

**UNIVERSIDADE VILA VELHA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL**

**EFEITO HIPOCOLESTEROLÊMICO, ANTIATEROGÊNICO, ANTIOXIDATIVO  
E NÃO TÓXICO *IN VIVO* DA FARINHA INTEGRAL DE SORGO E SEU  
HIDROLISADO PROTEICO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Vila Velha, como parte  
das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia Vegetal  
para a obtenção do título de *Magister  
Scientiae*

**JULIANA COUTO GAVA**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Christiane Mileib Vasconcelos**

**VILA VELHA**

**JULHO/2021**

**JULIANA COUTO GAVA**

**EFEITO HIPOCOLESTEROLÊMICO, ANTIATEROGÊNICO, ANTIOXIDATIVO  
E NÃO TÓXICO *IN VIVO* DA FARINHA INTEGRAL DE SORGO E SEU  
HIDROLISADO PROTEICO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Vila Velha, como parte  
das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia Vegetal  
para a obtenção do título de *Magister  
Scientiae*

---

Dr Tadeu Uggere de Andrade

Dr<sup>a</sup> Mariana Grancieri

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Christiane Mileib Vasconcelos

(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado saúde para chegar até o final, mesmo em tempos de pandemia...

À minha família por tanto apoio e paciência. Ao meu filho, pelo amor incondicional, mesmo diante de tanta ausência...

Aos colegas de laboratório, LabCardio, LaBia e todos os demais que contribuíram com essa pesquisa, em especial à Ana Carolina, que forneceu muita base para o meu trabalho. Aos colegas e funcionários dos laboratórios de Produtos Naturais e Cultura de Células, e do Laboratório de Química, vocês foram fundamentais no desenvolvimento das pesquisas.

Em especial à equipe com a qual tive o prazer de trabalhar: Karyna, Maritza, Ingrid, Maressa, Dionízio, Cristiane, e todos os demais que participaram desse trabalho.

À Roberta, veterinária do Biotério, por todo apoio, paciência e colaboração durante a pesquisa.

À professora Ieda, que me ajudou e encorajou em tantos momentos, e toda equipe envolvida com as análises do LabCardio; ao professor Tadeu, por tantos ensinamentos, por fornecer toda estrutura e equipe para o desenvolvimento da pesquisa com animais.

À Milena e à professora Valdirene da UENF pela parceria na realização das análises e ajuda na interpretação dos dados.

À minha orientadora Christiane Mileib, por ter acreditado em mim e me incentivado em todos os momentos. Você é um exemplo de pessoa e de profissional. Como eu aprendi com você.

Aos membros da banca Mariana Grancieri e Tadeu Uggere, pela disponibilidade, por todo ensinamento e colaboração. Vocês foram fundamentais para a qualidade científica deste trabalho.

À Universidade Vila Velha (UVV), que me concedeu ensino de qualidade, desde a graduação até o mestrado.

Ao Fundo de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pelo financiamento da pesquisa.

À EMBRAPA Milho e Sorgo, pela doação da farinha de sorgo.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”. (Simone de Beauvoir)

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 O Sorgo ( <i>Sorghum bicolor</i> L. Moench) .....	13
1.2 Composição química do sorgo.....	15
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	23
3.1 Objetivo geral .....	23
3.2 Objetivos específicos .....	24
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
4.1 Material .....	24
4.2 Métodos .....	24
4.2.1 Obtenção do hidrolisado proteico de sorgo.....	24
4.1.3 Composição centesimal .....	25
4.1.4 Perfil proteico, concentração de proteínas solúveis e grau de hidrólise .	25
4.1.5 Grau de hidrólise.....	26
4.2 Produção dos extratos para análises de compostos fenólicos e atividade antioxidante.....	27
4.2.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	27
4.2.2 Determinação da atividade antioxidante total .....	27
4.3 Teste de toxicidade em nematódeos <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	28
4.3.1 Avaliação da mortalidade dos <i>C. elegans</i> (estimativa da DL50).....	29
4.3.2 Desenvolvimento dos vermes .....	30
4.4 Avaliação in vivo .....	30
4.4.1 Avaliação de indicadores de adiposidade, peso corporal e consumo alimentar .....	33
4.4.2 Atividade antioxidante total .....	33
4.4.3 Perfil lipídico.....	33
4.4.4 Determinação de proteínas totais da aorta.....	34
4.4.5 Determinação da peroxidação lipídica.....	34
4.4.6 Ensaio de Superóxido Dismutase (SOD) .....	34
4.4.7 Ensaio da Catalase (CAT).....	35
4.4.8 Análise de deposição lipídica vascular <i>en face</i> .....	35
4.5 Avaliação da genotoxicidade pelo teste do Micronúcleo .....	36

<b>5 Delineamento experimental e Análise estatística .....</b>	<b>37</b>
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>6.1 Composição centesimal da farinha de sorgo e seu hidrolisado .....</b>	<b>38</b>
<b>6.2 Perfil proteico, concentração de proteínas solúveis e grau de hidrólise. Erro! Indicador não definido.</b>	
<b>6.3 Compostos fenólicos e atividade antioxidante da farinha de sorgo e seu hidrolisado.....</b>	<b>45</b>
<b>6.4 Avaliação da toxicidade in vivo da farinha de sorgo e seu hidrolisado .....</b>	<b>47</b>
<b>6.5 Avaliação <i>in vivo</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>6.5.1 Avaliação de indicadores de adiposidade, peso corporal e consumo alimentar .....</b>	<b>51</b>
<b>6.5.2 Análises bioquímicas .....</b>	<b>53</b>
<b>6.5.3 Análise do efeito da farinha e do hidrolisado proteico de sorgo sobre a aterosclerose experimental.....</b>	<b>57</b>
<b>6.5.4 Teste do micronúcleo .....</b>	<b>59</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Esquema de um grão de sorgo (EARP et al., 2004b).....14
- Figura 2:** Eletroforese das proteínas da farinha e do hidrolisado de sorgo .....43
- Figura 3:** Média e desvio padrão para sobrevivência e desenvolvimento do *Caenorhabditis elegans* expostos à farinha e ao hidrolisado proteico de sorgo 50
- Figura 4:** Fotografias de vermes adultos conforme grupo experimental..... 50
- Figura 5:** Área de lesão (mm<sup>2</sup>) das aortas de animais conforme grupo experimental
- Figura 6:** Resultados da análise de deposição lipídica (*en face*) na aorta dos camundongos, conforme grupo experimental .....60
- Figura 7:** Registro fotográfico de lâmina com esfregaço de medula óssea de animal do grupo KOC+.....63

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Tabela de composição da dieta hiperlipídica utilizada no experimento .....32
- Tabela 2** Média e desvio padrão da composição centesimal da farinha de sorgo e seu hidrolisado proteico..... 38
- Tabela 3** Média e desvio padrão do conteúdo de compostos fenólicos totais (mEq de ácido gálico/g de amostra), e perfil antioxidante (percentual de inibição de radical (I%) da farinha e do hidrolisado proteico de sorgo..... 46
- Tabela 4** Efeito da farinha integral e do hidrolisado de sorgo sobre a massa corpórea e medidas biométricas dos animais alimentados com dieta hiperlipídica em comparação com os dados dos animais pertencentes aos grupos controle (ração normal) ..... 52
- Tabela 5** Análises bioquímicas da plasma, fígado e aorta dos grupos experimentais..... 55
- Tabela 7** Média e desvio padrão do número de eritrócitos policromáticos (PCE) e normocromáticos (NCE) em 200 células e eritrócitos policromáticos micronucleados (MN-PCE) em 2000 PCEs, e a proporção PCE / NCE, em medula óssea de camundongos knockout LDL- /..... 63

## **EFEITO HIPOCOLESTEROLÊMICO, ANTIATEROGÊNICO, DE CONTROLE DO ESTRESSE OXIDATIVO E NÃO TÓXICO *IN VIVO* DA FARINHA INTEGRAL DE SORGO E SEU HIDROLISADO PROTEICO**

### **RESUMO**

Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) é uma alternativa ao consumo de cereais convencionais, com elevado potencial tecnológico, nutricional e funcional. Os peptídeos formados durante a digestão enzimática de suas proteínas têm demonstrado efeito modulador em variáveis relacionadas a doenças crônicas não transmissíveis, dentre elas as cardiovasculares. O presente estudo objetivou identificar e caracterizar nutricionalmente os compostos bioativos do hidrolisado proteico de sorgo obtido a partir da farinha integral, avaliar a toxicidade em modelo animal *Caenorhabditis elegans* e avaliar as propriedades hipocolesterolêmicas, antiaterogênicas e de controle do estresse oxidativo *in vivo* utilizando-se camundongos C57BL6 (homozigotos com deficiência para receptores de lipoproteína de baixa densidade, LDLr-/-KO), que mimetizam lesões ateroscleróticas humanas. Os animais foram mantidos em dieta normal ou aterogênica (contendo 2% de colesterol, 0,5% de ác. cólico) e receberam farinha integral de sorgo ou hidrolisado proteico por gavagem oral intragástrica (800mg/kg) ou água, uma vez ao dia por 8 semanas. A toxicidade foi testada em nematódeos *Caenorhabditis elegans* com a mesma dose administrada aos camundongos. Resultados demonstraram que o hidrolisado proteico possui maior concentração de compostos fenólicos e alta atividade antioxidante; a hidrólise enzimática alcançou 57,5% das proteínas, elevando o teor proteico do hidrolisado para 17%, com peptídeos de baixa massa molecular, além de não apresentar toxicidade na dose utilizada. Os resultados *in vivo* demonstraram que tanto a farinha quanto o hidrolisado reduziram o estresse oxidativo, as taxas de CT e LDL-c e a deposição lipídica na aorta dos animais com dieta aterogênica, e aumentaram a atividade antioxidante no plasma e no fígado. O hidrolisado também aumentou a expressão da enzima SOD, não apresentou toxicidade em *C. elegans* e melhorou o desenvolvimento dos vermes; apresentou efeito antimutagênico e não causou genotoxicidade pelo teste do micronúcleo.



**PALAVRAS CHAVE:** Sorgo. Hidrolisado proteico. Peptídeos bioativos. Colesterolemia. Aterosclerose. Estresse oxidativo.

## **ABSTRACT**

Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) is an alternative to the consumption of conventional cereals, with high technological, nutritional and functional potential. The peptides formed during the enzymatic digestion of their proteins have shown a modulating effect on variables related to chronic non-communicable diseases, including cardiovascular ones. The present study aimed to identify and nutritionally characterize the bioactive compounds of sorghum protein hydrolyzate obtained from wholemeal flour, evaluate the toxicity in animal model *Caenorhabditis elegans* and evaluate the hypocholesterolemic, antiatherogenic and oxidative stress control properties *in vivo* using mice C57BL6 (homozygotes deficient for low-density lipoprotein receptors, LDLr-/-KO), which mimic human atherosclerotic lesions. The animals were kept on a normal or atherogenic diet (containing 2% cholesterol, 0.5% colic acid) and received whole sorghum flour or protein hydrolyzate by oral intragastric gavage (800mg/kg) or water once a day for 8 weeks. Toxicity was tested in *Caenorhabditis elegans* nematodes at the same dose administered to mice. Results showed that the protein hydrolyzate has a higher concentration of phenolic compounds and high antioxidant activity; enzymatic hydrolysis reached 57.5% of the proteins, raising the protein content of the hydrolyzate to 17%, with low molecular weight peptides, in addition to not presenting toxicity in the dose used. The *in vivo* results showed that both flour and hydrolyzate reduced oxidative stress, TC and LDL-c levels and lipid deposition in the aorta of animals with atherogenic diet, and increased antioxidant activity in plasma and liver. The hydrolyzate also increased the expression of the SOD enzyme, showed no toxicity in *C. elegans* and improved the development of the worms; showed an antimutagenic effect and did not cause genotoxicity by the micronucleus test.

**KEYWORDS:** Sorghum. Protein hydrolysate. Bioactive peptides. Cholesterolemia. Atherosclerosis. Oxidative stress.

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis - DCNTs (doenças cardiovasculares, neoplasias, doenças respiratórias crônicas, diabetes e doenças musculoesqueléticas, entre outras) são doenças multifatoriais e têm em comum fatores comportamentais de riscos modificáveis e não modificáveis. Dentre os fatores comportamentais de risco modificáveis destacam-se o tabagismo, o consumo excessivo de bebidas alcoólicas, a obesidade, as dislipidemias (determinadas principalmente pelo consumo excessivo de gorduras saturadas de origem animal), a ingestão insuficiente de frutas e hortaliças e a inatividade física (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017). Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontaram que as DCNTs foram responsáveis por 56,9% das mortes no Brasil no ano de 2017, na faixa etária de 30 a 69 anos, e são consideradas um dos maiores problemas globais de saúde pública da atualidade (WHO, 2018).

O constante aumento do sobrepeso e da obesidade, associado ao envelhecimento populacional no Brasil, tem levado ao crescimento da incidência de doenças crônicas não transmissíveis, com destaque para as doenças cardiovasculares, que possuem as dislipidemias como principal fator de risco para o seu desenvolvimento (SOUZA, 2019). A causa primária no desencadeamento das doenças cardiovasculares é o desenvolvimento e a progressão do processo aterosclerótico. A aterosclerose é, atualmente, entendida como um distúrbio inflamatório crônico e progressivo de artérias de médio e grande calibre, caracterizado pela acumulação de lipídios, leucócitos, células de músculo liso e elementos de tecido conectivo na íntima arterial (LEIVA et al., 2016). Segundo a OMS (2020), de janeiro a julho de 2020, cerca de 215 mil pessoas foram a óbito em decorrência de alguma doença relacionada ao aparelho cardiovascular no Brasil, e estima-se que até o final de 2021 esse número ultrapasse 400 mil mortes, sendo o processo aterosclerótico uma via importante no desenvolvimento de acidente vascular cerebral e isquemias cardíacas (WANG; BENNETT, 2012). A elevação das taxas de lipídios plasmáticos, particularmente das lipoproteínas de baixa densidade (Low Density Lipoprotein - LDL) e de muito baixa densidade (Very Low Density Lipoprotein -

VLDL), é um fator de risco bem estabelecido na incidência de aterosclerose e suas complicações patológicas, uma vez que a disfunção endotelial é potencializada pela hipercolesterolemia (MINATTI, 2010; LEIVA et al., 2016). O depósito de lipoproteínas na parede arterial é considerado um processo-chave no início da aterogênese e ocorre de maneira proporcional à concentração de LDL no plasma (LEIVA, et al., 2016). Além disso, o estresse oxidativo possui papel fundamental no desenvolvimento da aterosclerose, pois a formação das espécies reativas de oxigênio (ERO's) geram danos ao tecido vascular e desencadeiam uma série de reações que culminarão na formação da placa de ateroma, gerando danos irreversíveis ao indivíduo (OLIVEIRA et al., 2020).

Estudo conduzido apenas no Brasil mostrou que a inadequação alimentar foi a principal causa de mortalidade cardiovascular e reiterou que o baixo consumo de poli-insaturados, em substituição à gordura saturada, aumenta a mortalidade por cardiopatia isquêmica (OLIVEIRA et al, 2016). O consumo de gorduras saturadas deve ser limitado, porém o mais importante é sua substituição parcial por insaturadas – principalmente por poli-insaturadas, que estão associadas a diminuição de colesterol total e LDL-colesterol, como também estão relacionadas à diminuição de eventos e morte cardiovasculares (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017). Portanto, a prevenção e controle das DCNTs e seus fatores de risco são fundamentais para evitar o crescimento epidêmico dessas doenças e suas consequências para a qualidade de vida e o sistema de saúde no país (OLIVEIRA et al, 2017).

Evidências têm demonstrado que muitos compostos de origem vegetal - principalmente as substâncias oriundas do metabolismo secundário das plantas, são empregadas, popularmente, para a melhora de diversas doenças, dentre elas, as cardiovasculares, sendo que muitas das substâncias apresentam ação farmacológica conhecida (MINATTI, 2010). Apesar da importância de plantas medicinais no cuidado em saúde humana, em especial em países em desenvolvimento com baixo acesso aos medicamentos, o potencial toxicológico e/ou genotóxico desses recursos terapêuticos foi por muito tempo superficialmente avaliado ou até mesmo negligenciado (TUROLLA, 2006).

Em geral, a prevenção ou redução de risco e mesmo o tratamento das dislipidemias deve ser iniciado com mudanças no estilo de vida, o que demanda

exploração de fontes alternativas para aquisição de hábitos alimentares saudáveis. Nesse contexto, o sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) tem surgido como uma possibilidade de consumo aos cereais convencionais.

O sorgo é o quarto grão mais produzido no Brasil (IBGE, 2019) e destaca-se por ser o cereal com maior teor de compostos fenólicos, como os ácidos fenólicos, antocianinas e taninos, além de conter relevante teor de fibra alimentar e ser isento de glúten (SOARES et al., 2019, MARTINO et al., 2014).

Embora o consumo do sorgo para alimentação humana ainda seja incipiente no Brasil, muitos estudos têm sido realizados no sentido de fomentar essa prática. A Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) possui uma sede específica para pesquisas com Milho e Sorgo, e nos últimos anos desenvolveu e avaliou produtos à base de sorgo para consumo humano, como produtos de panificação, cereais, massas, bebidas funcionais e outros, que tiveram uma aceitação positiva no mercado, tanto para celíacos quanto para não celíacos (QUEIROZ et al., 2014).

Resultados de estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que extratos e frações de sorgo rico em compostos bioativos com relevante atividade antioxidante, como antocianinas, taninos e outros compostos fenólicos, lipídeos e peptídeos, modulam variáveis relacionadas à obesidade, dislipidemias e doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e hipertensão (ARBEX, 2015; ALTHWAB, 2016; WU, et al., 2016; SOUSA, 2017; XU, et al., 2019; JIA, et al, 2019, SOUSA et al, 2019).

