Ressalta-se ainda a presença de compostos bioativos relatados pela primeira vez no sorgo, como as isoflavonas daidzeína e genisteína.

A extrusão também se mostrou eficaz na despolimerização e aumento da solubilidade das kafirinas, principalmente devido ao aumento da fração solúvel. No entanto, a presença/ausência de tanino mais uma vez influenciou o comportamento das

proteínas após extrusão, principalmente relacionada ao genótipo SC319 onde nota-se a necessidade de um controle de temperatura durante o processo para evitar novas interações entre proteína-fenólicos. A adição de cúrcuma em pó não apresentou alterações significativas nos resultados encontrados, sejam ligados aos compostos antioxidantes, perfil de compostos fenólicos ou perfil polimérico das kafirinas, o que denota que esta especiaria apresenta potencial para ser utilizada como flavorizante/corante em *snacks* à base de sorgo.

Em suma, este trabalho fornece informações importantes sobre o impacto da extrusão no teor e composição dos compostos fenólicos, bem como no perfil polimérico das kafirinas. Os resultados apontam para um aumento da liberação de compostos fenólicos livres, principalmente de ácidos fenólicos e flavonoides que estavam ligados à matriz celular, bem como para a solubilização das kafirinas, por meio de mudanças estruturais dessas proteínas e sugerem, portanto, um aumento da digestibilidade por meio de modificações nas interações CF-proteínas e proteínas-proteínas. Sendo assim, as perspectivas apontam para a necessidade de um estudo mais aprofundado sobre a digestibilidade das proteínas e biodisponibilidade dos CF nestas amostras.

REFERÊNCIAS

- Abu-Reidah, I. M., Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Arraez-Roman, D., & Segura-Carretero, A. (2015). HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. *Food Chem*, *166*, 179-191. doi:10.1016/j.foodchem.2014.06.011
- Adarkwah-Yiadom, M., & Duodu, K. G. (2017). Effect of extrusion cooking and simulated in vitro gastrointestinal digestion on condensed tannins and radical scavenging activity of type II and type III whole grain sorghum. *International Journal of Food Science & Technology*, *52*(10), 2282-2294. doi:10.1111/ijfs.13510
- Afify, A. E.-M. M. R., El-Beltagi, H. S., El-Salam, S. M., & Omran, A. A. (2012). Biochemical changes in phenols, flavonoids, tannins, vitamin E, β -carotene and antioxidant activity during soaking of three white sorghum varieties. *Asian Pac J Trop Biomed.*, *3*, 203-209.
- Afify, A. E.-M. M. R., El-Beltagi, H. S., El-Salam, S. M. A., & Omran, A. A. (2011). Bioavailability of iron, zinc, phytate and phytase activity during soaking and germination of white sorghum varieties. *PloS one*, *6*(10), e25512-e25512. doi:10.1371/journal.pone.0025512
- Al-Mamary, M., Al-Habori, M., Abdulwali, A.-A., & Al-Obeidi, A. (2001). In vivo effects of dietary sorghum tannins on rabbit digestive enzymes and mineral absorption. *Nutrition Research*, *21*, 1393-1401. doi:10.1016/S0271-5317(01)00334-7
- Al-Rabadi, G. J., Torley, P. J., Williams, B. A., Bryden, W. L., & Gidley, M. J. (2011). Effect of extrusion temperature and pre-extrusion particle size on starch digestion kinetics in barley and sorghum grain extrudates. *Animal Feed Science and Technology*, *168*(3), 267-279. doi:<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.097>
- Alam, M. S., Kaur, J., Khaira, H., & Gupta, K. (2016). Extrusion and Extruded Products: Changes in Quality Attributes as Affected by Extrusion Process Parameters: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, *56*(1549-7852), 445-475.
- Alvarez-Martinez, L., Kondury, K. P., & Harper, J. M. (1988). A General Model for Expansion of Extruded Products. *Journal of Food Science*, *53*(2), 609-615. doi:10.1111/j.1365-2621.1988.tb07768.x
- Anunciação, P. C., Cardoso, L. d. M., Gomes, J. V. P., Della Lucia, C. M., Carvalho, C. W. P., Galdeano, M. C., . . . Pinheiro-Sant'Ana, H. M. (2017). Comparing sorghum and wheat whole grain breakfast cereals: Sensorial acceptance and bioactive compound content. *Food Chemistry*, *221*, 984-989. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.065>
- Awika, J. M., Dykes, L., Gu, L., Rooney, L. W., & Prior, R. L. (2003). Processing of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products alters procyanidin oligomer and polymer distribution and content. *J Agric Food Chem*, *51*(18), 5516-5521. doi:10.1021/jf0343128
- Awika, J. M., McDonough, C. M., & Rooney, L. W. (2005). Decorticating sorghum to concentrate healthy phytochemicals. *J Agric Food Chem*, *53*(16), 6230-6234. doi:10.1021/jf0510384
- Awika, J. M., & Rooney, L. W. (2004). Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. *Phytochemistry*, *65*, 1199-1221. doi:10.1016/j.phytochem.2004.04.001
- Awika, J. M., Yang, L., Browning, J. D., & Faraj, A. (2009). Comparative antioxidant, antiproliferative and phase II enzyme inducing potential of sorghum (*Sorghum*