O potencial funcional do sorgo também vem sendo demonstrado em estudos envolvendo as fibras solúveis, como a  $\beta$ -glucana e o amido resistente, responsáveis por promover efeitos hipoglicêmicos, prevenir o câncer colo-retal, reduzir os níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides, inibir o acúmulo de gordura e melhorar a absorção de vitaminas e minerais (HAMID, et al, 2017; WANG et al., 2018, SOARES et al, 2019); e os fitoesteróis, como o sitosterol, capazes de reduzir a concentração de colesterol total e LDL-colesterol no plasma humano e animal (KATAN et al., 2003, MUSA-VELOSO et.al, 2011; ABUMWEIS, et al., 2014; ALTHWAB, 2016). No entanto, sua composição também aponta para presença de importante quantidade de proteínas (de 7 a 15%) que durante a digestão enzimática podem formar peptídeos, podendo refletir em potencial

bioativo, a depender de sua composição aminoacídica (PRADO, 2016; CHAUHAN, KANWAR, 2020).

Apesar da importância dos peptídeos bioativos na saúde humana, especialmente de origem vegetal, a literatura ainda apresenta poucos dados sobre a hidrólise enzimática das proteínas dos grãos de sorgo na obtenção de seus peptídeos, bem como do conhecimento acerca dos seus benefícios *in vivo* (WU et al., 2016; HIMANI et al, 2017, XU et al, 2019a e 2019b, JIA et al, 2019).

Nesse contexto, a obtenção do hidrolisado proteico de sorgo por meio da hidrólise enzimática e sua avaliação na colesterolemia de animais, no controle do estresse oxidativo e da aterosclerose, em comparação com a farinha integral de sorgo, mostra-se como estudo inovador para desenvolvimento de novos produtos funcionais, podendo contribuir com a redução do risco, prevenção e controle de doenças crônicas não transmissíveis na população humana.

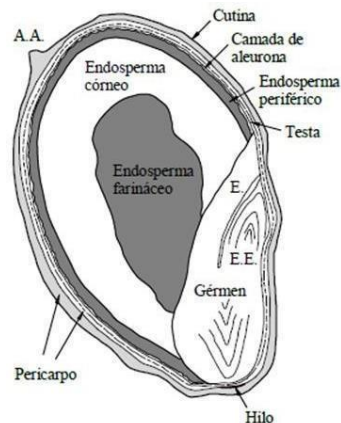
### **1.1 O Sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench)**

Sorgo é um cereal da família *Poaceae*, nativo da África e domesticado entre 3.000 e 5.000 anos atrás (FAOSTAT, 2020). O cultivo deste cereal se faz extremamente importante nos continentes Asiático e Africano, além de outras regiões semiáridas do mundo, onde ele é utilizado, principalmente, na alimentação humana, sendo responsável por quase 70% da ingestão calórica diária dessas populações (PRZYBYLSKA-BALCEREK et al, 2020; STEFOSKA-NEEDHAM e TAPSEL, 2020), no entanto, a maior produção e produtividade estão na América do Norte. Os Estados Unidos e o México, juntos, produzem 34% da produção mundial, sendo que, na safra 2018/19, os Estados Unidos responderam por 16% da produção mundial, colhendo 9,27 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2020). Nesse país, o sorgo tornou-se cada vez mais popular na indústria de alimentos, também assumindo um papel crescente em outros setores econômicos, como pecuária e produção de etanol; como resultado, o sorgo agora pode ser encontrado em mais de 350 linhas de produtos no país (UNITED SORGHUM CHECKOFF PROGRAM, 2017; SOARES, et al, 2019).

O sorgo ainda apresenta vantagens de produção/cultivo, em função de sua resistência à seca, permitindo seu cultivo tanto em climas úmidos quanto em

climas áridos, alta produtividade, baixa exigência nutricional e baixo custo de produção (QUEIROZ et al., 2014; STEFOSKA-NEEDHAM e TAPSEL, 2020). No Brasil, a cultura compreende uma alternativa de plantio em diversas regiões, sendo o quarto grão mais produzido no país, ficando atrás da cultura do milho, arroz e soja (IBGE, 2019). Em julho de 2019 a estimativa da produção de sorgo alcançou 2,5 milhões de toneladas, sendo a região Centro-Oeste a responsável pela maior produção nacional (46%), com destaque para Goiás (42%) e Brasília (14%). Na região Nordeste, embora a produção não seja tão expressiva (8,1%), o uso do sorgo pode contribuir consideravelmente para economia de divisas, com a diminuição da importação de trigo (SOUZA et al., 2005; IBGE, 2019). Porém, no Brasil, grande parte desse cultivo visa, principalmente, abastecer a demanda das indústrias de ração animal e forragem, para alimentação de ruminantes.

O grão de sorgo é formado por diferentes estruturas anatômicas, entre elas: o pericarpo, que corresponde à camada exterior; testa, que é uma camada entre o pericarpo e o endosperma; endosperma e gérmen (Figura 1).



**Figura 1:** Esquema de um grão de sorgo (EARP et al., 2004b).

Em geral, os polissacarídeos não amiláceos, carotenoides e compostos fenólicos como 3-deoxiantocianina, taninos e ácidos fenólicos, encontram-se no pericarpo e testa do grão, enquanto o endosperma corresponde ao tecido de armazenamento de amido, proteínas e vitaminas do complexo B; e no gérmen estão os lipídios e algumas vitaminas lipossolúveis (CARDOSO et al., 2015b).

A diversidade na concentração e composição de compostos fenólicos no sorgo varia amplamente em função de fatores ambientais e genéticos. A classificação que explica os níveis variáveis dos constituintes fenólicos principais (antocianinas e taninos) é baseada na coloração. Segundo essa classificação, tem-se o (i) sorgo branco, que não possui taninos ou antocianinas detectáveis e apresenta níveis muito baixos de fenol extraível total; (ii) sorgo vermelho que também não possui taninos mas tem um pericarpo vermelho com níveis significativos de fenóis extraíveis; (iii) sorgo preto que apresenta o pericarpo de coloração preta e possuem níveis muito elevados de antocianinas e, (iv) sorgo marrom que possui testa pigmentada, com diferentes graus de pigmentação do pericarpo e níveis significativos de taninos (MARTINO et al, 2014; STEFOSKA-NEEDHAM e TAPSEL, 2020).

## **1.2 Composição química do sorgo**

A composição química do sorgo é semelhante à do milho e do trigo e as tecnologias de processamento para a obtenção de produtos alimentícios desses cereais são aplicáveis ao sorgo, com a finalidade de explorar seu potencial como matéria-prima para a elaboração de diversos produtos alimentícios como os de panificação, incluindo versões sem glúten destinado aos portadores de doença celíaca, *snacks*, farinhas, mingaus, cuscuz, dentre outros (MARTINO et al, 2014; STEFOSKA-NEEDHAM e TAPSEL, 2020).

Os carboidratos correspondem ao principal macronutriente do sorgo, com aproximadamente 75% do cereal. Estão presentes, principalmente, na forma de amido, que corresponde ao polissacarídeo de reserva das plantas (QUEIROZ et al, 2011). Entre os polissacarídeos não-amiláceos do sorgo encontram-se as fibras, com teores acima de 6%, sendo a maior parte composta por fibras insolúveis (75 a 90%) como a celulose, hemicelulose, arabinoxilanos e lignina, e as fibras solúveis (10 a 25%) (SILVA, 2015), como as  $\beta$ -glucanas e o amido resistente, esse último considerado fibra alimentar devido à sua resistência à digestão enzimática (SILVA et al, 2013).

O amido resistente tem potenciais benefícios fisiológicos, pois representa uma forma particular de amido que não é digerido até atingir o intestino grosso humano, onde é finalmente fermentado pela microbiota intestinal, atuando como

fibra alimentar (SOUSA et al., 2019). Da mesma forma, a lenta fração de amido digerível apresenta uma lenta, mas completa, hidrólise no intestino delgado. Essas vantagens fisiológicas advêm de sua propriedade de sustentar e estabilizar os níveis de glicose no sangue, favorecendo o controle da diabetes e a saciedade (SOARES et al, 2019). Genótipos de sorgo ricos em taninos apresentam maior teor de amido resistente. Os taninos condensados desses sorgos estão interligados com as proteínas e essa interação diminui o conteúdo de amido digerível (SILVA, 2015).

Em relação aos lipídios, o sorgo apresenta conteúdo reduzido (1,24 a 3,07%), com predominância de ácidos graxos insaturados (83 a 88%), destacando-se os ácidos graxos linoleico (45,6 a 51,1%), oleico (32,2 a 42,0%), palmítico (12,4 a 16,0%) e linolênico (1,4 a 2,8%) (QUEIROZ, et al, 2011). Os esteróis, tais como o sitosterol, presentes no sorgo, são capazes de reduzir a concentração de colesterol e LDL-colesterol no plasma humano e animal (KATAN et al., 2003). Os fitosteróis são substâncias presentes nos vegetais, incluindo sementes, frutos e óleo vegetal, cuja estrutura e função são similares ao colesterol. As maiores concentrações ocorrem em óleos vegetais refinados, oleaginosas e azeite (MARANGONI et al., 2010), embora sementes, cereais integrais e leguminosas também sejam boas fontes de fitosteróis (AKAISHI, 2014). Um estudo realizado por Althwab, em 2016, para avaliação *in vivo* da ação dos fitosteróis presentes no sorgo, demonstrou que todas as frações lipídicas extraídas do sorgo vermelho não apenas reduziram a absorção de colesterol e triglicerídeos, mas também regularam diferentes vias envolvidas no metabolismo do colesterol.

O sorgo também pode ser considerado boa fonte de vitaminas do complexo B, uma vez que 100 g de farinha de sorgo fornece 23% da ingestão diária recomendada (RDI) de tiamina (B1), 26,5% de piridoxina (B6), e 32,4% de niacina (B3), além de minerais como fósforo (41% da RDI), magnésio (46% da RDI), ferro (21,3% da RDI) e zinco (20,5% da RDI), que variam de acordo com a área de plantio (THOMAZ, et al. 2009; PRZYBYLSKA-BALCEREK et al, 2020); contudo, a biodisponibilidade desses minerais ainda precisa ser estudada, devido à interação desses nutrientes com taninos e fibras presente no sorgo (CARDOSO et al., 2015b).



Quanto à composição de compostos fenólicos, as duas grandes categorias presentes no sorgo são de ácidos fenólicos e flavonóides. Os principais fenólicos observados em sorgo são os derivados do ácido hidrobenzóico e do ácido hidrocínâmico e os flavonóides, que englobam as antocianinas e os taninos, os quais, juntamente com outros compostos bioativos e fibras, contribuem na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis como as cardiovasculares, diabetes, obesidade e câncer (AWIKA; ROONEY, 2004; BRALLEY et al., 2008; FARRAR et al., 2008; DYKES et al., 2009).

No sorgo, assim como em outros cereais, os ácidos fenólicos estão ligados a cadeias de arabinosilanos (polissacarídeo não amiláceo) e taninos de alta massa molecular, dificultando o processo de digestão de compostos bioativos no trato gastrointestinal superior (LOPEZ et al., 2016). Autores sugerem que o emprego de calor seco no processamento dos grãos ou da farinha integral de sorgo favoreçam a redução do grau de polimerização de taninos e também, fragmentem a estrutura de arabinosilanos, aumentando a disponibilidade dos mesmos e, portanto, o seu potencial biológico, sem prejudicar a atividade antioxidante (CARDOSO et al., 2015a; LOPEZ et al., 2016).

No grupo dos flavonóides, considerados como principais compostos fenólicos, pertencem as antocianinas, que no sorgo, são denominadas de 3-deoxiantocianidinas (3-DXAS), devido à ausência de uma molécula de oxigênio na posição C-3 de sua estrutura química, o que possibilita uma maior estabilidade a pH elevado, tornando-as, portanto, mais vantajosas comercialmente em comparação com as encontradas em frutas e vegetais (AWIKA; ROONEY, 2004). A estabilidade térmica de pigmentos das 3-deoxiantocianidinas já foi avaliada por Yang, Dykes & Awika, (2014) que demonstrou boa estabilidade quando submetidas a 95 °C por 2 horas e 121 °C por 30 minutos. Os efeitos do processamento doméstico com calor seco e calor úmido sobre os compostos bioativos do sorgo também foram avaliados por Cardoso, et al. (2013) e Gomes, et al. (2020), que constataram que o calor seco não afeta o conteúdo das 3-deoxiantocianidinas, compostos fenólicos e atividade antioxidante, mas o mesmo não acontece quando submetidos a tratamentos de calor úmido.

As principais 3-DXAs encontradas no sorgo estão na forma não-metoxilada (luteolinidinas e apigenidinas), e correspondem a até 79% dos flavonoides (DYKES e ROONEY, 2006; QUEIROZ, et al, 2011). O teor de 3-DXAs no sorgo correlaciona-se com sua cor e atividade antioxidante, sendo que os genótipos de pericarpo e testa de coloração preta tem 3 a 4 vezes mais 3-DXAs (5,4 – 6,1 mg/g) que os genótipos vermelho e marrom (1,6 – 2,8 mg/g) (SOUSA, 2017). Alguns estudos demonstraram que, em comparação com o sorgo, outros cereais como aveia, arroz e trigo possuem menores concentrações de compostos fenólicos e baixa atividade antioxidante (FARRAR et al., 2008; PRZYBYLSKA-BALCEREK et al, 2020).

Em relação ao seu potencial funcional, estudos demonstram que, além do seu papel antioxidante, as antocianinas também exercem importantes efeitos antiinflamatórios. Em estudo de Bralley et al. (2008), o consumo de genótipos de sorgo rico em antocianinas e outros polifenóis promoveu inibição da enzima hialuronidase, cuja atividade aumenta em condições de inflamação. Já foi demonstrado que muitos dos mediadores relacionados com a ativação da via de sinalização do NF- $\kappa$ B encontram-se em menores concentrações no plasma de adultos saudáveis após suplementação com antocianinas, quando comparados com grupos controles. Em estudo realizado com humanos, Khan e colaboradores (2015) observaram aumento dos níveis de polifenóis no plasma, capacidade antioxidante total, atividade de enzima antioxidante endógena (SOD e CAT) e redução dos níveis de proteínas carboniladas em indivíduos que consumiram macarrão contendo farinha de sorgo vermelho quando comparados a um grupo controle. As enzimas superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD) e citoplasmática (Cu.ZnSOD) são as principais responsáveis pelo reequilíbrio entre a produção e o consumo dos radicais livres nas células, pois sua função primordial é realizar a transformação do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), um radical livre menos agressivo ao organismo (MADAMANCHI et al., 2005). Em seguida, a enzima catalase (CAT) é responsável por transformar o  $H_2O_2$  em água ( $H_2O$ ) e oxigênio ( $O_2$ ), que será utilizado novamente no processo de respiração celular (YANG et al., 2004). No estudo de Yang et al. (2004), realizado com modelo animal para estudo da aterosclerose Apo E $^{-/-}$ , ficou evidente que ocorre um retardamento da placa aterosclerótica na aorta pelo aumento da expressão da SOD e catalase. O

aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) também foi observado em ratos normolipidêmicos alimentados com farelo de sorgo negro (rico em 3-DXAs). Já os farelos de sorgo branco (rico em ácidos fenólicos), marrom (rico em taninos) ou negro (rico em 3-DXAs) aumentaram a atividade da glutathione peroxidase (GPx) (MARTINO et al, 2014).

Um estudo realizado com ratos adultos Wistar que receberam, por 35 dias, dieta hiperlipídica contendo farinha de 3 tipos de sorgo: pericarpo branco sem taninos; marrom com taninos, e vermelho sem taninos, apresentou redução do estresse oxidativo e dos marcadores de inflamação em todos os grupos, embora a expressão reduzida de TNF- $\alpha$  no tecido adiposo epididimal e níveis mais baixos de TBARS no fígado tenham sido observados no grupo alimentado com sorgo pericarpo vermelho (MORAES et al, 2012). Em estudos similares, ratos obesos que receberam farinha de sorgo extrusado, a partir do sorgo marrom, apresentaram resultados eficazes para melhorar as medidas biométricas e a lipogênese hepática, modularam positivamente a microbiota intestinal, e reduziram a inflamação e o estresse oxidativo, demonstrando o potencial funcional do sorgo na prevenção da obesidade e comorbidades, como as dislipidemias e aterosclerose (ARBEX, 2015; SOUSA, 2017; SOUSA et al, 2019; SALAZAR-LÓPEZ et al, 2019). Extratos liofilizados de compostos fenólicos de sorgo (50 a 600 mg/kg), por 14 dias também reduziram a concentração plasmática de colesterol total e triglicerídios em ratos (CHUNG, KIM, et al., 2011; CHUNG, YEO, et al., 2011; PARK, 2012).

Em estudo realizado com humanos, Khan e colaboradores (2015) observaram aumento dos níveis de polifenóis no plasma, capacidade antioxidante total, atividade de SOD e redução dos níveis de proteínas carboniladas em indivíduos que consumiram 3 refeições com macarrão contendo farinha de sorgo vermelho ou branco. Os resultados demonstraram que massas contendo farinha de sorgo integral vermelha melhoraram o status antioxidante e os marcadores do estresse oxidativo em indivíduos saudáveis.

Outro constituinte do sorgo são as proteínas. Em geral, as proteínas dos grãos de cereais são classificadas em dois grupos: as globulinas e as albuminas (proteínas de armazenamento), localizadas na camada de aleurona e no embrião; e as prolaminas e as glutelinas (proteínas dominantes) localizadas no

endosperma. As globulinas e as albuminas são os principais componentes proteicos das sementes de aveia e do arroz, enquanto as prolaminas e as glutelinas são as formas predominantes no sorgo, milho, trigo, cevada e centeio (SHEWRY et al., 2002; SELA et al, 2020).

O conteúdo de proteínas do sorgo pode variar de 7 a 15% no grão inteiro e uma variação entre 9% e 13% no endosperma. As prolaminas, principais proteínas do sorgo, compõem 70% do total de proteínas de reserva presentes no endosperma, e as glutelinas compõem cerca de 30% do endosperma do sorgo (WANISKA; ROONEY, 2000; SELA et al, 2020).

As kafirinas são as principais prolaminas do sorgo e caracterizam-se por terem elevado conteúdo de glutamina e prolina e geralmente são solúveis apenas em soluções de álcool. Em outros cereais, as prolaminas predominantes são: trigo (gliadina), cevada (hordeína), centeio (secalina), milho (zeína) e aveia (avenina). Algumas prolaminas, em particular a gliadina, podem induzir doença celíaca em pessoas com predisposição genética (SHEWRY et al., 2002). Como o sorgo não possui gliadina, não há a junção glutelina-gliadina, não ocorrendo a formação do glúten (WANISKA; ROONEY, 2000; SELA et al 2020).

O conteúdo e o perfil de aminoácidos desse grão podem variar largamente, em função da característica genética e do local de plantio (QUEIROZ et al., 2011; CARDOSO et al., 2015b; PRZYBYLSKA-BALCEREK et al, 2020). Assim como outros cereais, o sorgo tem baixa qualidade proteica devido aos teores limitantes de aminoácidos essenciais, como lisina, triptofano e metionina; além disso, as kafirinas, principais proteínas presentes no grão, possuem baixa digestibilidade. Com base em seu peso molecular e sequência, elas são classificadas em três classes, a saber,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . As  $\alpha$ -kafirinas são as últimas proteínas a serem digeridas no intestino e, devido à sua alta abundância, a indigestibilidade reduz seu valor nutritivo. As  $\beta$ - e  $\gamma$ -kafirinas são ricas em cisteína, que formam ligações dissulfureto e, portanto, presume-se que bloqueiam a acessibilidade das  $\alpha$ -kafirinas às enzimas hidrolíticas (WU et al, 2013; SELA et al, 2020).

Apesar dessa baixa digestibilidade das proteínas do sorgo, ele ainda se destaca na prevenção e modulação de doenças e agravos não transmissíveis em função do seu conteúdo nutricional e funcional (MORAES et al., 2012; CARDOSO et al., 2015; SOUSA, 2017; SOUSA, et al, 2019;). No entanto, mais

recentemente, estudos têm avaliado a presença de peptídeos bioativos (Xu, et al, 2019; Wu et al, 2016, Jia et al, 2019, entre outros); portanto, seu consumo deve ser incentivado, necessitando, porém, de mais pesquisas que elucidem e evidenciem suas ações e possíveis benefícios à saúde.

### **1.3 Digestibilidade proteica e potencial funcional de peptídeos bioativos**

As proteínas do sorgo são influenciadas pela interação com taninos condensados e essa interação diminui a digestibilidade tanto das proteínas quanto do amido, sendo um fator de relevância na dieta alimentar humana. Os genótipos de sorgo que apresentam tanino em sua composição têm uma menor quantidade de proteínas disponível para o organismo (SILVA, 2015; ARBEX, 2015; SOUSA, 2017; MORAES, 2016; SELA et al, 2020).

Mesmo com as limitações de absorção e perfil aminoacídico dos cereais, as proteínas vegetais têm ganhado cada vez mais destaque, especialmente devido à rápida expansão do conhecimento sobre peptídeos fisiologicamente ativos. As proteínas podem sofrer hidrólise sendo catalisadas por ácidos, bases ou enzimas e dessa maneira obter aminoácidos livres e pequenos peptídeos com posições pré-definidas que são desejáveis no ponto de vista nutricional (SILVA et al., 2015). Através de clivagem de ligações peptídicas, a hidrólise enzimática pode diminuir a massa molecular, aumentando a reatividade e melhorando as propriedades funcionais das proteínas (SOARES, 2013). Os tratamentos ácido e alcalino oferecem diversas desvantagens, seja por consequência de reações adversas, pela severidade das condições operacionais ou pela composição final (MIRANDA, 2012). Já a hidrólise enzimática possui vantagens como maior especificidade de ação, maior controle da hidrólise, condições moderadas de ação, menor conteúdo de sal no hidrolisado obtido, além da menor quantidade de enzimas e da facilidade em inativá-las (SILVA et al., 2015). Dessa maneira, a forma mais comumente utilizada para produção de peptídeos bioativos *in vitro* é através de hidrólise enzimática de moléculas de proteína, pois esse método preserva as propriedades sensoriais e não aumenta a osmolaridade do meio, o que dificultaria a absorção dos aminoácidos presentes no hidrolisado (PRADO, 2016). Este conhecimento vem estimulando o interesse em identificar e

caracterizar peptídeos bioativos de fontes vegetais e animais (FARIAS, 2017; CHAUHAN e KANWAR, 2020).

Peptídeos bioativos são considerados fragmentos de proteínas específicas que são inativos no interior da sequência da proteína, mas após serem liberados no processo digestivo pela ação de enzimas específicas como pepsina, pancreatina e quimiotripsina, podem ser absorvidos pelo revestimento intestinal e exercer diversas funções fisiológicas no organismo, a depender do seu tamanho e sequência de aminoácidos (FRUTON, 2002; CHAUHAN e KANWAR, 2020). Estes peptídeos contêm cerca de 2 a 20 aminoácidos e geralmente apresentam massas moleculares menores que 6000 Daltons (PRADO, 2016), embora estudos também demonstrem atividade bioativa em peptídeos com massa molecular de até 10 mil Daltons (10KDa) (XU et al, 2019b).

Com base nas suas propriedades estruturais e sua composição de aminoácidos e sequências, estes peptídeos podem desempenhar vários papéis, como antimicrobiano (BAMDAD et al., 2015), antioxidante (POWER et al., 2013), antitrombótico (SHIMIZU et al., 2008), hipocolesterolêmico (TONG et al., 2012), anti-hipertensivo (XU, et al, 2019; JIA et al., 2019), além de atuar em doenças cardiovasculares, diabetes, doenças neurológicas e até mesmo Alzheimer (STADTMAN, 2006; PRADO, 2016). Os benefícios oferecidos por tais peptídeos se relacionam com a inibição, modulação ou regulação de alguns genes de transportadores ou enzimas relacionadas à inibição da síntese endógena e absorção intestinal do colesterol (MACARULLA et al., 2001; FONTANARI et al., 2012; MARQUES et al., 2015; CORREA; POLTRONIERI, 2016).

Hidrolisados das proteínas do sorgo têm sido objeto de estudos afim de identificar peptídeos bioativos e avaliar seus efeitos *in vitro* ou *in vivo*. Ortíz Cruz et al. (2015) relataram que os benefícios promovidos pelos peptídeos bioativos estão associados à presença de kafirinas, principais proteínas de reserva do sorgo, após hidrólise enzimática durante a digestão. Os autores sugeriram que tais resultados podem estar atribuídos à ação das kafirinas na diminuição da síntese e/ou absorção de colesterol e ácidos biliares, ou que a diminuição do colesterol sérico é favorecida pela atividade dos receptores de LDL. Num estudo realizado por Wu et al. (2016), a proteína do grão de sorgo foi hidrolisada usando alcalase, produzindo peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), com conseqüente efeito hipotensor. Pelo menos um peptídeo foi isolado,

com a sequência de aminoácidos identificada como Thr-Leu-Ser (treonina-leucina-serina). Resultado semelhante foi encontrado por Jia, et al. (2019), que avaliou a ação dos peptídeos com massas moleculares diferentes na inibição da ECA, demonstrando que peptídeos com peso acima de 5 kDa obtiveram melhor efeito hipotensor, comparado aos peptídeos menores, sugerindo que o hidrolisado de sorgo pode ser considerado uma fonte de constituintes funcionais para a prevenção da hipertensão.

Em estudo realizado por Himani, et al., em 2017, as proteínas do sorgo produziram peptídeos com forte capacidade de eliminação de radicais livres após hidrólise enzimática, podendo ser utilizadas para desenvolver ingredientes nutracêuticos relacionados à saúde. Xu et al (2019a) avaliaram o efeito do hidrolisado proteico de kafirina, com frações de hidrolisado de 1 a 3 kDa, obtido com uso de papaína, após a ultrafiltração. Os hidrolisados de kafirina reduziram efetivamente o crescimento de células de carcinoma hepatocelular por mecanismos não tóxicos, indicando seu potencial anticâncer, e demonstraram efeito antioxidante promissor. Além disso, os peptídeos de 1 a 3 kDa foram fracionados e 13 sequências de peptídeos foram identificadas, podendo assim serem alvo de estudos posteriores. Outro estudo realizado por Xu et al. (2019b) forneceu uma abordagem viável para a produção de antioxidantes peptídicos a partir de kafirina de sorgo. Após a produção do hidrolisado proteico, por meio de alcalase, a fração peptídica de tamanho médio (3 a 10 kDa) revelou um conteúdo fenólico total relativamente mais alto e atividades antioxidantes mais fortes em relação à eliminação de radicais livres, atividade quelante de íons metálicos, poder redutor e capacidade de absorção de radicais de oxigênio.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Caracterizar os compostos nutricionais e bioativos do hidrolisado proteico de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) obtido a partir da farinha integral, avaliar a segurança toxicológica em modelo animal *Caenorhabditis elegans* e as propriedades hipocolesterolêmicas, antiaterogênicas e de controle do estresse oxidativo em camundongos.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Objetivo específico 1: Obter um hidrolisado proteico de sorgo;
- Objetivo específico 2: Avaliar a composição centesimal, o grau de hidrólise da proteína, teor de compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante total do hidrolisado proteico e da farinha de sorgo;
- Objetivo específico 3: Separar e identificar os peptídeos do hidrolisado proteico e da farinha de sorgo, com base na massa molecular, por meio de filtração em membrana de celulose e eletroforese.
- Objetivo específico 4: Avaliar a segurança toxicológica do hidrolisado proteico em modelo animal *Caenorhabditis elegans*
- Objetivo específico 5: Comparar os efeitos do consumo da farinha integral e do hidrolisado proteico de sorgo na colesterolemia, adiposidade corporal, perfil lipídico, peroxidação lipídica e genotoxicidade celular dos animais.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Material**

A farinha integral de sorgo BRS 310 de pericarpo vermelho e sem taninos, foi gentilmente doada pela Embrapa Milho e Sorgo. Essa farinha recebeu um tratamento térmico com o objetivo de melhorar a disponibilidade dos ácidos fenólicos e, portanto, seu potencial biológico (GOMES, 2020), e a partir dela, foi obtido o hidrolisado de sorgo.

A farinha integral de sorgo foi submetida a tratamento térmico por meio de calor seco em forno combinado, a 121°C por 25 min (CARDOSO et al., 2013) e posteriormente, acondicionada a vácuo e congelada à -20°C até a realização das análises e produção do hidrolisado.

### **4.2 Métodos**

#### **4.2.1 Obtenção do hidrolisado proteico de sorgo**

O hidrolisado proteico foi obtido por meio de digestão enzimática simulada conforme metodologia proposta por Megías et al. (2004), com modificações por Alves et al. (2016a). Brevemente, a farinha de sorgo foi suspensa em água



deionizada na proporção de 1:10 p/v seguido de digestão enzimática com pepsina (Sigma-Aldrich®, EC 3.4.23.1) /substrato 1:10 (p/p) em pH 2,0 por 2 horas e, depois, com pancreatina (Sigma-Aldrich®, EC 232-468-9), /substrato 1:10 (p/p) em pH 7,5 por mais 2 horas, ambas em temperatura de 37°C, sob constante agitação (agitador magnético Fisatom®). O processo foi interrompido por aquecimento a 75 °C por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (Excelsa 2206 – Fanem) na velocidade de 3.500 rpm por 25 minutos e a proteína hidrolisada isolada, no sobrenadante, foi dialisada para remoção de sais por meio de filtração em membrana de celulose (Spectra/Por®, Biotech), sob agitação, com ponto de corte de 500 Da. Em seguida as amostras foram liofilizadas (Liofilizador Enterprise I, Terroni) e armazenadas a -20 °C até o momento das análises.

#### **4.1.3 Composição centesimal**

A determinação do teor de umidade foi realizada pelo método de secagem em estufa a 105 °C até a obtenção de peso constante; cinzas por incineração em mufla a 550 °C; o teor proteico pelo método de Kjeldahl, seguido da conversão do resultado em proteína bruta, utilizando o fator 5,75, referente aos cereais (AOAC, 2002); lipídeos totais pelo método de extração de Goldfish (AOAC, 1990) e o teor de carboidratos por diferença (AOAC, 2002).

#### **4.1.4 Perfil proteico, concentração de proteínas solúveis e grau de hidrólise**

O perfil proteico da amostra foi obtido por eletroforese em gel de tricina-SDS, usando placas de vidro de 8 x 10 cm e 7 x 10 cm e espaçadores de 0,75 mm, segundo o método descrito por Schagger e Von Jagow (1987). O gel de separação foi preparado numa concentração de 16,4% de acrilamida/bis-acrilamida e o gel de concentração a 3,9%. Estes foram montados no Mini Protean Tetra System (Biorad). Foram aplicados 100 µg de amostra no gel.

Preparo da amostra: 20 mg do hidrolisado foram pesados e diluídos em 200 µl de tampão Tris-HCl pH8,0, 125 mM.

A eletroforese foi realizada a uma voltagem constante de 18 V por um período de aproximadamente 15 horas, utilizando na corrida o tampão catodo (Tricina 0,1 M; Tris-HCl 0,1 M pH 8,31; SDS 0,1%) e tampão anodo (Tris-HCl 0,2

M pH 8,9; SDS 0,2%). Para estimar a massa molecular dos peptídeos foi usado o marcador composto das seguintes massas (26.600; 17.000; 14.200; 6.500; 3.496; 1.060) (M3546 – Ultra Low Range Molecular Weight Marker, Sigma).

Após a finalização da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado das placas de vidro e colocado em uma solução fixadora (40ml etanol, 10ml ácido acético e 50ml de água) por 30 minutos. Após este tempo foi colocado em solução corante (Coomassie Blue G coloidal) conforme a metodologia modificada de Neuhoff et al. (1988), em agitação constante até a visualização das bandas proteicas (aproximadamente 48 h). Depois de corado, o gel foi colocado em água para remoção do excesso de corante.

A determinação da concentração de proteínas no hidrolisado (identificada como proteína total) e frações proteicas da farinha de sorgo, foi avaliada em triplicata pelo método de Bradford (1976), de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram obtidos por meio da curva padrão de albumina de soro bovino (BSA),  $y = 0,0003x - 0,0074$ ,  $R^2 = 0,9923$  e expressos em mg de proteínas solúveis/ml de amostra.

A determinação de proteínas das amostras também foi realizada pelo método de Kjeldhal, utilizando o fator igual a 5,75 (AOAC, 2002).

#### **4.1.5 Grau de hidrólise**

O grau de hidrólise do hidrolisado proteico de sorgo em relação à farinha foi calculado de acordo com Benítez et al. (2008) e Rutherford (2010) considerando a equação:

$$GH = (h / h^{\text{hot}}) * 100$$

Em que:

GH é o grau de hidrólise obtido

h é o número de ligações peptídicas hidrolisadas

$h^{\text{hot}}$  é o número total de ligações peptídicas presentes na proteína nativa, sendo considerado o teor de proteína da farinha.

Para esse cálculo, foi utilizado os resultados obtidos na determinação de proteínas pelo método Bradford (1976).

## **4.2 Produção dos extratos para análises de compostos fenólicos e atividade antioxidante**

Um grama de cada amostra – farinha e hidrolisado, foi pesado e alocado em tubo falcon coberto por papel alumínio. Foi então adicionado de 10 ml de metanol (Neon®) 60%, agitando manualmente até completa solubilização. Tal mistura foi levada ao banho de ultrassom (Elmasonic P - Elma) por 25 minutos, a 40 °C, 37 khz e 50% de amplitude, conforme Altemimi, Watson, Choudhary, & Dasari, 2016. Depois disso, o tubo foi levado à centrifuga (Excelsa 2206 – Fanem) a 3500rpm por 10 min, e o sobrenadante filtrado e coletado teve seu volume completado até 15 ml com água deionizada (KREPSKY et al., 2012). Todos os procedimentos foram realizados no escuro e os extratos acondicionados sob congelamento, ao abrigo da luz, até realização das análises.

### **4.2.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais**

A determinação de compostos fenólicos da farinha e do hidrolisado foi realizada de acordo com Luo et al. (2018). Foram pipetados 20 µl de cada extrato em microplaca e 80 µl de Folin Ciocalteu 10%. Após 4 minutos, adicionou-se 100 µl de Carbonato de Sódio 7,5% (p/v - Sigma®). Após 2 horas, a absorbância foi lida a 765 nm em leitor de microplacas Elisa (SpectraMax® 190).

A curva padrão do ácido gálico foi elaborada a partir da plotagem das absorbâncias geradas pelo ácido gálico (Sigma, USA), em 10 concentrações variando de 0,03 a 0,160 µg/ml, gerando a equação de regressão ( $y = 0,0044x + 0,0364$  e  $R^2 = 0,9985$ ). A partir da equação da reta obtida na curva padrão, foi realizado o cálculo do teor de polifenóis totais, sendo os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra.

### **4.2.2 Determinação da atividade antioxidante total**

A análise de atividade antioxidante foi realizada utilizando os radicais ABTS, DPPH.

- ABTS: Trinta microlitros de cada extrato foram pipetados em uma microplaca e adicionados de 270 µl do radical ABTS. Após 6 minutos, a absorbância foi lida a 734 nm em espectrofotômetro (SpectraMax®190). A análise do branco foi realizada com metanol concentrado adicionado do radical

ABTS. Foi gerada uma curva analítica de ácido gálico, nas concentrações de 0,005 a 0,200 µg/ml, gerando a equação de regressão ( $y = 0,0043x + 0,0498$   $R^2 = 0,997$ ) para expressar os resultados em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra. Os resultados também foram expressos por meio do índice de atividade antioxidante (IAA), utilizando a equação:  $AAR (\%) = [(Abs\ branco - Abs\ amostra) \times 100] / Abs\ Branco$  (AWIKA et al., 2003).

- DPPH: Vinte microlitros de cada extrato e 280 µl do radical DPPH foram pipetados em microplaca. A leitura foi realizada a 517 nm após 60 minutos de incubação, ao abrigo da luz em espectrofotômetro (SpectraMax®190). A análise do branco foi realizada com metanol concentrado adicionado do radical DPPH (LUO et al., 2018). Foi utilizada a curva padrão de ácido gálico citada anteriormente e os resultados também foram expressos como índice de atividade antioxidante (IAA), por meio da equação:  $AAR (\%) = [(Abs\ branco - Abs\ amostra) \times 100] / Abs\ Branco$  (SCHERER and GODOY, 2009a).