- bicolor) varieties. *LWT - Food Science and Technology*, 42(6), 1041-1046. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.02.003>
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Bean, S., Wilson, J., Moreau, R. A., Galant, A., Awika, J. M., Kaufman, R., . . . Prasad, P. V. V. (2016). Structure and Composition of the Sorghum Grain.
- Belton, P. S., Delgadillo, I., Halford, N. G., & Shewry, P. R. (2006). Kafirin structure and functionality. *Journal of Cereal Science*, 44(3), 272-286. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.05.004>
- Borém, A., Pimentel, L. D., & Parella, R. A. d. C. (2014). *Sorgo: do plantio à colheita*. Viçosa, MG.
- Butler, L. G., Riedl, D. J., Lebryk, D. G., & Blytt, H. J. (1984). Interaction of proteins with sorghum tannin: Mechanism, specificity and significance. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 61(5), 916-920. doi:10.1007/BF02542166
- Campelo, F. A., Henriques, G. S., Simeone, M. L. F., Queiroz, V. A. V., Silva, M. R., Augusti, R., . . . Araújo, R. L. B. (2020). Study of Thermoplastic Extrusion and Its Impact on the Chemical and Nutritional Characteristics and Two Sorghum Genotypes SC 319 and BRS 332. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 31, 788-802.
- Cardoso, L., Pinheiro, S., Piler Carvalho, C., Queiroz, V., Menezes, C., Moreira, A., . . . Pinheiro-Sant'Ana, H. (2015). Phenolic compounds profile in sorghum processed by extrusion cooking and dry heat in a conventional oven. *Journal of Cereal Science*, 65. doi:10.1016/j.jcs.2015.06.015
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E. Rodríguez, J. A. Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859-871.
- Cederroth, C. R., Zimmermann, C., & Nef, S. (2012). Soy, phytoestrogens and their impact on reproductive health. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 355(2), 192-200. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.05.049>
- Chanda, S., & Ramachandra, T. V. (2019). Phytochemical and Pharmacological Importance of Turmeric (*Curcuma longa*): A Review. 9, 16-23.
- Chiremba, C., Taylor, J., Rooney, L., & Beta, T. (2012). Phenolic acid content of sorghum and maize cultivars varying in hardness. *Food Chemistry*, 134, 81-88. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.067
- de Mesa-Stonestreet, N. J., Alavi S Fau - Bean, S. R., & Bean, S. R. (2010). Sorghum proteins: the concentration, isolation, modification, and food applications of kafirins. *J Food Sci.*, 75(1750-3841), R90-R104.
- de Morais Cardoso, L., Pinheiro, S. S., Martino, H. S., & Pinheiro-Sant'Ana, H. M. (2017). Sorghum (*Sorghum bicolor* L.): Nutrients, bioactive compounds, and potential impact on human health. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 57(2), 372-390. doi:10.1080/10408398.2014.887057
- Dlamini, N. R., Taylor, J. R. N., & Rooney, L. W. (2007). The effect of sorghum type and processing on the antioxidant properties of African sorghum-based foods. *Food Chemistry*, 105(4), 1412-1419. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.017>
- Duarte, J. O. (2010). Mercado e comercialização: produção de sorgo granífero no Brasil *Cultivo de Sorgo - Sistema de produção 2*. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo.