#### **4.3 Teste de toxicidade em nematódeos *Caenorhabditis elegans***

A segurança toxicológica da farinha de sorgo e seu hidrolisado proteico foi testada no modelo animal de nematódeos *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Tanto a farinha quanto o hidrolisado foram avaliados em triplicata, definidos como N1, N2 e N3. Para cada triplicata foi avaliado o controle negativo (somente com o verme, sem tratamento), o controle positivo (com o anti-helmíntico Levamisol, 50 µl), a farinha de sorgo e seu hidrolisado (50 µl da dose preparada para os animais, de 800 mg/kg peso corpóreo). Considerando um animal de 30 g, a diluição foi feita com 24 mg de hidrolisado ou da farinha, diluídos em 0,3 ml de água deionizada; dessas diluições, foram retiradas alíquotas de 50 µl para as placas contendo os vermes.

O experimento foi conduzido em placas preparadas em capela de fluxo laminar, esterilizando todos os materiais utilizados com álcool 70% e autoclave.

Os nematódeos de *C. elegans* foram da linhagem N2 do tipo selvagem, obtidos originalmente no "Cenorella elegans Genetics Center" e gentilmente cedidos pela professora Dra. Solange Cristina Garcia, do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Eles foram armazenados em meio de crescimento de nematódeos (NGM

- NaCl 3 mg/ml; bactopectona 2,5 mg/ml; ágar bacteriológico 17 mg/ml; colesterol 1 mg; CaCl<sub>2</sub> 1 M; MgSO<sub>4</sub> 1 M; KPO<sub>4</sub> 25 M), inoculado com a bactéria *Escherichia coli* OP50, utilizada como fonte de alimento para os vermes, a uma temperatura de 20 °C (BRENNER, 1974). A idade dos vermes deve ser sincronizada para garantir que todos estejam no mesmo estágio larval, e isso é realizado por lise alcalina. Embriões resistentes a este tratamento são coletados e incubados em meio sem alimento. Isto permite que o embrião ecloda, mas permaneça imóvel em L1. Os vermes sofreram sincronização completa na fase larval L1, após a exposição a uma solução tampão M9 (0,02 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,04 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,08 M NaCl e 0,001 M MgSO<sub>4</sub>) e agitação até a lise e liberação dos ovos (CORSI et al., 2015).

Os vermes previamente sincronizados foram então expostos a 50 µl de Levamisol (L), anti-helmíntico de controle positivo, 50 µl de farinha (F), 50 µl de hidrolisado (H) de sorgo, e 50 µl de solução salina, para o grupo controle negativo (C), a 20 °C por 30 minutos (tratamento agudo) em incubadora B.O.D. (TECNAL, TE-371, São Paulo, BR) por agitação contínua em um homogeneizador em meio líquido NaCl 0,5% (Neon, SP, Brasil). Após a exposição por 30 minutos, os vermes foram lavados 3 vezes com NaCl a 0,5%, para remover o respectivo agente de tratamento e, em seguida, transferidos para a placa de NGM inoculada com a bactéria *E. coli* OP5 para os próximos ensaios (AUGUSTI et al., 2017).

#### **4.3.1 Avaliação da mortalidade dos *C. elegans* (estimativa da DL50)**

A avaliação contou com 2500 larvas em estágio L1, previamente sincronizadas. Os vermes foram incubados a 20 °C em incubadora BOD (TECNAL, TE-371, São Paulo, BR) durante 24 h, para avaliação da toxicidade crônica. Foi contado o número de larvas sobreviventes em cada placa utilizando o microscópio (Nikon, Eclipse e200, Japão) (AUGUSTI et al., 2017; AVILA et al., 2012; CHARÃO et al., 2015). Para a contagem foi utilizada uma lâmina de retroprojeter com 64 quadrantes igualmente divididos, disposta sob as placas; foram contados 6 quadrantes de cada triplicata e calculou-se a média para cada placa (CHARÃO et al., 2015).

### 4.3.2 Desenvolvimento dos vermes

Quarenta e oito horas após o tratamento agudo, a área de superfície corporal do adulto ( $\mu\text{m}^2$ ) foi medida em um estereomicroscópio (Olympus IX71) para avaliar o desenvolvimento. As placas contendo os vermes foram lavadas com água autoclavada e estes transferidos para tubos de centrifugação para remover completamente as bactérias. Após a centrifugação (Excelsa 2206 – Fanem), a 4000 rpm por 3 minutos, os vermes são decantados e as bactérias permanecem suspensas. O processo foi repetido até que a solução se tornasse límpida. Em seguida, 15  $\mu\text{l}$  da solução com vermes foram depositados em lâmina de vidro coberta com agarose e adicionados 30  $\mu\text{l}$  de levamisol a 2,25%, para reduzir a movimentação e facilitar o registro fotográfico. Os vermes foram fotografados para terem seu contorno corporal medido (10 medições), realizado manualmente com auxílio do software AxioVision Rel. 4.8. (AUGUSTI et al., 2017; CHARÃO et al., 2015).

### 4.4 Avaliação *in vivo*

Foi realizado um ensaio experimental utilizando camundongos C57BL/6 e *knockout* para receptor de colesterol LDL (LDLr<sup>-/-</sup>) para avaliação do efeito da farinha e seu hidrolisado na colesterolemia e no estresse oxidativo durante 60 dias de intervenção.

Para o experimento foram utilizados 30 camundongos machos, sendo 6 C57BL/6 e 24 *knockout* para receptor de colesterol LDL, todos provenientes do Laboratório de Acompanhamento Experimental do Complexo Biopráticas – UVV. Os camundongos apresentaram peso entre 20 e 25 g e oito semanas de idade, tendo sido alimentados durante esse período com dieta normocalórica padrão (Nutriave nutri, Alinutri®), e mantidos em mini-isoladores, alojados em Rack IVC (*Individually Ventilated Caging*) ©Alesco, com controle de umidade e temperatura, ciclo claro-escuro de 12 h e acesso à água e comida *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram realizados respeitando os princípios éticos na experimentação animal de acordo com o CONCEA, e Comissão de Ética, Bioética e Bem-Estar Animal da Universidade Vila Velha (CEUA-UVV), conforme parecer de apreciação sob nº 515-2018.

Os camundongos foram separados aleatoriamente em 5 grupos experimentais, sendo 6 animais por grupo:

- C57NL: controle selvagem recebendo dieta padrão e água por gavagem (C57 normolipídico).

- CNL: LDL<sup>-/-</sup> recebendo dieta padrão e água por gavagem (controle normolipídico);

- CHL: LDL<sup>-/-</sup> recebendo dieta hiperlipídica e água por gavagem (controle hiperlipídico);

- HHL: LDL<sup>-/-</sup> recebendo dieta hiperlipídica e 800 mg/kg de peso corporal de hidrolisado proteico por gavagem (hidrolisado hiperlipídico);

- FHL: LDL<sup>-/-</sup> recebendo dieta hiperlipídica e 800 mg/kg de peso corporal de farinha de sorgo por gavagem (Farinha hiperlipídico);

A concentração de 800 mg de farinha ou hidrolisado/Kg de peso corporal (PC) foi definida considerando uma quantidade superior ao utilizado nos estudos de Alves, et al, 2016, com hidrolisado proteico de feijão preto (700 mg/Kg PC), e Grancieri, et al, 2019, com hidrolisado proteico da chia (400 mg/Kg PC). Tendo em vista que o sorgo possui conteúdo proteico inferior aos alimentos utilizados nos estudos citados (a farinha de sorgo possui entre 8 e 10% de proteína, enquanto a chia possui aproximadamente 20% e o feijão carioca entre 20 e 30%) (GRANCIERI, 2019; ALVES, et al, 2016), e que não há referência de estudos anteriores utilizando hidrolisado proteico de sorgo em modelo *in vivo*, optou-se por utilizar dose um pouco superior (aproximadamente 14% maior), sem contudo, sobrecarregar a ingestão alimentar dos animais, considerando sua capacidade gástrica e utilização de gavagem para introdução da farinha ou hidrolisado em apenas 1 dose diária.

Os grupos tratados receberam diariamente, por 60 dias, farinha de sorgo e hidrolisado proteico diluídos em água, por gavagem oral intragástrica, totalizando o volume de 1 ml/100 g PC, sendo os camundongos imobilizados manualmente. Os animais do grupo controle receberam apenas água diariamente, por gavagem. Todos os animais receberam água e dieta *ad libitum*. A dieta hiperlipídica fornecida foi da PragSoluções® (2% Colesterol + 0,5% Ácido Cólico) e normolipídica da Alinutri®, conforme composição apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1:** Composição da dieta hiperlipídica utilizada no experimento

Componente	Dieta hiperlipídica		Componente	Dieta normolipídica	
	g/Kg	(%)		g/Kg	(%)
Amido de milho	174,5	17,45	Proteína bruta	230	23,00
Caseína	200	20,00	Gordura bruta	40	4,00
Amido dextrinizado	100	10,00	Fibras	60	6,00
Sacarose	100	10,00	Minerais	100	10,00
Banha	260	26,00	Cálcio	32	3,20
Óleo de soja	40	4,00	Fósforo	8,50	0,85
Celulose microcristalina	50	5,00	Lisina	13,00	1,30
L-cistina	3	0,30	Metionina	5	0,50
Bitartarato de colina	2,5	0,25	Vitamina A	0,0075	0,00075
BHA	0,01	0,001	Vitamina D3	0,0017	0,00017
Mix mineral AIN 93 G	35	3,50	Vitamina E	0,00025	0,000025
Colesterol	20	2,00	Vitamina K3	0,004	0,0004
Ácido colico	5	0,50	Complexo B	1,68	0,168
Mix vit	10	1,00	Mix cereais*	509	50,9

\*Mix de cereais composto por: milho moído, farelo de soja, farelo de trigo.

Chegado ao fim do tratamento (60 dias), os animais foram submetidos a um jejum de 8 horas e, em seguida, anestesiados com Cetamina e Xilazina (11,5 e 0,1 mg/100 g de massa corporal, respectivamente); e amostras de sangue foram coletadas por meio de punção cardíaca e transferidas para tubos contendo 100µl de EDTA (Biotécnica®); após a separação o plasma foi armazenado à -80 °C e, por fim os animais foram perfundidos com tampão fosfato PBS (0,050 M, pH 7,4) para a coleta dos órgãos por excisão.

A aorta de todos os animais foi retirada em sua totalidade, juntamente com o coração. O arco aórtico foi retirado e armazenado em formol 10% e as aortas abdominais foram armazenadas em tampão fosfato (PBS). O ápice do coração foi mantido em formol 10%. O fígado foi removido sendo parte mantida em formol e parte no PBS para preparo do homogenato. O rim direito foi removido e mantido em tampão adicionado de formol (10%) e o rim esquerdo em tampão PBS. O tecido admoninal, epidimal e retroperitoneal foram removidos e armazenados em tampão PBS. Todos os órgãos foram pesados em balança analítica (Shimadzu®, capacidade máxima 220 g). A tíbia direita foi removida e



medida para avaliação do desenvolvimento dos animais, e o fêmur dos animais, utilizado no teste de genotoxicidade, foi removido para coleta da medula óssea.

#### **4.4.1 Avaliação de indicadores de adiposidade, peso corporal e consumo alimentar**

O peso corporal e o consumo alimentar dos animais foram monitorados semanalmente durante o período experimental. O comprimento naso-anal (CNA) foi obtido medindo-se, com auxílio de fita métrica, a distância da ponta do focinho do animal até a base da cauda. A obesidade foi mensurada pelo índice de Lee, que consiste na razão entre a raiz cúbica do peso corporal (g) e o comprimento naso-anal (cm), sendo considerados obesos os animais com índice de Lee acima de 0,3 (LEE, 2009). Ao final do experimento também foi avaliado o ganho de peso final (GPF): peso corporal final (g) – peso corporal inicial (g) (SOUSA, 2017) e o Coeficiente de eficiência alimentar calculado por: ganho de peso (g)/consumo total de dieta (g) (ARBEX, 2015).

Para o cálculo do índice de adiposidade, o somatório dos pesos dos tecidos adiposos abdominal e epididimal foi dividido pela massa corpórea e multiplicado por 100, e o índice hepatossomático calculado pelo peso do fígado (g)/ massa corpórea (g) x 100 (ARBEX, 2015).

#### **4.4.2 Atividade antioxidante total**

A atividade antioxidante total foi avaliada no plasma e fígado dos animais utilizando os radicais ABTS e DPPH, como descrito no item 4.2.3.

Após a coleta de sangue, as amostras foram imediatamente centrifugadas (UniSpeed, Uniscience®) por 10 minutos a 3500 rpm para obtenção do plasma. Para a preparação do homogeneizado de fígado, um fragmento de 100 mg foi pesado e adicionado de tampão fosfato 140 mM pH 7,4. A mistura foi triturada em Ultra Turrax Metabo GE700 seguida de homogeneização em sistema tipo Potter-Elvehjem Marconi MA 099 e centrifugada (Revan, 14000A, SP, Brasil) a 6.500 rpm durante 20 minutos sob refrigeração.

#### **4.4.3 Perfil lipídico**

Foram coletados cerca de 2 ml de sangue pela punção cardíaca, e partir do plasma determinados o Colesterol Total (CT), Lipoproteína de alta densidade

(HDL-c), Lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e Triglicerídeos (TG), utilizando kits comerciais (BIOCLIN, Rio de Janeiro, Brasil), seguindo as instruções do fabricante.

#### **4.4.4 Determinação de proteínas totais da aorta**

A determinação das proteínas totais da aorta foi realizada por espectrofotometria em leitora de microplacas (Filter Max F5 Multi-Mode Microplate Readers) (BRADFORD, 1976). O ensaio foi realizado utilizando 5 µL das amostras obtidas a partir do homogenato celular, preparado com 200 mg das aortas, e 250 µL do reagente de Bradford. O branco foi preparado com 5 µL de água deionizada e 250 µL do reagente de Bradford. A concentração das proteínas totais foi calculada com base numa curva padrão ( $y = 0,0006x + 0,3524$   $R^2 = 0,9945$ ) obtida a partir das concentrações de 0,2 a 1,2 mg/ml de albumina. Os resultados foram expressos em mg/ml de proteína.

#### **4.4.5 Determinação da peroxidação lipídica**

A determinação da peroxidação lipídica foi realizada em amostras do fígado e plasma dos animais como descrito por Patockova et al (2003), utilizando 125 µl da amostra (obtida a partir do homogenato celular preparado com 200 mg de aorta e 250 µl da solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1%. O branco foi preparado com 125 µl de água deionizada e 250 µl de TBA 1%. Em seguida, as amostras e o branco foram levados ao banho-maria (Delta, 105Di-F) a 90 °C, por 15 minutos. A determinação dos metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada por meio da leitura da absorbância em 532 nm em espectrofotômetro (SpectraMax 190 Microplate Readers). O resultado foi expresso em nmol de malondialdeído (MDA)/mg de proteínas a partir de curva padrão de MDA ( $y = 0,057x + 0,0086$   $R^2 = 0,9828$ ), na concentração de 10 a 500 µM de MDA/mg de proteínas.

#### **4.4.6 Ensaio de Superóxido Dismutase (SOD)**

A determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi realizada em amostra de homogenato celular da aorta (200 mg das aortas diluídas na proporção de 1:10 em solução tampão fosfato salino (PBS)) pelo

método de Misra & Fridovich (1972). O meio de reação foi composto de 1,0 ml de tampão de carbonato (0,2 M, pH 10,2), KCl 0,8 ml (0,015 M), 0,1 ml de homogenato e água de modo a atingir o volume final de 3,0 ml. A reação foi iniciada pela adição de 0,2 ml de epinefrina (0,025 M). A alteração na absorvância foi registrada a 480 nm (espectrofotômetro Kasuaki), em intervalos de 15 segundos, durante um minuto. A atividade da enzima foi definida como a quantidade de enzima que provoca 50% de inibição da auto-oxidação de epinefrina. Os resultados foram expressos como Unidade de SOD/mg de proteína.

#### **4.4.7 Ensaio da Catalase (CAT)**

A determinação da atividade da enzima catalase (CAT) foi realizada no homogenato celular das aortas, de acordo com o descrito por Aebi (1984), com modificações. Resumidamente, as amostras foram preparadas e acondicionadas em banho de gelo até o momento do ensaio. Numa cubeta de quartzo foram adicionados 3 ml de tampão fosfato (0,050 M, pH 7,4) e 60 µl da amostra, a reação se inicia pela ação de 40 µl de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (0,066 M em tampão de fosfato). As absorvâncias em 240 nm (espectrofotômetro Kasuaki) foram registradas a cada 15 segundos, pelo intervalo de 1 minuto. A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome metade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em um minuto. Os resultados foram expressos como coeficiente de extinção do peróxido por minuto ( $\Delta E \cdot \text{min}/\text{mg}$  proteína).

#### **4.4.8 Análise de deposição lipídica vascular *en face***

A análise “*en face*” foi padronizada conforme descrito previamente por Paigen et al. (1987). Após o corte para abertura do arco aórtico, as aortas foram presas em superfície de etil vinil acetato (EVA) com pinos de aço para manter sempre o tecido na sua posição plana e horizontal. A deposição lipídica foi avaliada por meio de coloração com o marcador de lipídeos Oil-Red (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Todas as amostras foram submersas em solução alcoólica com Oil-Red por um minuto e em seguida submersas em uma cuba com água até retirar todo o excesso do corante vermelho. A análise da deposição lipídica foi realizada por meio da intensidade e extensão da coloração vermelha

cujas imagens foram adquiridas usando uma câmera digital de alta resolução acoplada ao microscópio (Nikon, Eclipse 200), com objetiva de 100x, e realizada análise morfométrica pelo software “Image J” (domínio público – National Institute of Health, USA).

#### **4.5 Avaliação da genotoxicidade do hidrolisado proteico de sorgo pelo teste do Micronúcleo**

Para essa análise foram utilizados camundongos *knockout* para receptor de colesterol LDL (LDLr<sup>-/-</sup>), divididos em 3 grupos, contendo 5 animais em cada, sendo:

- HHL+: dieta hiperlipídica e hidrolisado proteico de sorgo (800 mg/kg PC), via gavagem, por 60 dias, e aplicação de dose única de ciclofosfamida (50 mg/kg PC) 24 h antes da eutanásia;
- HHL-: dieta hiperlipídica hidrolisado por gavagem (800 mg/kg PC) durante 60 dias, sem aplicação de agente indutor de dano;
- CHL+: dieta hiperlipídica e água por gavagem, com aplicação de dose única de ciclofosfamida (50 mg/kg de peso) 24 h antes da eutanásia.