- Dunn, K. L., Yang, L., Girard, A., Bean, S., & Awika, J. M. (2015). Interaction of Sorghum Tannins with Wheat Proteins and Effect on in Vitro Starch and Protein Digestibility in a Baked Product Matrix. *J Agric Food Chem.*, 4, 1234-1241.
- Duodu, K. G., Taylor, J. R. N., Belton, P. S., & Hamaker, B. R. (2003). Factors affecting sorghum protein digestibility. *Journal of Cereal Science*, 38(2), 117-131. doi:[https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(03\)00016-X](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(03)00016-X)
- Dykes, L., & Rooney, L. W. (2006). Sorghum and millet phenols and antioxidants. *Journal of Cereal Science*, 44(3), 236-251. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.06.007>
- Dykes, L., Rooney, L. W., Waniska, R. D., & Rooney, W. L. (2005). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Sorghum Grains of Varying Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6813-6818. doi:10.1021/jf050419e
- Dykes, L., Rooney, W. L., & Rooney, L. W. (2013). Evaluation of phenolics and antioxidant activity of black sorghum hybrids. *Journal of Cereal Science*, 58(2), 278-283. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.06.006>
- Dykes, L., Seitz, L. M., Rooney, W. L., & Rooney, L. W. (2009). Flavonoid composition of red sorghum genotypes. *Food Chemistry*, 116(1), 313-317. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.052>
- Earp, C. F., McDonough, C. M., & Rooney, L. W. (2004). Microscopy of pericarp development in the caryopsis of Sorghum bicolor (L.) Moench. *Journal of Cereal Science*, 39(1), 21-27. doi:[https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(03\)00060-2](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(03)00060-2)
- Fapojuwu, O. O., Maga, J. A., & Jansen, G. R. (1987). Effect of Extrusion Cooking on in Vitro Protein Digestibility of Sorghum. *Journal of Food Science*, 52(1), 218-219. doi:10.1111/j.1365-2621.1987.tb14010.x
- Ghasemzadeh, A., Azarifar, M., Soroodi, O., & Jaafar, H. Z. (2012). Flavonoid compounds and their antioxidant activity in extract of some tropical plants. *J Med Plants Res*, 6. doi:10.5897/JMPR11.1531
- Gumul, D., & Korus, J. (2006). Polyphenol content and antioxidant activity of rye bran extrudates produced at varying parameters of extrusion process. *Food Science and Technology*, 9, 1-11.
- Herald, T. J., P., G., & Tilley, M. (2012). High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *J Sci Food Agric*(1097-0010 (Electronic)).
- Hermuth, J., Janovská, D., Cepková, P., Ustak, S., Stražil, Z., & Dvoráková, Z. (2016). Sorghum and Foxtail Millet—Promising Crops for the Changing Climate in Central Europe.
- Hole, A. S., Rud, I., Grimmer, S., Sigl, S., Narvhus, J., & Sahlstrom, S. (2012). Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri*. *J Agric Food Chem*, 60(25), 6369-6375. doi:10.1021/jf300410h.
- Jafari, M., Koocheki, A., & Milani, E. (2017). Effect of extrusion cooking of sorghum flour on rheology, morphology and heating rate of sorghum–wheat composite dough. *Journal of Cereal Science*, 77, 49-57. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.07.011>
- Jambunathan, R., Mertz, E. T., & Axtell, J. D. (1975). Fractionation of soluble proteins of high-lysine and normal sorghum grain. *Cereal Chemistry*, 52, 119-121.