No grupo HHL+ foi avaliado a capacidade do hidrolisado de proteção das células contra o dano induzido pela ciclofosfamida (efeito antimutagênico). No grupo HHL- foi avaliado se o tratamento com hidrolisado foi capaz de causar dano genético (genotoxicidade), em comparação com o grupo CHL+, que teve dano induzido pela ciclofosfamida e não recebeu o hidrolisado.

De acordo com Ribeiro, et al. (2003), após a eutanásia dos animais, foi removido o fêmur direito com realização de dois cortes, o primeiro na parte mais dura e o segundo do lado oposto, sendo a coleta de medula óssea realizada com auxílio de uma seringa de insulina, no sentido de caminhamento da medula óssea. Foram preparadas 3 lâminas para cada animal. Para preparo da lâmina adicionou-se 10 µl de soro fetal bovino, onde foi feita a homogeneização (com o auxílio de uma espátula) da medula óssea e em seguida, o esfregaço. As lâminas ficaram em repouso (secando) ao ar, em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos. Posteriormente as foram fixadas, sendo imersas no metanol (Neon®) por 10 minutos e coradas por 7 minutos no corante (Leishman, Sigma-Aldrich). A coloração serve para diferenciar eritrócito

policromático (PCE) de eritrócito normocromático (NCE). Eritrócitos policromático se coram de azul claro e eritrócitos normocromáticos se coram de rosa. Decorrido o tempo retirou-se as lâminas da cubeta, sendo as mesmas lavadas com água destilada para remover o excesso, e deixadas secar ao ar em temperatura ambiente.

A contagem de micronúcleos se deu em 2000 células de medula óssea do fêmur de cada animal, totalizando 10.000 células por grupo. A visualização das lâminas foi feita em óleo de imersão, com objetiva de 100X e ocular (10XNikon, Eclipse e200, Japão) (RIBEIRO et al. 2003). A contagem iniciou com 200 células de PCE e NCE, para realização da correlação e da quantidade de micronúcleos em PCE; posteriormente a contagem continuou apenas com PCE e micronúcleos até um total de 2000 células. A razão entre eritrócitos poli e monocromáticos avalia a genotoxicidade da substância testada. Uma quantidade menor de eritrócitos monocromáticos indica provável morte celular de eritrócitos policromáticos, que não se diferenciaram. Quanto maior a razão entre EPD/ENC, maior a genotoxicidade.

Para a indução de danos no DNA utilizou-se o agente alquilante, de ação indireta, ciclofosfamida (Fosfaseron®), na concentração final de 50 mg/kg PC, administrada por via intraperitoneal (i.p.), diluída em solução tampão fosfato (PBS). Este quimioterápico e imunossupressor tem sua ativação realizada principalmente no fígado e os seus metabólitos provocam potente ação mutagênica.

## **5. Análise estatística**

Os resultados foram inicialmente avaliados quanto a normalidade dos dados, pelo teste de Shapiro-Wilk. Para aqueles que apresentaram distribuição normal (testes paramétricos), a análise de 2 variáveis independentes foi comparada pelo teste T; e a análise de grupos, por meio de Análise de Variância (ANOVA) e, posteriormente, para diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade, foi realizado o teste de comparação de médias de Tukey, na mesma probabilidade.

Os resultados foram analisados pelo software SAS, versão online e de domínio público, expressos como média e desvio padrão.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Composição centesimal da farinha de sorgo e seu hidrolisado

Os resultados obtidos para composição centesimal da farinha de sorgo termicamente tratada e seu hidrolisado são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Média e desvio padrão da composição centesimal da farinha de sorgo e seu hidrolisado proteico

Componente	Farinha (%)	Hidrolisado (%)	p(F)	Varição
<b>Umidade</b>	5,96 ± 0,70	2,14 ± 0,07	0,0363*	↓64%
<b>Lipídeos</b>	2,96 ± 0,10	1,25 ± 0,56	0,0272*	↓58%
<b>Cinzas</b>	1,04 ± 0,06	2,87 ± 0,05	0,0346*	↑176%
<b>Carboidratos totais</b>	80,38 ± 1,20	76,70 ± 1,27	<0,0001*	↓4,6%
<b>Proteínas (Kjedhal)</b>	9,68 ± 0,66	17,04 ± 0,73	0,0083*	↑76%
<b>Proteínas (Bradford)</b>	7,56 ± 0,02	4,35 ± 0,021	0,0076*	↓42%

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste T.

Todos os constituintes analisados apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre a farinha e o hidrolisado proteico. O teor reduzido de umidade na farinha utilizada em relação à farinha integral de sorgo, que possui teor de 10,85% ± 0,05, segundo GOMES, 2020, e 8,87% ± 0,17, segundo Moraes, 2016, se deve ao tratamento térmico aplicado no produto. Esse tratamento térmico (121 °C por 25 min) foi realizado de forma a aumentar o teor de proteínas de reduzida massa molar e, conseqüentemente, de peptídeos com potencial bioativo (GOMES, 2020).

Em relação ao hidrolisado de sorgo, após o processo de digestão *in vitro* em meio aquoso, foi realizado o processo de liofilização para reduzir a umidade do produto, preservando seus compostos bioativos e facilitando o armazenamento do mesmo.

O sorgo apresenta conteúdo reduzido de lipídios e o teor inferior encontrado no hidrolisado deve-se, provavelmente, à maior parte dos lipídios ser descartada (precipitado) juntamente com as proteínas não hidrolisadas no processo de centrifugação para obtenção das proteínas solúveis (NILSANG et al. 2005), tendo em vista a sua baixa solubilidade em água. O baixo teor de

lipídios encontrado nos hidrolisados é favorável em relação à oxidação lipídica, estabilidade e qualidade sensorial do produto durante o armazenamento (VIEGAS, 2000; ZAVAREZE et al. 2009).

Embora haja diferença entre a quantificação de lipídeos nas amostras analisadas, ambas vão ao encontro do total de lipídeos citado por Queiroz et al, (2011) e Dicko et al. (2006), pelos quais os lipídeos podem corresponder de 1,24 a 3,07%, e de 1,5 a 6 % do grão, respectivamente.

As cinzas ou minerais totais aumentaram seu conteúdo no hidrolisado ( $\uparrow$ 176%), provavelmente devido ao menor teor de umidade do liofilizado, indicando preservação e concentração de componentes minerais como Cálcio, Fósforo, Magnésio, Ferro e Zinco, dos quais o sorgo é considerado fonte alimentar, por apresentar teor acima de 15% da ingestão diária recomendada de referência (MOTLHAODI et al. 2018). Com o aumento do conteúdo mineral no hidrolisado proteico, esse também pode ser considerado fonte dos minerais presentes no grão de sorgo, sugerindo que a hidrólise enzimática contribui no fornecimento de minerais essenciais e importantes na nossa alimentação. Além disso, os ajustes de pH realizados no processo de produção do hidrolisado com hidróxido de sódio (NaOH), também contribuíram para o aumento dos minerais totais no produto liofilizado (BENITEZ, et al., 2008; OLIVEIRA, 2013). Estudos com hidrolisados proteicos de origem animal que compararam os efeitos das hidrólises ácida e enzimática sobre a composição centesimal, encontraram maior concentração de cinzas nos hidrolisados obtidos por hidrólise enzimática, e atribuíram esse efeito à formação de NaCl, em função dos ajustes de pH realizados durante o processo de hidrólise enzimática das proteínas (MARTINS, et al., 2009; NEVES, et al., 2004). De acordo com Zavareze et al. (2009), o aumento no conteúdo de cinzas em hidrolisados proteicos é normal, em decorrência dos sais presentes nos tampões utilizados para manter o pH durante a hidrólise enzimática.

Sendo assim, a exposição do conteúdo do gérmen do grão de sorgo, onde se localizam os minerais (QUEIROZ et al., 2014), pelo tratamento térmico aplicado previamente à farinha, a redução da umidade pela desidratação (liofilização) do hidrolisado, e os ajustes de pH realizados, podem explicar o aumento no teor de cinzas do hidrolisado em relação à farinha. Resultados

semelhantes em relação ao maior teor de cinzas em hidrolisado proteico também foram encontrados em outros estudos nos quais também houve necessidade de ajuste de pH durante a hidrólise enzimática (OLIVEIRA, 2013, PACHECO et al, em 2005).

Como em todo cereal, os carboidratos correspondem ao principal macronutriente do sorgo. Resultados encontrados para o grão de sorgo variam entre 57,3% e 80% (DICKO et al., 2006; MARTINO et al., 2012) enquanto para a farinha, entre 71,8 e 76,36% (QUEIROZ, et al., 2014). Na farinha termicamente tratada, no entanto, o total de carboidratos ficou em torno de 80%, possivelmente devido ao emprego de calor seco, que reduziu o teor de umidade e aumentou o de carboidrato em relação ao esperado. Resultado semelhante foi encontrado por Gomes, 2020, no qual a farinha termicamente tratada apresentou teor de carboidratos de  $83,97\% \pm 0,27$ . Já no hidrolisado o total de carboidratos foi similar ao encontrado por Queiroz, et al., em 2014, para a farinha. O teor reduzido de carboidratos no hidrolisado, em comparação com a farinha termicamente tratada, se deve ao fato de que parte desse macronutriente, na farinha, está presente na forma de amido resistente e também ligado a fibras (polissacarídeos não digeríveis), dificultando sua solubilização e disponibilidade no hidrolisado.

Em relação à quantificação de proteínas pelo método Kjeldahl, os valores apresentados pela farinha de sorgo termicamente tratada vão ao encontro de Martino et al. (2012) e Borges (2013), que obtiveram valores de 8,6 a 11,9% de proteínas para farinhas de diversos genótipos de sorgo, e de 9,4 a 12,8% de proteínas de 3 genótipos de sorgo, respectivamente. Já o hidrolisado proteico apresentou teor de proteínas 56% maior do que o encontrado na farinha, e próximo do valor encontrado em alimentos vegetais ricos em proteínas, como a chia (20%) e o feijão carioca (em torno de 21%) (ALVES, et al, 2016; GRANCIERI, et al, 2019), muito consumidos por pessoas que seguem uma dieta livre de alimentos de origem animal, sendo, portanto, também uma alternativa com potencial comercial para esse público. Esse aumento na quantificação de proteínas no hidrolisado pode estar relacionado ao maior conteúdo de compostos nitrogenados de menor massa molecular, como peptídeos e aminoácidos, obtidos após hidrólise enzimática, já que esse método quantifica



nitrogênio de forma geral, sem distinguir proteínas de peptídeos e aminoácidos ou outros compostos nitrogenados, não proteicos (AOAC, 1997).

Os hidrolisados proteicos têm despertado grande interesse da indústria e são produzidos com várias finalidades. A grande concentração de proteínas e o aumento da digestibilidade e absorção das frações proteicas (absorção proteica até 6,8 vezes maior que as proteínas intactas), pela presença de peptídeos e aminoácidos, após hidrólise, os torna produtos diferenciados (BENITEZ, 2008). Segundo Clemente (2000), os principais usos dos hidrolisados proteicos na alimentação humana podem ser tanto para fins médicos quanto para produtos em geral, sob a forma de suplementação proteica em bebidas, dietas específicas para uso clínico, nutrição esportiva, além de compor fórmulas infantis hipoalergênicas. Quando desidratados estes hidrolisados apresentam como maior diferencial a vida de prateleira maior, além do alto conteúdo proteico e da maior solubilidade e digestibilidade (PEDERSEN, 1994).

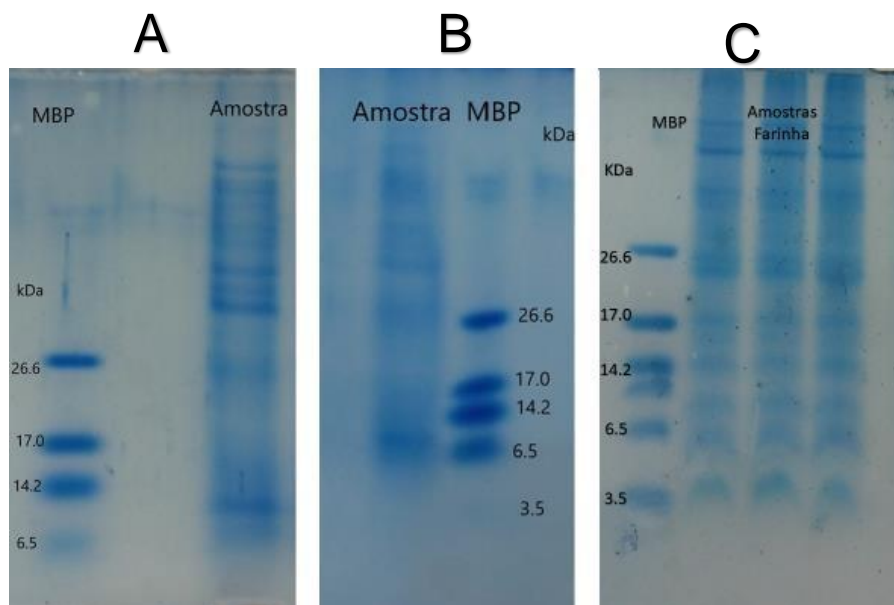
Os valores obtidos pelo método de Bradford indicam a quantidade de proteínas na farinha também semelhante ao previsto pelos autores supracitados (MARTINO et al., 2012 e BORGES, 2013). Porém, ao se comparar com o resultado obtido para o hidrolisado, há uma redução de 57% no teor proteico desse último, ao contrário do observado na determinação por Kjeldahl. Esse resultado pode ser atribuído ao fato de que o método Bradford quantifica proteínas íntegras, de alto peso molecular, desconsiderando peptídeos e aminoácidos (ZAIA, et al, 1998). Dessa forma, o resultado indica que a hidrólise enzimática reduziu a quantidade de proteínas íntegras da farinha, conforme esperado, pois gerou peptídeos e aminoácidos livres, incapazes de serem quantificados pelo método de Bradford.

Embora o método oficial para quantificação de proteínas em amostras de alimentos seja o Kjeldahl (AOAC, 1997), por se tratar de comparação entre o teor de proteínas da farinha e do hidrolisado, no qual presume-se a presença peptídeos e aminoácidos, foi necessária a realização da quantificação de proteínas por outro método, que considerasse apenas proteínas íntegras, como o Bradford, justamente para se obter o grau de hidrólise das proteínas presentes na farinha de sorgo, submetidas à hidrólise enzimática. O método de Bradford foi escolhido devido a sua praticidade e reprodutibilidade, além do baixo custo

(BRADFORD, 1976), e por quantificar proteínas de alto peso molecular, sem considerar pequenos peptídeos e aminoácidos, fornecendo assim um resultado mais próximo do teor de proteína íntegra residual na farinha, ou seja, que não sofreu hidrólise enzimática.

O grau de hidrólise (GH) é a porcentagem do número de ligações peptídicas clivadas em relação ao número total de ligações peptídicas no substrato, por unidade de peso (GUADIX et al. 2000; NIELSEN et al. 2001).

O GH foi calculado a partir do teor de proteínas pelo método de Bradford, considerando o teor de proteína original fornecido pela farinha e o teor após hidrólise enzimática. Encontramos então que o processo de hidrólise enzimática realizado na farinha levou à redução do seu conteúdo de proteínas de alto peso molecular em 42,5%, com formação de peptídeos e aminoácidos livres; porém, há que se levar em consideração, que a farinha recebeu tratamento térmico prévio (121 °C por 25 min), o que também levou à formação de peptídeos antes da obtenção do hidrolisado, como é possível visualizar na Figura 2, com presença de bandas nos marcadores abaixo de 10 kDa.



**Figura 2:** (A) eletroforese do hidrolisado de sorgo realizada com marcador de até 6,5 KDa, (B) eletroforese do hidrolisado realizada com marcador de até 3,5 KDa e (C) eletroforese da farinha termicamente tratada com marcador de até 3,5 KDa. MBP = Marcador de baixo peso molecular.

A hidrólise enzimática demonstrou que houve aumento do predomínio de peptídeos com peso molecular próximo de 6,5 kDa; porém, não demonstrou presença de peptídeos de 3,5 kDa, podendo ter havido uma possível degradação desses compostos em moléculas menores, ou mesmo, em aminoácidos. Ainda, alguns autores relatam a dificuldade da eletroforese de detectar pequenos peptídeos (<2.000 Da), uma vez que estes podem ser removidos durante os procedimentos de lavagem e revelação do gel, sendo também difícil a separação de peptídeos com massas moleculares semelhantes ou que apresentem cargas elétricas (Kanekanian et al. 2000, Farvin et al. 2010).

Com a hidrólise enzimática, ocorrem algumas mudanças nas propriedades moleculares das proteínas, como a diminuição da massa, o aumento da carga e a liberação de aminoácidos hidrofóbicos, entre outros fenômenos. Como resultado destas modificações verifica-se alterações em suas propriedades nutricionais, com aumento da digestibilidade e redução da alergenicidade, e em propriedades funcionais, com a liberação de peptídeos bioativos (BENÍTEZ et al. 2008).

Peptídeos vegetais tem sido objeto de diversos estudos que avaliam sua atividade biológica, uma vez que, com base nas suas propriedades estruturais e sua composição de aminoácidos e sequências, podem desempenhar vários papéis, como antimicrobiano (BAMDAD et al., 2015), antioxidante (POWER et al., 2013), antitrombótico (SHIMIZU et al., 2008), hipocolesterolêmico (TONG et al., 2012), e anti-hipertensivo (XU, et al, 2019; JIA et al., 2019). Estes peptídeos contêm cerca de 2 a 20 aminoácidos e geralmente apresentam massas moleculares menores que 6000 Daltons (6 KDa) (PRADO, 2016), embora estudos também demonstrem atividade bioativa em peptídeos com massa molecular de até 10 mil Daltons (10 KDa) (XU et al, 2019-b). Esse último estudo forneceu uma abordagem viável para a produção de antioxidantes peptídicos a partir de kafirina de sorgo. Após a produção do hidrolisado proteico, por meio de alcalase, a fração peptídica de tamanho médio (5 a 10 kDa) revelou um conteúdo fenólico total relativamente mais alto e atividades antioxidantes mais fortes em relação à eliminação de radicais livres, atividade quelante de íons metálicos, poder redutor e capacidade de absorção de radicais de oxigênio.