- Jozinović, A., Šubarić, D., Ačkar, Đ., Babić, J., & Miličević, B. (2016). Influence of spelt flour addition on properties of extruded products based on corn grits. *Journal of Food Engineering*, 172, 31-37. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.04.012>
- Kamath, V. G., Chandrashekar, A., & Rajini, P. S. (2004). Antiradical properties of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) flour extracts. *Journal of Cereal Science*, 40(3), 283-288. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2004.08.004>
- 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. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814616307336>
- Kaufman, R. C., Herald, T. J., Bean, S. R., Wilson, J. D., & Tuinstra, M. R. (2013). Variability in tannin content, chemistry and activity in a diverse group of tannin containing sorghum cultivars. *J Sci Food Agric*, 93(5), 1233-1241. doi:10.1002/jsfa.5890
- Khanal, R. C., R., H. L., & Prior, R. L. (2009). Procyanidin content of grape seed and pomace, and total anthocyanin content of grape pomace as affected by extrusion processing. *Journal of Food Science*, 74(1750-3841).
- Khoury, C. K., Bjorkman, A. D., Dempewolf, H., Ramirez-Villegas, J., Guarino, L., Jarvis, A., . . . Struik, P. C. (2014). Increasing homogeneity in global food supplies and the implications for food security. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(11), 4001-4006.
- Kim, J., & Park, Y. (2012). Anti-diabetic effect of sorghum extract on hepatic gluconeogenesis of streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr Metab*, 9(1743-7075 (Electronic)).
- Kim, M., & Day, D. F. (2011). Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 38(7), 803-807.
- Kobue-Lekalake, R., Taylor, J., & De Kock, R. (2007). Effects of pnenolics in sorghum grain its bitterness, astringency and other sensory properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 1940-1948. doi:10.1002/jsfa.2940
- Kocaadam Bozkurt, B., & Sanlier, N. (2015). Curcumin, an Active Component of Turmeric (*Curcuma longa*), and Its Effects on Health. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57. doi:10.1080/10408398.2015.1077195
- Kristiawan, M., Chaunier, L., Della Valle, G., Ndiaye, A., & Vergnes, B. (2016). Modeling of starchy melts expansion by extrusion. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 13-26. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.004>
- Labuschagne, M. T. (2018). A review of cereal grain proteomics and its potential for sorghum improvement. *Journal of Cereal Science*, 84, 151-158. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.10.010>
- Liggins, J., Mulligan, A., Runswick, S., & Bingham, S. A. (2002). Daidzein and genistein content of cereals. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(10), 961-966. doi:10.1038/sj.ejcn.1601419
- Luzardo-Ocampo, I., Ramírez-Jiménez, A. K., Cabrera-Ramírez, Á. H., Rodríguez-Castillo, N., Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G., & Gaytán-Martínez, M. (2020). Impact of cooking and nixtamalization on the bioaccessibility and antioxidant capacity of phenolic compounds from two sorghum varieties. *Food Chemistry*, 309, 125684. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125684>

- MacLean, W. J., De Romana, G. L., Gastanaduy, A., & Graham, G. G. (1983). The effect of decortication and extrusion on the digestibility of sorghum by preschool children. *J Nutr.*, *10*(0022-3166), 2071-2077.
- Marangon, M., Vincenzi, S., Lucchetta, M., & Curioni, A. (2010). Heating and reduction affect the reaction with tannins of wine protein fractions differing in hydrophobicity. *Analytica Chimica Acta*, *660*, 110-118. doi:10.1016/j.aca.2009.10.038
- Mazza, G., & Brouillard, R. (1987). Color stability and structural transformations of cyanidin 3,5-diglucoside and four 3-deoxyanthocyanins in aqueous solutions. *J. Agric. Food Chem*, *35*, 422-426. doi:10.1021/jf00075a034
- Mertz, E. T., Hassen, M. M., Cairns-Whittern, C., Kirleis, A. W., Tu, L., & Axtell, J. D. (1984). Pepsin digestibility of proteins in sorghum and other major cereals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *81*(1), 1. doi:10.1073/pnas.81.1.1
- Moharram, Y. G., & Youssef, A. M. A. (1995). Sorghum grain and quality of Its edible products. In G. Charalambous (Ed.), *Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence* (pp. 111-146).
- Moraes, E., Natal, D., Queiroz, V., Schaffert, R., Cecon, P., De Paula, S., . . . Martino, H. (2012). Sorghum genotype may reduce low-grade inflammatory response and oxidative stress and maintains jejenum morphology of rats fed a hyperlipidic diet. *Food Research International*, *49*, 553-559. doi:10.1016/j.foodres.2012.07.029
- Moreno, C. R., Fernández, P. C. R., Rodríguez, E. O. C., Carrillo, J. M., & Rochín, S. M. (2017). Changes in Nutritional Properties and Bioactive Compounds in Cereals During Extrusion Cooking. In IntechOpen (Ed.), *Extrusion of Metals, Polymers, and Food Products* (pp. 103-124).
- Mushtaq, Z., Tahir Nadeem, M., Arshad, M. U., Saeed, F., Ahmed, M. H., Bader Ul Ain, H., . . . Hussain, S. (2019). Exploring the biochemical and antioxidant potential of ginger (Adric) and turmeric (Haladi). *International Journal of Food Properties*, *22*(1), 1642-1651. doi:10.1080/10942912.2019.1666138
- Oliveira, A. R., Ribeiro, A. E. C., Oliveira, É. R., Ribeiro, K. O., Garcia, M. C., Careli-Gondim, Í., . . . Caliari, M. (2020). Physicochemical, microbiological and sensory characteristics of snacks developed from broken rice grains and turmeric powder. *International Journal of Food Science & Technology*, *n/a*(n/a). doi:10.1111/ijfs.14525
- Oliveira, J. P. S., O., H., M., M., Koblitz, M. G. B., Ferreira, M. S. L., Cameron, L. C., & Macedo, A. F. (2018). Tissue culture and metabolome investigation of a wild endangered medicinal plant using high definition mass spectrometry | SpringerLink. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *134*, 153-162. doi:10.1007/s11240-018-1408-7
- Oliveira, K. G., Queiroz, V. A., Carlos Lde, A., Cardoso Lde, M., Pinheiro-Sant'Ana, H. M., Anunciacao, P. C., . . . Barros, F. (2017). Effect of the storage time and temperature on phenolic compounds of sorghum grain and flour. (1873-7072 (Electronic)).
- Palavecino, P. M., Ribotta, P. D., León, A. E., & Bustos, M. C. (2019). Gluten-free sorghum pasta: starch digestibility and antioxidant capacity compared with commercial products. *J Sci Food Agric.*, *3*(1097-0010), 1351-1357. doi:10.1002/jsfa.9310