As kafirinas são as prolaminas predominantes no sorgo, e apresentam baixa digestibilidade. As  $\alpha$ -kafirinas são as últimas proteínas a serem digeridas no intestino e, devido à sua alta abundância, a indigestibilidade reduz seu valor nutritivo (WU et al, 2013; SELA et al, 2020). O peso molecular varia conforme o tipo de proteína, sendo que as  $\alpha$ -Kafirinas possuem entre 23 a 27 kDa,  $\beta$ -Kafirinas apresentam bandas de 16, 18 e 20 kDa e, por fim,  $\gamma$ -Kafirinas com 28 kDa (ESPINOSA et al. 2016). O perfil eletroforético da farinha termicamente tratada indica a presença dos diferentes tipos de kafirina de sorgo, enquanto no hidrolisado observamos maior incidência de peptídeos com massas moleculares menores (em torno de 6,5 kDa), indicando que, através de clivagem de ligações peptídicas, a hidrólise enzimática pôde diminuir a massa molecular, aumentando a reatividade e melhorando as propriedades funcionais das proteínas (SOARES, 2013).

Com relação à distribuição do peso molecular, sabe-se que hidrolisados contendo peptídeos com massas moleculares entre 5 e 20 kDa são utilizados geralmente como fontes de nitrogênio, em alimentos para fins especiais e suplementos alimentares para adultos, além das formulações para dietas enterais para a alimentação infantil ou de adultos enfermos (BENÍTEZ et al. 2008). Na alimentação enteral dá-se preferência aos hidrolisados proteicos ricos em peptídeos de baixa massa molecular, devido à excelente absorção gastrointestinal e a sua baixa osmolalidade, sendo estes melhor utilizados pelo organismo do que as proteínas intactas ou os aminoácidos livres (NEVES et al. 2004; BENÍTEZ et al. 2008). Os hidrolisados também podem ser utilizados na alimentação de idosos, em suplemento para atletas, em dietas para controle de peso, no tratamento clínico de indivíduos com desordens específicas de digestão e absorção, bem como em pacientes com desnutrição associada ao câncer, trauma, queimaduras e problemas hepáticos (NEVES et al. 2004; BENÍTEZ et al. 2008).

Alguns autores demonstraram que a ingestão de hidrolisados proteicos, quando comparada com a proteína intacta, acelerou a digestão e a absorção proteicas, promovendo maior disponibilidade pós-prandial de aminoácidos, com consequente aumento na taxa de incorporação destes aminoácidos em proteínas musculares (SPELLMAN e cols., 2003; KOOPMAN et al. 2009). Outra aplicação importante refere-se ao desenvolvimento de produtos voltados para

crianças com desordens no metabolismo de aminoácidos, como a fenilcetonúria ou com alergia às proteínas do leite ou de outros alimentos (GUADIX et al. 2006; BERG et al. 2008).

### 6.3 Compostos fenólicos e atividade antioxidante da farinha de sorgo e seu hidrolisado

O sorgo é considerado uma excelente fonte de compostos fenólicos, rico em 3-deoxiantocianidinas e taninos, os quais estão intimamente relacionados à redução de marcadores de inflamação crônica, marcadores adipogênicos e redução da hipertrofia do tecido adiposo (ARBEX et al., 2018). O teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante, por meio da inibição de radicais DPPH e ABTS, estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Média e desvio padrão do conteúdo de compostos fenólicos totais (mEq de ácido gálico/g de amostra), e perfil antioxidante (percentual de inibição de radical (I%) da farinha e do hidrolisado proteico de sorgo.

Componente	Farinha	Hidrolisado	p(F)
<b>Compostos Fenólicos</b>	0,92 ± 0,02	1,57 ± 0,12	0,0004*
<b>DPPH</b>	69,52 ± 2,55	81,47 ± 1,26	<0,0001*
<b>ABTS</b>	88,69 ± 0,39	90,47 ± 0,68	<0,0001*

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste T.

Os teores de compostos fenólicos encontrados na farinha termicamente tratada estão compatíveis com os valores encontrados por Gomes (2020) e Cardoso, et al. (2013). Porém, este estudo demonstrou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre a farinha e o hidrolisado proteico, sugerindo que o processo de produção do hidrolisado foi capaz de preservar, concentrar e disponibilizar os compostos fenólicos, que no sorgo estão presentes na forma de ácidos fenólicos e flavonoides. Os flavonóides, considerados o principal grupo de compostos fenólicos, incluem as antocianinas, que no sorgo, são denominadas 3-deoxiantocianidinas (3-DXAS), devido à ausência de uma molécula de oxigênio na posição C-3 de sua estrutura química, o que possibilita uma maior

estabilidade em pH elevado, tornando-as, portanto, mais vantajosas comercialmente em comparação com as encontradas em frutas e vegetais (AWIKA; ROONEY, 2004).

Os fatores que influenciam na estabilidade desses compostos são: pH, temperatura, presença de oxigênio, enzimas e também, a interação com outros componentes do alimento como ácido ascórbico, íons metálicos, carboidratos (principalmente os não digeríveis) e copigmentos (Jackman & Smith, 1992). A estabilidade térmica de pigmentos das 3-deoxiantocianidinas já foi avaliada por Yang, Dykes & Awika, (2014) que demonstraram boa estabilidade quando submetidas a 95 °C por 2 h e 121 °C por 30 min. Os efeitos do processamento doméstico com calor seco e calor úmido sobre os compostos bioativos do sorgo foram avaliados por Cardoso, et al., (2013), Oliveira (2015) e Gomes (2020), que constataram que o calor seco não afeta o conteúdo das 3-deoxiantocianidinas, compostos fenólicos e atividade antioxidante, mas o mesmo não acontece quando submetidos a tratamentos de calor úmido. Além disso, Oliveira (2015) constatou que a farinha conservou melhor o teor das 3-DXAs em relação aos grãos de sorgo. Devi, Saravanakumar & Mohandas (2012) também observaram que as 3-DXAs em extratos de farelo de sorgo vermelho foram estáveis a variações de temperatura, luz e pH.

A maior estabilidade das 3-deoxiantocianinas a altas temperaturas e pH elevado (YANG, DYKES & AWIKA, 2014), bem como à redução da polimerização dos ácidos fenólicos com carboidratos pelo tratamento térmico aplicado à farinha, com consequente aumento da disponibilidade dos mesmos, sem prejudicar a atividade antioxidante (LOPEZ, 2016; OLIVEIRA, 2015; CARDOSO, et al, 2014), podem justificar a maior concentração de compostos fenólicos no hidrolisado proteico de sorgo. Somado a isso, tem-se a redução do teor de umidade da amostra que, novamente, favorece a concentração dos demais constituintes do sorgo.

Da mesma forma, a atividade antioxidante do hidrolisado proteico apresentou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em comparação à farinha de sorgo, no que tange ao percentual de inibição de radicais ABTS e DPPH, indicando que o processo de produção do hidrolisado enzimático não degradou os compostos fenólicos e demais compostos com atividade antioxidante. Além de preservar os compostos fenólicos, o hidrolisado proteico contém peptídeos com uma

diversidade de tamanhos (peso molecular) e composição aminoacídica, os quais podem apresentar efeito antioxidante, contribuindo assim para o resultado obtido (HIMANI, et al., 2017; XU et al., 2019a e 2019b).

A atividade antioxidante do sorgo hidrolisado depende de vários fatores como massa molecular dos peptídeos liberados durante a hidrólise, sua composição aminoacídica e hidrofobicidade (SARMADI; ISMAIL, 2010). Estudos anteriores já demonstraram maior atividade antioxidante e concentração de compostos fenólicos em frações peptídicas com massa molecular entre 3 e 10 Kda, obtidas a partir de hidrólise enzimática de proteínas do sorgo (Himani, et al., 2017; Xu, et. al, 2019a, 2019b), tornando os resultados encontrados no presente estudo promissores, uma vez que houve grande concentração de peptídeos nas bandas em torno de 6,5 KDa, conforme Figura 3 (A e B). A alta atividade antioxidante observada no hidrolisado, bem como a maior concentração de compostos fenólicos, juntamente com a presença de peptídeos com massa molecular abaixo de 10 KDa, tornam o hidrolisado um produto com alto potencial biológico, podendo atuar na prevenção e controle de doenças crônicas.

Sendo assim, o hidrolisado de sorgo, além do seu conteúdo proteico, composto por peptídeos com provável atividade funcional, possui alto teor de compostos fenólicos e elevada atividade antioxidante, podendo ser utilizado como ingrediente de diversos produtos alimentícios e nutracêuticos, inclusive em substituição a outras proteínas vegetais como soja, arroz, milho e ervilha, as quais possuem menor teor de fenólicos em comparação ao sorgo (QIU, 2020).

#### **6.4 Avaliação da toxicidade *in vivo* da farinha de sorgo e seu hidrolisado**

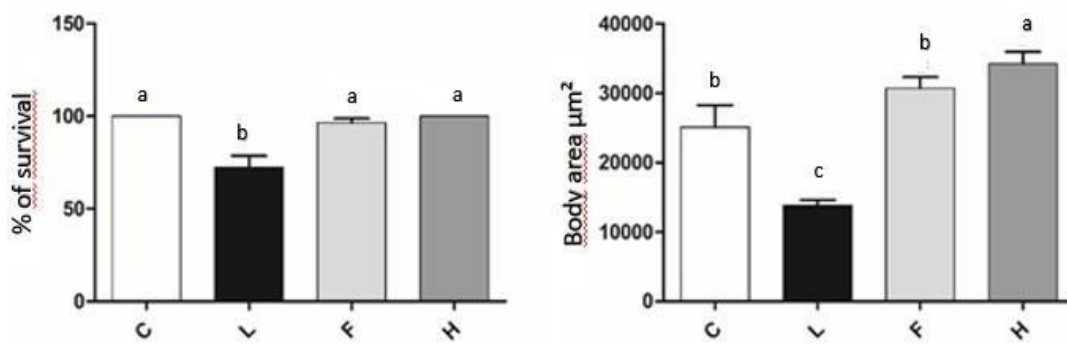
A toxicidade *in vivo* foi avaliada utilizando o modelo animal *Caenorhabditis elegans*, um nematódeo terrestre de vida livre pertencente à família *Rhabditidae*. Ele é facilmente cultivado em laboratório em placas de petri contendo ágar semeadas com a bactéria *Escherichia coli* como alimento. Os vermes atingem a maturidade com 2,5 dias a 25 °C e apresentam um tempo de vida curto, de 20 dias a 25 °C. O ciclo de vida do animal compreende um período de desenvolvimento embrionário (dentro do ovo), quatro estágios larvais (L1; L2; L3 e L4) e finalmente o adulto (WORMATLAS, 2014).

Do ponto de vista toxicológico o *C. elegans* é sensível a um amplo número de substâncias, incluindo metais pesados, fosfatos orgânicos e pesticidas (SCHOUET et al., 2009; LEUNG et al., 2008; WOLLENHAUPT et al., 2014). Estudos já demonstraram que o *C. elegans* é utilizado como modelo para o teste rápido da toxicidade de amostras de solo e água (MICHALSKI, 2010), bem como de compostos farmacêuticos e fitoquímicos (SCHOUET et al., 2009). Vários pesquisadores utilizaram-no como biossensor para testar substâncias que aumentam a longevidade como vitamina E (ADACHI, 2000); extratos de mirtilo e “blueberry”, ricos em polifenóis (WILSON et al., 2006); extrato de Ginkgo biloba, rico em glicosídeos e terpenóides (KAMPKÖTTER et al., 2007); a quercetina, flavonóide abundante em plantas comestíveis (PIETSCH et al., 2009), e o resveratrol, polifenol abundante nas cascas de uva (BASS et al., 2007). Recentemente, utilizando a mesma metodologia apresentada neste estudo, o *C. elegans* foi utilizado como modelo para testar a toxicidade da bebida de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) fermentada espontaneamente, demonstrando sobrevivência e desenvolvimento dos vermes expostos à bebida (SOUZA, 2020).

Os parâmetros mais relevantes para a triagem toxicológica são a mortalidade, a longevidade, o comportamento/movimento, a alimentação, o crescimento e a reprodução (ANDERSON; BOYD; WILLIAMS, 2001). Esse modelo apresenta grandes vantagens em relação à cultura de células, pois é um organismo multicelular permitindo que a ação dos compostos estudados seja avaliada de forma sistêmica. Além disso, o cultivo e os experimentos realizados com este organismo são muito mais baratos, quando comparados com testes em camundongos ou outros modelos mamíferos. Isto se deve principalmente ao fato de que, no caso do *C. elegans*, a oferta de animais não é limitante, uma vez que eles crescem rapidamente em um sistema simples e barato, onde podem ser gerados milhares de animais em alguns poucos dias. Estas vantagens permitiram o desenvolvimento de estratégias de alta demanda para identificação de compostos que causam alterações no *C. elegans* (FITZGERALD et al., 2009).

Os resultados dos ensaios realizados com *C. elegans* são mostrados na Figura 3. A toxicidade foi apresentada pelo cálculo das taxas de inibição do crescimento e sobrevivência.





**Figura 3:** Média e desvio padrão para sobrevivência e desenvolvimento do *Caenorhabditis elegans* expostos à farinha e ao hidrolisado proteico de sorgo, sendo C = Controle, L = Levamisol, F = Farinha e H = Hidrolisado. Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.



**Figura 4:** Fotografias de vermes adultos, sendo C = grupo Controle; L = grupo tratado com Levamisol; H = grupo tratado com hidrolisado proteico de sorgo, e F = grupo tratado com farinha de sorgo.

Como esperado, o grupo Levamisol determinou redução da sobrevivência e da área corporal, em relação ao controle. O Levamisol é um anti-helmíntico de ação rápida que paralisa a musculatura do verme dentro de segundos de contato ao agir nos gânglios nervosos do nematoide. Incapaz de mudar de posição, os

vermes deixam de se alimentar e com isso, tanto o desenvolvimento quanto a sobrevivência, são afetados (Martin et al., 2012).

Os valores percentuais de sobrevivência dos vermes que foram expostos à farinha e ao hidrolisado do sorgo foram iguais aos sem intervenção (controle -  $p > 0,05$ ) e superiores aos do grupo Levamisol ( $p \leq 0,05$ ). Da mesma forma, *C. elegans* com farinha não tiveram redução da sua área corporal, pois seus valores foram semelhantes ao controle ( $p > 0,05$ ), e superiores aos do grupo Levamisol ( $p \leq 0,05$ ). Ressalta-se que os vermes expostos ao hidrolisado do sorgo tiveram um desenvolvimento superior aos grupos controle e farinha ( $p \leq 0,05$ ).

Esses resultados demonstram que, tanto a farinha quanto o hidrolisado de sorgo não possuem efeito tóxico quando avaliados no modelo experimental dos nematódeos *C. elegans*, uma vez que não alteraram a taxa de sobrevivência, especialmente o hidrolisado, favoreceu o desenvolvimento dos animais. No grupo alimentado com hidrolisado proteico de sorgo, acredita-se que a ação dos compostos bioativos sobre o estresse oxidativo observada nos *C. elegans*, esteja associada não apenas à remoção de radicais livres, mas também pela ativação de vias de sinalização de proteção, levando à uma taxa de desenvolvimento e sobrevivência maior em relação ao grupo alimentado com farinha. (MARTINDALE & HELBROOK, 2002). Associado a isso, a maior permeabilidade de peptídeos e aminoácidos, presentes em maior quantidade no hidrolisado, pode ter contribuído para o aumento do desenvolvimento dos vermes expostos a ele.

O nematódeo *C. elegans* possui o genoma sequenciado, permitindo modificações genéticas, avaliação da mutagenicidade de substâncias testadas, e a avaliação translacional das manifestações com o ser humano (MENEELY, 2019). Sendo assim, a ausência de toxicidade nos testes realizados com a farinha de sorgo e seu hidrolisado proteico, incentiva tanto o consumo desse cereal como o desenvolvimento de produtos biotecnológicos, com ação na prevenção e no controle de doenças crônicas.

## 6.5 Avaliação *in vivo*

### 6.5.1 Avaliação de indicadores de adiposidade, peso corporal e consumo alimentar

Na tabela 4 são apresentados os resultados da avaliação dos tratamentos sobre o peso corporal, medidas biométricas e o consumo alimentar, conforme grupo experimental.

**Tabela 4:** Efeito da farinha integral e do hidrolisado de sorgo sobre a massa corpórea e medidas biométricas dos animais.

Análises	Grupos experimentais				
	C57NL	CNL	CHL	FHL	HHL
IA	1,43 ± 0,41 <sup>b</sup>	1,52 ± 0,37 <sup>b</sup>	2,79 ± 0,51 <sup>a</sup>	1,76 ± 0,33 <sup>b</sup>	1,38 ± 0,35 <sup>b</sup>
IH	5,36 ± 0,76 <sup>b</sup>	4,75 ± 1,13 <sup>b</sup>	7,86 ± 1,09 <sup>a</sup>	5,87 ± 1,02 <sup>b</sup>	5,79 ± 1,33 <sup>b</sup>
CEA	0,08 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,04 <sup>a</sup>
ILee	0,12 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,04 <sup>a</sup>
GP (g)	3,75 ± 0,71 <sup>a</sup>	1,67 ± 0,51 <sup>b</sup>	0,67 ± 1,03 <sup>b</sup>	0,33 ± 0,82 <sup>b</sup>	1,33 ± 0,41 <sup>b</sup>
CAS (g)	13,59 ± 0,70 <sup>a</sup>	13,78 ± 0,75 <sup>a</sup>	8,83 ± 1,33 <sup>b</sup>	8,28 ± 1,87 <sup>b</sup>	10,81 ± 0,95 <sup>b</sup>

Valores expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) pelo Teste Tukey, sendo C57NL o grupo controle normal, com ração normal; CNL o grupo knockout LDL<sup>-/-</sup> com ração normal; CHL o grupo knockout LDL<sup>-/-</sup> com dieta hiperlipídica; FHL o grupo knockout LDL<sup>-/-</sup> com dieta hiperlipídica e 800mg de farinha/Kg de PC, e HHL o grupo knockout LDL<sup>-/-</sup> com dieta hiperlipídica e 800mg de hidrolisado proteico/Kg de PC. IA: Índice de adiposidade, IH: Índice Hepatosomático, CEA: Coeficiente de eficiência alimentar, ILee: Índice de Lee (obesidade), GP: Ganho de Peso, CAS: Consumo alimentar semanal

Os dados referentes ao índice de adiposidade e índice hepatossomático dos grupos alimentados com farinha e hidrolisado de sorgo apresentaram resultado semelhante aos grupos controle (C57NL e CNL), com diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo controle hiperlipídico (CHL). Esse resultado indica que tanto a farinha quanto o hidrolisado foram capazes de inibir o acúmulo de gordura no fígado e no tecido adiposo, o que pode estar relacionado à ação de compostos bioativos como antocianinas e ácidos fenólicos, além da fibra alimentar presente no sorgo vermelho, cujas atividades

de redução de colesterol e reversão da esteatose hepática, já foram relatados (MORAES, et al., 2012; CRUZ et al., 2016); também indica que, na ausência das intervenções, a dieta hiperlipídica foi capaz de gerar acúmulo de gordura no fígado e no tecido adiposo dos animais. Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos realizados por Sousa, em 2017, e Arbex, 2015, nos quais o índice hepatossomático do grupo controle hiperlipídico foi maior em relação aos grupos que receberam dieta acrescida de farinha extrusada de sorgo.