- Paterson, A. H., Bowers, J. E., Bruggmann, R., Dubchak, I., Grimwood, J., Gundlach, H., . . . Rokhsar, D. S. (2009). The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature*, *457*, 551. doi:10.1038/nature07723
- Pommet, M., Redl, A., Morel, M.-H., Domenek, S., & Guilbert, S. (2003). Thermoplastic processing of protein-based bioplastics: Chemical engineering aspects of mixing, extrusion and hot molding. *Macromolecular Symposia*, *197*, 207-218. doi:10.1002/masy.200350719
- Ragaei, S., Abdel-Aal, E.-S. M., & Noaman, M. (2006). Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *Food Chemistry*, *98*(1), 32-38. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.039>
- Rajkumari, S., & Sanatombi, K. (2017). Nutritional value, phytochemical composition, and biological activities of edible Curcuma species: A review. *International Journal of Food Properties*, *20*(sup3), S2668-S2687. doi:10.1080/10942912.2017.1387556
- Ramirez-Ambrosi, M., Abad-Garcia, B., Vilorio-Bernal, M., Garmon-Lobato, S., Berrueta, L. A., & Gallo, B. (2013). A new ultrahigh performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and quadrupole time-of-flight mass spectrometry analytical strategy for fast analysis and improved characterization of phenolic compounds in apple products. *Journal of Chromatography A*, *1316*, 78-91. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.09.075>
- Rao, S., Santhakumar, A. B., Chinkwo, K. A., Wu, G., Johnson, S. K., & Blanchard, C. L. (2018). Characterization of phenolic compounds and antioxidant activity in sorghum grains. *Journal of Cereal Science*, *84*, 103-111. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.07.013>
- Redl, A., Guilbert, S., & Morel, M. H. (2003). Heat and shear mediated polymerisation of plasticized wheat gluten protein upon mixing. *Journal of Cereal Science*, *38*(1), 105-114. doi:[https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(03\)00003-1](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(03)00003-1)
- Salazar-López, N., Aguilar, G., Rouzaud-Sández, O., & Sánchez, M. (2018). Technologies applied to sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench): changes in phenolic compounds and antioxidant capacity. *Food Science and Technology*, *38*. doi:10.1590/fst.16017
- Salazar-López, N., Campos-Vega, R., Marcela, G., Morales Sanchez, E., Brauer, J., Aguilar, G., & Sánchez, M. (2016). The Extrusion Process as an Alternative for Improving the Biological Potential of Sorghum Bran: Phenolic Compounds and Antiradical and Anti-Inflammatory Capacity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2016*. doi:10.1155/2016/8387975
- Santos, M. C. B., Lima, L. R. d. S., Nascimento, F. R., Nascimento, T. P. d., Cameron, L. C., & Ferreira, M. S. L. (2019). Metabolomic approach for characterization of phenolic compounds in different wheat genotypes during grain development. *Food Research International*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.034>
- Schaffert, R. E. (1992). *The use of sorghum for food in Brazil*. Utilization of sorghum and millets (Gomez, M.I., House, L.R. .. Rooney, L.W., and Dendy, D.A.V. .. eds.). International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
- Singh, S., Gamlath, S., & Wakeling, L. (2007). Nutritional aspects of Food extrusion: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, *42*, 916-929. doi:10.1111/j.1365-2621.2006.01309.x
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-

- ciocalteu reagent *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178): Academic Press.
- Sompong, R., Siebenhandl-Ehn, S., Linsberger-Martin, G., & Berghofer, E. (2011). Physicochemical and antioxidative properties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka. *Food Chemistry*, *124*(1), 132-140. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.115>
- Souza, G. H. M. F., Guest, P. C., & Martins-de-Souza, D. (2017). LC-MSE, Multiplex MS/MS, Ion Mobility, and Label-Free Quantitation in Clinical Proteomics. In P. C. Guest (Ed.), *Multiplex Biomarker Techniques: Methods and Applications* (pp. 57-73). New York, NY: Springer New York.
- Spinello, A., Leonel, M., Mischan, M., & Carmo, E. (2014). Cassava and turmeric flour blends as new raw materials to extruded snacks. *Ciência e Agrotecnologia*, *38*, 68-75. doi:10.1590/S1413-70542014000100008
- Spinola, V., Pinto, J., & Castilho, P. C. (2015). Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD-ESI-MS(n) and screening for their antioxidant activity. *Food Chem*, *173*, 14-30. doi:10.1016/j.foodchem.2014.09.163
- Steduto, P., Katerji, N., Puertos-Molina, H., Mastroilli, M., & Rana, G. (1997). Water-use efficiency of sweet sorghum under water stress conditions Gas-exchange investigations at leaf and canopy scales. *Field Crops Research*, *54*(2), 221-234.
- Stefoska-Needham, A., Beck, E., Johnson, S., & Tapsell, L. (2015). Sorghum: An Underutilized Cereal Whole Grain with the Potential to Assist in the Prevention of Chronic Disease. *Food Reviews International*. doi:10.1080/87559129.2015.1022832
- Strauss, G., & Gibson, S. (2004). Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloids*, *18*, 81-89. doi:10.1016/S0268-005X(03)00045-6
- Svensson, L., Sekwati-Monang, B., Lutz, D., & Schieber, A. (2010). Phenolic Acids and Flavonoids in Nonfermented and Fermented Red Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*. doi:10.1021/jf101504v
- Tanvir, E. M., Hossen, M. S., Hossain, M., Afroz, R., Gan, S., Khalil, D., & Karim, N. (2017). Antioxidant Properties of Popular Turmeric (*Curcuma longa*) Varieties from Bangladesh. *Journal of Food Quality*, *2017*, 1-8. doi:10.1155/2017/8471785
- Taylor, J., Bean, S. R., Ioerger, B. P., & Taylor, J. R. N. (2007). Preferential binding of sorghum tannins with γ -kafirin and the influence of tannin binding on kafirin digestibility and biodegradation. *Journal of Cereal Science*, *46*(1), 22-31. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.11.001>
- USDA. (2019). *United States Department of Agriculture*. Retrieved from
- USDA. (2020). *United States Department of Agriculture*. Retrieved from
- 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. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.023>
- Wall, J. S., & Ross, W. M. (1970). *Sorghum Production and Utilization*. Retrieved from
- Waniska, R. D., & Rooney, L. W. (2000). Structure and chemistry of the sorghum caryopsis. *Sorghum: production, agronomy, chemistry and utilization* (pp. 649-688). Wiley & Sons, New York.

- Wu, G., Johnson, S. K., Bornman, J. F., Bennett, S. J., Clarke, M. W., Singh, V., & Fang, Z. (2016). Growth temperature and genotype both play important roles in sorghum grain phenolic composition. *Sci Rep*, *6*, 21835. doi:10.1038/srep21835
- Wu, G., Johnson, S. K., Bornman, J. F., Bennett, S. J., & Fang, Z. (2017). Changes in whole grain polyphenols and antioxidant activity of six sorghum genotypes under different irrigation treatments. *Food Chemistry*, *214*(1873-7072), 199–207.
- Wu, Y., Li, X., Xiang, W., Zhu, C., Lin, Z., Li, J., . . . Yu, J. (2012). Presence of tannins in sorghum grains is conditioned by different natural alleles of Tannin1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(26), 10281-10286. doi:10.1073/pnas.1201700109
- Wu, Y., Yuan, L., Guo, X., Holding, D. R., & Messing, J. (2013). Mutation in the seed storage protein kafirin creates a high-value food trait in sorghum. *Nat Commun*, *4*, 2217. doi:10.1038/ncomms3217
- Yang, L., Allred, K. F., Geera, B., Allred, C. D., & Awika, J. M. (2012). Sorghum phenolics demonstrate estrogenic action and induce apoptosis in nonmalignant colonocytes. *Nutrition and Cancer*, *64*, 419-427. doi:10.1080/01635581.2012.657333
- Zhou, Z., Chen, X., Zhang, M., & Blanchard, C. (2014). Phenolics, flavonoids, proanthocyanidin and antioxidant activity of brown rice with different pericarp colors following storage. *Journal of Stored Products Research*, *59*, 120-125. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jspr.2014.06.009>