Não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) em relação ao coeficiente de eficiência alimentar e ao índice de obesidade (índice de Lee). Embora a densidade calórica da dieta hiperlipídica pudesse influenciar no ganho de peso dos animais, esse fator não foi suficiente para causar aumento de peso, uma vez que houve baixo consumo alimentar dos animais que receberam essa dieta, em comparação aos grupos Controle.

Verificou-se nesse estudo que o consumo alimentar dos grupos que receberam dieta hiperlipídica (CHL, FHL, HHL) foi semelhante e, em geral, menor que o dos grupos controle (C57NL, CNL), e isto ocorreu provavelmente em virtude da elevada densidade energética de dietas hiperlipídicas (SOUSA, 2017) e, talvez, pela menor palatabilidade da dieta. A maior ingestão alimentar nos grupos C57NL e CNL também levou ao maior ganho de peso dos animais, em comparação aos demais grupos experimentais. O ganho de peso dos animais que receberam dieta hiperlipídica, com ou sem intervenção, foi semelhante, diferindo estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) dos grupos alimentados com ração normal, nos quais os animais apresentaram maior ganho de peso. Dentre os animais que consumiram dieta hiperlipídica, o grupo que recebeu farinha integral de sorgo apresentou menor ganho de peso, provavelmente porque o alto teor de fibras na farinha, associado à maior densidade calórica da dieta, provocou maior saciedade e menor consumo alimentar, quando comparado aos demais grupos (ARBEX, 2015). É importante observar que o grupo CHL, embora tenha apresentado ganho de peso e consumo alimentar semelhante aos demais grupos com dieta hiperlipídica, foi o que apresentou maiores índices de adiposidade e hepatossomático, indicando que, mesmo diante do baixo consumo alimentar, a dieta hiperlipídica foi capaz de aumentar o acúmulo de gordura no tecido adiposo e no fígado desses animais. Em contrapartida, nos

grupos FHL e HHL, as intervenções com a farinha e o hidrolisado foram capazes de controlar o acúmulo de gordura tanto no fígado quanto no tecido adiposo.

### 6.5.2 Análises bioquímicas

As análises referentes à atividade antioxidante do plasma e do fígado (ABTS e DPPH), perfil lipídico (CT, HDL, LDL, TG), quantificação de enzimas antioxidantes SOD e CAT e peroxidação lipídica pelo ensaio TBARS estão apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5:** Análises bioquímicas do plasma, fígado e aorta dos grupos experimentais.

Análises	Grupos experimentais				
	C57NL	CNL	CHL	FHL	HHL
<b>ABTS plasma (%I)</b>	9,09 ± 1,21 <sup>a</sup>	5,49 ± 1,43 <sup>b</sup>	3,17 ± 1,90 <sup>b</sup>	10,86 ± 2,78 <sup>a</sup>	11,85 ± 2,35 <sup>a</sup>
<b>ABTS fígado (%I)</b>	15,60 ± 2,15 <sup>c</sup>	12,26 ± 1,64 <sup>c</sup>	8,58 ± 1,89 <sup>d</sup>	21,89 ± 2,76 <sup>b</sup>	28,74 ± 2,33 <sup>a</sup>
<b>DPPH plasma (%I)</b>	16,22 ± 1,99 <sup>c</sup>	12,52 ± 2,22 <sup>c</sup>	3,63 ± 2,36 <sup>d</sup>	21,52 ± 2,35 <sup>b</sup>	28,12 ± 2,49 <sup>a</sup>
<b>DPPH fígado (%I)</b>	10,77 ± 2,54 <sup>b</sup>	9,98 ± 2,38 <sup>b</sup>	2,45 ± 1,28 <sup>c</sup>	17,30 ± 1,99 <sup>a</sup>	17,43 ± 2,46 <sup>a</sup>
<b>Colesterol total (mg/dl)</b>	169,02 ± 2,20 <sup>e</sup>	192,61 ± 2,33 <sup>d</sup>	429,34 ± 2,68 <sup>a</sup>	367,85 ± 2,01 <sup>b</sup>	326,43 ± 1,82 <sup>c</sup>
<b>HDL (mg/dl)</b>	96,32 ± 2,24 <sup>b</sup>	89,06 ± 2,19 <sup>b</sup>	62,17 ± 1,29 <sup>c</sup>	93,22 ± 1,64 <sup>b</sup>	125,39 ± 1,27 <sup>a</sup>
<b>LDL (mg/dl)</b>	72,70 ± 1,70 <sup>d</sup>	103,55 ± 2,14 <sup>c</sup>	267,17 ± 2,54 <sup>a</sup>	154,63 ± 2,41 <sup>b</sup>	101,04 ± 2,23 <sup>c</sup>
<b>Triglicerídeos (mg/dl)</b>	91,83 ± 1,96 <sup>b</sup>	94,50 ± 1,31 <sup>b</sup>	179,89 ± 1,69 <sup>a</sup>	163,89 ± 0,15 <sup>a</sup>	164,31 ± 1,77 <sup>a</sup>
<b>TBARS plasma (MDA µM)</b>	2,51 ± 0,64 <sup>a</sup>	3,29 ± 0,70 <sup>a</sup>	3,85 ± 0,57 <sup>a</sup>	2,89 ± 0,92 <sup>a</sup>	2,84 ± 0,61 <sup>a</sup>
<b>TBARS fígado (MDA µM)</b>	5,73 ± 1,23 <sup>a</sup>	6,53 ± 1,32 <sup>a</sup>	7,43 ± 1,09 <sup>a</sup>	6,25 ± 1,73 <sup>a</sup>	6,48 ± 0,34 <sup>a</sup>
<b>SOD (un/mg PTN)</b>	8,15 ± 1,71 <sup>b</sup>	8,74 ± 1,26 <sup>b</sup>	6,90 ± 2,99 <sup>b</sup>	10,79 ± 1,69 <sup>b</sup>	14,09 ± 2,05 <sup>a</sup>
<b>CAT (un/mg PTN)</b>	8,85 ± 2,75 <sup>a</sup>	8,78 ± 2,35 <sup>a</sup>	6,54 ± 2,33 <sup>a</sup>	10,21 ± 1,48 <sup>a</sup>	9,97 ± 1,65 <sup>a</sup>

Valores expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) pelo Teste Tukey, sendo C57NL o grupo controle normal, com ração normal; CNL o grupo knockout LDL<sup>-/-</sup> com ração normal; CHL o grupo knockout LDL<sup>-/-</sup> com dieta hiperlipídica; FHL o grupo knockout LDL<sup>-/-</sup> com dieta hiperlipídica e 800 mg de farinha de sorgo /kg de PC, e HHL o grupo knockout LDL<sup>-/-</sup> com dieta hiperlipídica e 800 mg de hidrolisado proteico de sorgo /kg de PC.

A atividade antioxidante do plasma e do fígado dos animais foi avaliada por meio do percentual de inibição (%) dos radicais ATBS e DPPH. Os grupos alimentados com farinha e hidrolisado proteico de sorgo apresentaram maior capacidade de inibição do radical ABTS e DPPH tanto no plasma quanto no fígado, em comparação aos demais grupos ( $p \leq 0,05$ ), com destaque para o grupo HHL. Exceção foi para a capacidade de inibição do ABTS no plasma que não diferiu do controle C57NL ( $p > 0,05$ ).

A capacidade de inibição dos radicais avaliados pode estar relacionada à ação de peptídeos, obtidos tanto pelo tratamento térmico aplicado à farinha quanto pelo processo de hidrólise enzimática, para obtenção do hidrolisado proteico. Em estudos realizados por Himani, et al., em 2017, e Xu et al., em 2019, as proteínas do sorgo produziram peptídeos com forte capacidade de eliminação de radicais livres após hidrólise enzimática, e a fração peptídica de tamanho médio (3 a 10 kDa) revelou um conteúdo fenólico total relativamente mais alto e atividades antioxidantes mais fortes em relação à eliminação de radicais livres, corroborando nossos achados. O estudo de Khan et al. (2015), apontou que em humanos após o consumo de um alimento contendo 30% de sorgo de pericarpo vermelho, houve aumento significativo na capacidade antioxidante do plasma em relação a aqueles que não consumiram o sorgo. Segundo Himani et al (2021) o sorgo de pericarpo vermelho, o qual originou a farinha utilizada no presente estudo, apresentou maior conteúdo fenólico total e maior concentração de 3-desoxianocianidinas, resultando em altas atividades antioxidantes gerais.

Distintos mecanismos para explicar a capacidade antioxidante destes peptídeos incluem a inibição da peroxidação lipídica, o sequestro de radicais livres, a quelação de íons metálicos de transição e, provavelmente, a indução de genes responsáveis pela proteção celular contra as espécies reativas de oxigênio (EROs). As propriedades antioxidantes dos hidrolisados proteicos estão relacionadas com a estrutura, composição e hidrofobicidade de seus peptídeos (SARMADI, ISMAIL 2010).

Dessa forma, o efeito das intervenções com farinha e hidrolisado proteico na atividade antioxidante do plasma e no fígado dos animais (FHL e HHL), encontrados nesse estudo, podem estar relacionados ao tratamento térmico aplicado à farinha de sorgo, que aumentou a disponibilidade dos compostos fenólicos; à maior estabilidade das 3-deoxiantocianidinas, principais flavonóides

presentes no sorgo; à maior concentração desses e outros compostos fenólicos no hidrolisado proteico; e a presença de peptídeos, com possível atividade antioxidante, tanto na farinha quanto no hidrolisado.

Em relação ao perfil lipídico, a maior média de Colesterol total e LDL colesterol foi encontrada no grupo controle hiperlipídico (CHL) que apresentou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação a todos os demais grupos experimentais. Os grupos FHL e HHL apresentaram taxas reduzidas, indicando que a intervenção foi capaz de controlar as taxas de CT mesmo em condições de pré-disposição dos animais, que naturalmente possuem níveis elevados de LDL-c circulante pela ausência dos receptores, mesmo em uso de dietas normolipídicas (POLEDNE, et al., 2017). Isso demonstra resultados bastante promissores em situações que o consumo alimentar não é o único fator determinante. Inclusive, o grupo HHL conseguiu reduzir o LDL a valores semelhantes ao controle CNL ( $p > 0,05$ ), também com predisposição, mas recebendo dieta normolipídica.

Em adição a esses resultados, observamos maior média de HDL ( $p \leq 0,05$ ) também para o grupo HHL e médias semelhantes ( $p > 0,05$ ) para os grupos FHL e seus controles normais - C57NL e CNL.

Esse efeito do sorgo de controle sobre os níveis séricos de colesterol total e LDL-c já foi constado em estudos anteriores. Os esteróis, tais como o sitosterol, presentes no sorgo, são capazes de reduzir a concentração de colesterol e LDL-colesterol no plasma humano e animal (KATAN et al., 2003). Um estudo realizado por Althwab, em 2016, para avaliação *in vivo* da ação dos fitosteróis presentes no sorgo, demonstrou que todas as frações lipídicas extraídas do sorgo vermelho não apenas reduziram a absorção de colesterol, mas também regularam diferentes vias envolvidas no seu metabolismo. Além disso, peptídeos presentes na farinha termicamente tratada e no hidrolisado, podem ter efeito hipocolesterolêmico, por meio da inibição, modulação ou regulação de alguns genes transportadores ou enzimas relacionadas à inibição da síntese endógena e absorção intestinal do colesterol (FONTANARI et al., 2012; MARQUES et al., 2015; CORREA; POLTRONIERI, 2016). Extratos liofilizados de compostos fenólicos de sorgo (50 a 600 mg/kg, por 14 dias) também reduziram a concentração plasmática de colesterol total e triglicéridios em ratos (CHUNG,

KIM, et al., 2011; PARK, 2012). Hamid, et al, em 2017, avaliaram o papel da fibra dietética  $\beta$ -glucana do sorgo no perfil lipídico de ratos hipercolesterolêmicos induzidos por dieta, e constataram que o CT, VLDL, LDL e os níveis de triglicerídeos diminuíram significativamente, enquanto uma proporção mais alta de HDL foi registrada. Ham et al., em 2019, constatou redução dos níveis séricos de LDL-colesterol pelo extrato fermentado de sorgo vermelho em animais com dieta aterogênica. Em outro estudo publicado por Liu, et al, em 2021, foi constatada redução da síntese e absorção de colesterol em camundongos hipercolesterolêmicos tratados com dieta acrescida de grãos de sorgo, além da redução significativa dos níveis de LDL-C.

As dosagens de Triglicerídeos foram semelhantes entre os grupos que receberam dieta hiperlipídica, e diferentes ( $p \leq 0,05$ ) dos grupos controle CNL e C57NL, não demonstrando efeito das intervenções sobre os níveis de TG nos grupos FHL e HHL.

A peroxidação lipídica foi avaliada no plasma e no fígado dos animais pelo ensaio TBARS (do inglês: *Thiobarbituric acid reactive substances*), que quantifica substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, formadas como um subproduto da peroxidação lipídica (isto é, como produtos de degradação de gorduras). Não houve diferença ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos experimentais. Esses resultados vão de encontro ao estudo realizado por Pereira, et al., 2018, no qual não houve diferença nos níveis de peroxidação lipídica entre os grupos tratados, com dieta hiperlipídica e dieta normal.

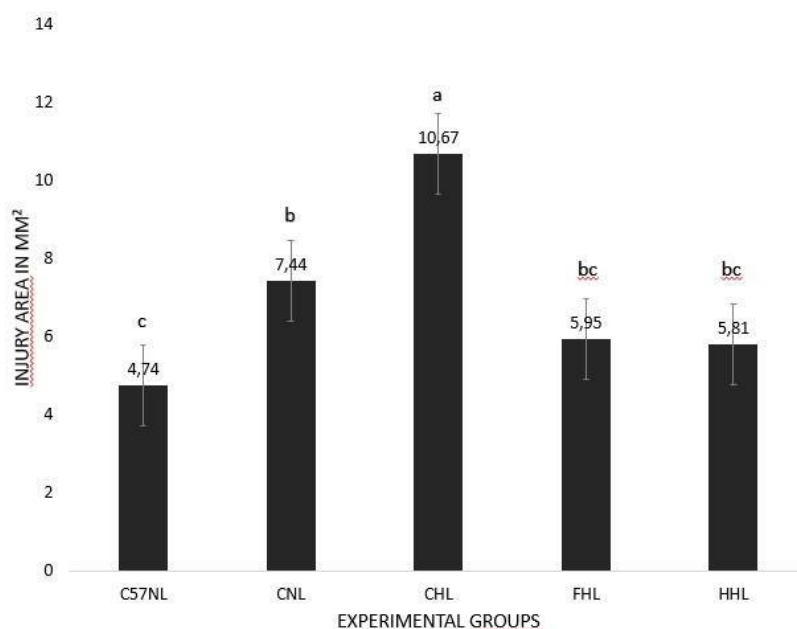
Em relação às dosagens das enzimas antioxidantes Superóxidodismutase (SOD) e Catalase (CAT), importantes marcadores da capacidade antioxidante endógena, somente no grupo HHL a dosagem de SOD apresentou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ), indicando que a intervenção foi capaz de aumentar a expressão da enzima, em comparação aos demais grupos experimentais. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo realizado com humanos, no qual Khan e colaboradores (2015) observaram aumento dos níveis de polifenóis no plasma, capacidade antioxidante total e atividade da SOD em indivíduos que consumiram macarrão contendo farinha de sorgo vermelho. Também em estudo realizado por Yang et al. (2004), e por Martino et al., (2014), o uso de antioxidantes na dieta dos animais aumentou a expressão das enzimas SOD e CAT, o que também contribuiu para redução da placa aterosclerótica.



As enzimas antioxidantes SOD e CAT são os primeiros mecanismos de defesa antioxidante do organismo e têm a função de neutralizar radicais livres como espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas durante o estresse oxidativo (Ribeiro et al., 2005). Assim, pode-se inferir que a administração do hidrolisado proteico de sorgo aumentou a concentração da enzima SOD e, portanto, pode ter afetado positivamente o processo inflamatório, mesmo quando ingerido com alto teor de gordura na dieta. Ainda, com base nos resultados obtidos, observamos valores superiores de CAT para os grupos HHL e FHL, apesar de não terem sido significativas ( $p>0,05$ ) essas diferenças. Mas isso sugere que, talvez em doses maiores ou por tempo maior de intervenção, esses resultados poderiam ser ainda maiores.