APÊNDICES

TRABALHOS PUBLICADOS E FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

ARTIGOS PUBLICADOS

- **D'ALMEIDA, C.T.S.; SANTOS, M.C.B.; RODRIGUES, S.K.P.M; LIMA, L.R.S; FERREIRA, M.S.L. Monitoramento da oxidação dos tióis proteicos em grãos de trigo imaturos e de diferentes aptidões tecnológicas.** SEMEAR: revista de alimentação, nutrição e saúde. 1ªed., v.1, 2019.

- **ALVES, T.O.; D'ALMEIDA, C.T.S.; SCHERF, K.A.; FERREIRA, M.S.L. Modern approaches in the identification and quantification of immunogenic peptides in cereals by LC-MS/MS.** Frontiers in Plant Science, v.10, p.1470, 2019.

- **CARDOSO, R.R.; NETO, R.O.; D'ALMEIDA, C.T.S.; NASCIMENTO, T.P.; PRESSETE, C.G.; AZEVEDO, L.; MARTINO, H.S.D.; CAMERON, L.C.; FERREIRA, M.S.L.; BARROS, F.A.R. Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities.** Food Research International, v.128, p.108782, 2019.

ARTIGOS SUBMETIDOS

D'ALMEIDA, C.T.S.; MAMERI, H.; MENEZES, N.S.; CARVALHO, C.W.P.; QUEIROZ, V.A.V.; CAMERON, L.C.; MOREL, M.H.; TAKEITI, C.Y.; FERREIRA, M.S.L. Metabolomic approach of phenolic compounds in sorghum extrudates added of *Curcuma Longa* powder. Food Chemistry.

MAIA, I.C.; D'ALMEIDA, C.T.S.; FREIRE, D.M.G.; CAVALCANTI, E.A.C.; CAMERON, L.C.; DIAS, J.F.; FERREIRA, M.S.L. Effect of solid-state fermentation over the release of phenolic compounds from brewer's spent grain revealed by UPLC-MS. Food Science and Technology.

VICTORIO, V.C.M.; SANTOS, M.C.B.; D'ALMEIDA, C.T.S.; MACEDO, A.F.; SOUZA, G.H.M.F.; CAMERON, L.C.; GUTKOSKI, L.C.; FERREIRA, M.S.L. Comparação de dois métodos de espectrometria de massas aplicados para melhor caracterização das proteínas do trigo: HDMS^E x UDMS^E. Nutrição em Foco: uma abordagem holística volume III.

ARTIGOS EM PROGRESSO

SANTOS, M.C.B.; LIMA, L.R.S.; D'ALMEIDA, C.T.S.; VICTORIO, V.C.M.; BOURLIEU-LACANAL, C.; CAMERON, L.C.; FERREIRA, M. S. L.; Foodomics in wheat flour: a comprehensive investigation of phenolic profile in different genotypes and crops.

PRÊMIOS

- 2019 IV SIAN - 3º Lugar Melhor trabalho apresentado na forma de poster, PPGAN-UNIRIO.

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO

- CARDOSO, R.R.; **D'ALMEIDA, C.T.S.**; NASCIMENTO, T.P.; CAMERON, L.C.; FERREIRA, M.S.L.; BARROS, F.A.R. **Metabolomic profiling reveals the phenolic compounds in black and green tea and their respective kombuchas.** Em: Simpósio de Alimentos e Nutrição, 2019, Rio de Janeiro. IV SIAN - Simpósio de Alimentos e Nutrição, 2019. v.4. p.22-22.

- MAIA, I.C.; **D'ALMEIDA, C.T.S.**; SANTOS, M.C.B.; CAMERON, L.C.; DIAS, J.F.; FERREIRA, M.S.L. **Caracterização de compostos fenólicos em bagaço de malte de cervejaria artesanal.** Em: Simpósio de Alimentos e Nutrição, 2019, Rio de Janeiro. Caracterização de compostos fenólicos em bagaço de malte de cervejaria artesanal, 2019. v. 4. p. 49-49.

- LIMA, L.R.S.; COSTA, P.A.; **D'ALMEIDA, C.T.S.**; SANTOS, M.C.B.; CAMERON, L.C.; FERREIRA, M.S.L. **Perfil de compostos fenólicos por UPLC-MS^E e atividade antioxidante em diferentes cereais brasileiros.** Em: Simpósio de Alimentos e Nutrição, 2019, Rio de Janeiro. IV SIAN - Simpósio de Alimentos e Nutrição, 2019. v.4. p.62-62.

- **D'ALMEIDA, C.T.S.**; COSTA, P.A.; SANTOS, M.C.B.; LIMA, L.R.S.; CAMERON, L.C.; MAMERI, H.; MOREL, M.; FERREIRA, M.S.L. **Metabolomic profile of phenolic compounds in sorghum during grain growth.** Em: Simpósio de Alimentos e Nutrição, 2019, Rio de Janeiro. IV SIAN - Simpósio de Alimentos e Nutrição, 2019. v.4. p.84-84.

- **D'ALMEIDA, C.T.S.**; SANTOS, M.C.B.; LIMA, L.R.S.; CAMERON, L.C.; MAMERI, H.; MOREL, M.; FERREIRA, M.S.L. **Changes in metabolomic profile and antioxidant activity during sorghum grain growth.** Em: 13º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2019, Campinas, SP. 13º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2019.

- MEDINA, T.S.; NASCIMENTO, T.P.; **D'ALMEIDA, C.T.S.**; ABREU, J.P.; SOUZA, V.R.; TEODORO, A.J.; CAMERON, L.C.; KOBLITZ, M.G.B.; FERREIRA, M.S.L. **Phenolic enriched extracts obtained from commercial vegetable residues: optimized extraction, chemometrics and metabolomic screening.** Em: 13º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2019, Campinas, SP. 13º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2019.

- LIMA, L.R.S.; COSTA, P.A.; **D'ALMEIDA, C.T.S.**; SANTOS, M.C.B.; CAMERON, L.C.; FERREIRA, M.S.L. **Abordagem metabolômica para caracterização do perfil de compostos antioxidantes em diferentes cereais integrais brasileiros.** Em: 13º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2019, Campinas, SP. 13º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2019.

- **D'ALMEIDA, C.T.S.**; NASCIMENTO, T.P.; CARVALHO, C.W.P.; CAMERON, L.C.; TAKEITI, C.Y.; FERREIRA, M.S.L. **Metabolomic approach of phenolic compounds in sorghum extrudates added of *Curcuma longa* powder.** Em: 13° Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2019, Campinas, SP. 13° Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2019.

- **D'ALMEIDA, C.T.S.**; ALVES, T.O.; SOUZA, G.H.M.F.; CAMERON, L.C.; FERREIRA, M.S.L. **Perfil alergênico de proteínas solúveis de farinhas de trigo dde diferentes qualidades tecnológicas por LC-MS.** Em: 75° aniversário da Escola de Nutrição - UNIRIO, 2018, Rio de Janeiro. 75° aniversário da Escola de Nutrição - UNIRIO, 2018.

- **D'ALMEIDA, C.T.S.**; CAUDURO, T.; SANTOS, M.C.B.; CAMERON, L.C.; FERREIRA, M.S.L. ; GUTKOSKI, L.C. **Effect of wheat malt addiction on the phenolic profile of wholemeal flour by UPLC-MS^E.** Em: 7th BrMASS 2018 4th BrProt (7th Conference On Mass Spectrometry), 2018.

- LIMA, L.R.S.; **D'ALMEIDA, C.T.S.**; SANTOS, M.C.B.; CAMERON, L.C. FERREIRA, M.S.L. **Foodomics applied to reveal the phenolic profile in Brazilian cereals.** Em: 7th BrMASS 2018 4th BrProt (7th Conference On Mass Spectrometry), 2018.

- NASCIMENTO, T.P.; LADEIRA, K.C.; SANTOS, M.C.B.; **D'ALMEIDA, C.T.S.**; CAMERON, L.C.; FERREIRA, M.S.L.; KOBLITZ, M.G.B. **Sunflower meal valorization through the use of a metabolomic approach to identify bioactive compounds absorbed on activated charcoal.** Em: 7th BrMASS 2018 4th BrProt (7th Conference On Mass Spectrometry), 2018.

MATERIAL SUPLEMENTAR