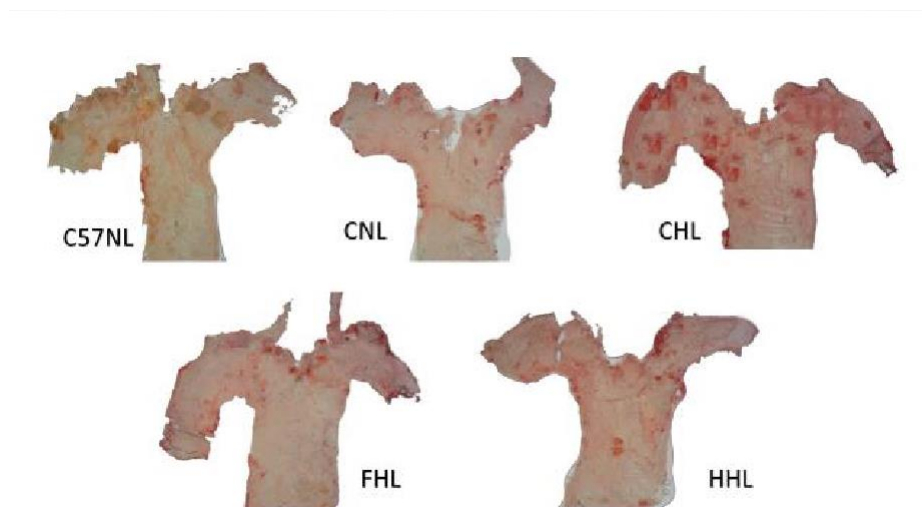
### 6.5.3 Efeito da farinha e do hidrolisado proteico de sorgo sobre a aterosclerose dos animais

Nas Figuras 5 e 6 estão apresentados os dados de área de lesão e análise *en face* das aortas de camundongos controle C57, e *knockout* para o receptor LDL dos grupos controle e tratamentos.



**Figura 5:** Área de lesão (mm<sup>2</sup>) das aortas de animais conforme grupo experimental, sendo C57NL o grupo controle normal, com ração normal; CNL o grupo knockout LDL<sup>-/-</sup> com ração normal; CHL o grupo knockout LDL<sup>-/-</sup> com dieta hiperlipídica; FHL o grupo knockout LDL<sup>-/-</sup> com dieta hiperlipídica e 800 mg de farinha/Kg de PC, e HHL o grupo knockout LDL<sup>-/-</sup> com dieta

hiperlipídica e 800 mg de hidrolisado proteico/Kg de PC. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey



**Figura 6:** Fotografias da análise de deposição lipídica (*en face*) na aorta dos camundongos, conforme grupo experimental, sendo C57NL o grupo controle normal, com ração normal; CNL o grupo knockout LDL<sup>-/-</sup> com ração normal; CHL o grupo knockout LDL<sup>-/-</sup> com dieta hiperlipídica; FHL o grupo knockout LDL<sup>-/-</sup> com dieta hiperlipídica e 800 mg de farinha/Kg de PC, e HHL o grupo knockout LDL<sup>-/-</sup> com dieta hiperlipídica e 800 mg de hidrolisado proteico/Kg de PC.

A área de lesão foi menor nos grupos HHL e FHL quando comparado ao grupo CHL ( $p \leq 0,05$ ), e semelhante aos grupos controle normolipídico (CNL) e C57NL ( $p > 0,05$ ), demonstrando que a intervenção por 60 dias com a farinha e o hidrolisado de sorgo diminuiu a deposição lipídica em aortas de camundongos *knockout* para o receptor LDL alimentados com dieta hiperlipídica, e que esse resultado pode estar relacionado à diminuição do estresse oxidativo e da resposta inflamatória na aorta, e ao controle das taxas de LDL-colesterol nesses animais, sendo compatível com estudos anteriores (Arbex, 2015; Moraes et al., 2012; Ham et al., 2018; Qiu, 2020).

A redução da deposição lipídica nas aortas dos animais alimentados com farinha e hidrolisado proteico de sorgo é consequência da ação de diversas substâncias com atividade biológica encontradas no sorgo, e com maior concentração no hidrolisado, como os peptídeos bioativos e os compostos fenólicos, capazes de reduzir o CT e o LDL-C; reduzir o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica; aumentar a atividade antioxidante no plasma e no fígado, e

umentar a expressão da enzima antioxidante SOD, mesmo na presença de dieta aterogênica hiperlipídica

Não foram encontrados estudos anteriores que avaliassem a deposição lipídica (*en face*) na aorta de animais alimentados com sorgo e/ou derivados, demonstrando que esse é um trabalho pioneiro e, portanto, deve ser mais estudado, considerando o elevado potencial funcional de prevenção e redução de risco de aterosclerose da farinha e do hidrolisado de sorgo.

#### 6.5.4 Avaliação do dano genético pelo teste do micronúcleo

Devido a importância de plantas com potenciais benefícios no cuidado em saúde humana, em especial em países em desenvolvimento com baixo acesso aos medicamentos, o potencial toxicológico e/ou genotóxico desses recursos terapêuticos necessita ser avaliado (Turolla, 2006). O hidrolisado proteico de sorgo surge como um produto novo e com grande potencial funcional; diante disso, no presente estudo, foi avaliado tanto sua capacidade de proteger as células contra o dano induzido pela ciclofosfamida (efeito antimutagênico) quanto de causar dano genético (genotoxicidade), após a administração por 60 dias, por meio do teste do micronúcleo, o qual possui a medula óssea de animais adultos (jovens) como tecido-alvo para o dano genético, uma vez que a detecção ocorre em eritrócitos produzidos nesse tecido (OECD, 2016).

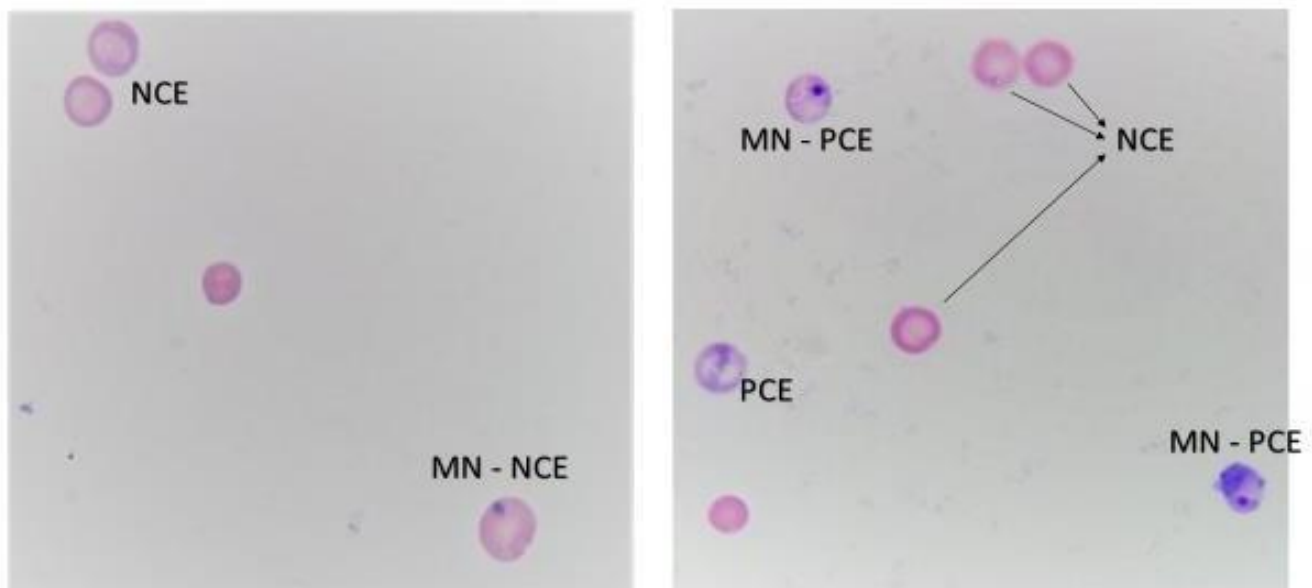
Os dados do bioensaio da medula óssea dos camundongos estão apresentados na Tabela 7 e na Figura 7.

**Tabela 7:** Média e desvio padrão do número de eritrócitos policromáticos (PCE) e normocromáticos (NCE), eritrócitos policromáticos micronucleados (MN-PCE), e a proporção PCE / NCE, em medula óssea de camundongos knockout LDL-/-

Grupo	PCE	NCE	Nº MN - PCE	Razão entre PCE/NCE
HHL-	130,00 ± 2,04	68,00 ± 1,91	2,00 ± 0,42 <sup>c</sup>	2,18 ± 0,18 <sup>a</sup>
HHL+	112,00 ± 1,69	88,00 ± 1,69	3,00 ± 1,00 <sup>b</sup>	1,28 ± 0,19 <sup>b</sup>
CHL+	66,00 ± 1,30	134,00 ± 1,30	7,00 ± 1,60 <sup>a</sup>	0,51 ± 0,15 <sup>c</sup>

Resultados apresentados em média ± desvio padrão Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) pelo Teste Tukey. HHL- LDL-/- com dieta hiperlipídica e 800 mg/kg PC de hidrolisado proteico; HHL+ LDL-/- com dieta hiperlipídica e 800 mg/kg PC de hidrolisado proteico, com aplicação de

Ciclofosfamida 24 h antes da eutanásia; CHL+ LDL-/- com dieta hiperlipídica e aplicação de ciclofosfamida 24 h antes da eutanásia.



**Figura 7:** Registro fotográfico de lâmina com esfregaço de medula óssea de animal do grupo CHL+, sendo NCE = eritrócito normocromático; MN-NCE = eritrócito normocromático micronucleado; PCE = eritrócito policromático, e MN-PCE = eritrócito policromático micronucleado.

O grupo CHL+ que recebeu ciclofosfamida e não recebeu hidrolisado de sorgo, mostrou uma alta frequência de micronúcleos e uma baixa razão entre PCE/NCE. Nos grupos que receberam hidrolisado proteico de sorgo, com ou sem indução de dano pela ciclofosfamida (HHL+ e HHL-, respectivamente), as taxas de MN foram significativamente ( $p \leq 0,05$ ) reduzidas e as razões PCE-para-NCE aumentadas. A contagem de micronúcleos fornece um indicador sensível de dano cromossômico. Os micronúcleos são formados durante a telófase da mitose ou da meiose, quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células-filhas. Originam-se de fragmentos cromossômicos que são resultantes de lesões cromossômicas (efeito clastogênico) ou de cromossomos inteiros (efeito aneugênico), os quais não se ligaram às fibras do fuso e não foram incluídos nos núcleos filhos principais durante a divisão nuclear em razão de lesões nas proteínas envolvidas na segregação cromossômica (FENECH et al., 2011; OECD, 2016). A alta frequência de micronúcleos no grupo CHL+ indica a indução de danos cromossômicos pelo reagente utilizado (KRISHNA & HAYASHI, 2000). A razão entre eritrócitos poli e monocromáticos

avalia a citotoxicidade da substância testada. Uma quantidade menor de eritrócitos monocromáticos indica provável morte celular de eritrócitos policromáticos, que não se diferenciaram. Quanto menor a razão entre PCE/NCE, maior a citotoxicidade (KRISHNA & HAYASHI,2000).

A relação PCE/NCE para o grupo que recebeu hidrolisado proteico de sorgo (HHL-) indicou a ausência de qualquer citotoxicidade sob estas condições experimentais. A fração de MN-PCE não aumentou durante a intervenção, estando dentro do limite aceitável de frequência de MN de até 3 MN/1000 PCEs (SILVA et al., 2003); portanto, não houve evidência de atividade mutagênica pelo hidrolisado. A taxa de MN-PCE e a razão PCE/NCE para o grupo que recebeu hidrolisado e ciclofosfamida (HHL+) indicou que a administração de hidrolisado aos animais, por 60 dias, obteve um efeito antimutagênico e quimioprotetor. O número de micronúcleos reduziu de 7 (CHL+) para 3,0 (HHL+) quando o hidrolisado foi administrado antes da ciclofosfamida.

Um possível mecanismo de proteção de danos ao DNA apresentado pelo hidrolisado proteico de sorgo envolve o controle do ciclo celular por meio da ação antioxidante e anticarcinogênica, já atribuída aos peptídeos de sorgo em estudos anteriores (HIMANI, et al.,2017; XU et al ,2019a e 2019b), uma vez que a presença de micronúcleos indica que as mutações ocorrem durante o ciclo celular (FENECH, 1977). Esses resultados podem justificar o efeito antimutagênico apresentado pelo hidrolisado no presente estudo, uma vez que o mecanismo de ação da ciclofosfamida, utilizado como agente indutor de dano, interfere com a função normal do DNA pela alquilação e ligação cruzada das fitas de DNA, e pela possível modificação das proteínas (ALMEIDA, et al, 2005).

Em estudo realizado por Himani, et al., em 2017, as proteínas do sorgo produziram peptídeos com forte capacidade de eliminação de radicais livres após hidrólise enzimática. Xu et al (2019a) avaliaram o efeito do hidrolisado proteico de kafirina, os quais reduziram efetivamente o crescimento de células de carcinoma hepatocelular por mecanismos não tóxicos, indicando seu potencial anticâncer, e demonstraram efeito antioxidante promissor. Outro estudo realizado por Xu et al. (2019b) forneceu uma abordagem viável para a produção de antioxidantes peptídicos a partir de kafirina de sorgo, uma vez que a fração peptídica de tamanho médio (3 a 10 kDa) revelou um conteúdo fenólico

total relativamente mais alto e atividades antioxidantes mais fortes em relação à eliminação de radicais livres, atividade quelante de íons metálicos, poder redutor e capacidade de absorção de radicais de oxigênio.

Além da ação dos peptídeos bioativos, os compostos fenólicos ajudam a manter a integridade da parede celular e o DNA por reduzir e neutralizar espécies reativas de oxigênio, como hidroxila, superóxido, óxido nítrico e peróxil (SOUSA, 2017). As antocianinas, compostos fenólicos da classe dos flavonoides, além de possuir atividade direta de eliminação de radicais livres por meio da sua capacidade de doação de hidrogênio, também podem atuar indiretamente na melhora das defesas antioxidantes endógenas por restaurar ou aumentar as atividades de enzimas antioxidantes (Superóxido dismutase e Catalase, por exemplo) como também, atuar diretamente sobre os genes de codificação para essas enzimas (SOUSA, 2017).

Esses achados são particularmente importantes pois já existem na literatura alguns dados publicados sobre o efeito antimutagênico e ação quimiopreventiva de espécies vegetais, como o feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.) (AZEVEDO et al., 2003) e mamão (*Carica papaya* L.) (KALIL et al, 2011), no entanto, até o momento, não foi encontrado nenhum estudo anterior que avaliasse atividade antimutagênica da farinha e/ou hidrolisado de sorgo.

## **7. CONCLUSÃO**

Conclui-se que o processo de hidrólise enzimática foi eficaz, alcançando grau de hidrólise de 42,5%, com redução da massa molecular das proteínas e formação de peptídeos com possível atividade biológica. O hidrolisado proteico apresentou elevado valor nutricional e também funcional, com maiores teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante, além de não apresentar toxicidade no modelo animal *C.elegans*, nem genotoxicidade pelo ensaio do micronúcleo, com adicional efeito antimutagênico. Na avaliação *in vivo*, tanto a farinha quanto o hidrolisado reduziram o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica, reduziram as taxas de CT e LDL-c e a deposição lipídica na aorta dos animais com dieta aterogênica, e aumentaram a atividade antioxidante no plasma e no fígado, além do controle do peso e do acúmulo de gordura no fígado dos animais. Diversas

substâncias com atividade biológica encontradas no sorgo, e com alta concentração no hidrolisado, como os peptídeos bioativos, os compostos fenólicos, os fitoesteróis e, no caso da farinha, as fibras, estão envolvidas na obtenção desses resultados.

O sorgo é um cereal de elevado teor nutritivo, apresenta características tecnológicas favoráveis ao desenvolvimento de novos produtos, seu cultivo apresenta vantagens agronômicas em função da alta resistência climática, baixa exigência nutricional e baixo custo de produção. Além do desenvolvimento de produtos com elevado valor nutricional, o sorgo é também uma excelente fonte de compostos bioativos, os quais podem agir na prevenção e no controle de doenças crônicas. Além do incentivo ao consumo do sorgo como alimento funcional e como fonte de proteína vegetal para produtos de uso clínico ou fins especiais, o hidrolisado proteico surge como possível ingrediente de produtos ou mesmo, como um nutracêutico, sendo uma alternativa acessível para prevenção e redução do risco de doenças crônicas como as dislipidemias e aterosclerose. Mais estudos precisam ser realizados para identificação dos peptídeos e os mecanismos de ação envolvidos na obtenção dos resultados apresentados.

## 8 REFERÊNCIAS

AEBI, H. [13] Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, v. 105, n. C, p. 121–126, 1984.

AKAISHI, FERNANDA PERIDES. Determinação da composição de fitosteróis em cremes vegetais, farináceos e cafés comercializados em São Paulo. São Paulo, 2014.

ALTEMIMI, AMMAR; WATSON, DENNIS; CHOUDHARY, RUPLAL; DASARI, MALIKA R.; LIGHTFOOT, DAVID A. Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds From Peaches and Pumpkins. **Plos One**, **PubMed**, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0148758

ALTHWAB, SAMI ABDULLAH. Ability of crude lipid, wax, and oil fractions extracted from red grain sorghum whole kernel to prevent high cholesterol caused

by high-fat diets in a hamster model. The University of Nebraska - Lincoln, **ProQuest Dissertations Publishing**, 2016. 10247082.

ALVES, N. E. G., MEJÍA, E. G., VASCONCELOS, C. M., BASSINELLO, P. Z., & MARTINO, H. S. D. (2016). Postharvest storage of carioca bean (*Phaseolus vulgaris* L.) did not impair inhibition of inflammation in lipopolysaccharide-induced human THP-1 macrophagelike cells. **Journal of Functional Foods**, 23, 154–166. 2016.

ALVES, N. E. G., VASCONCELOS, C. M., BASSINELLO, P. Z., MEJÍA, E. G., & MARTINO, H. S. D. (2016). Digested protein isolate from fresh and stored carioca beans reduced markers of atherosclerosis in oxidized LDL-induced THP-1 macrophages. **Journal of Functional Foods**, 24, 97–111.

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS). 1997. Official Methods of Analysis. Método de Kjeldahl (2.062). 16ª edição. Washington DC, EUA.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 16th ed. Washington (DC): AOAC, 2002

ARBEX, PRISCILA MARQUES. Potencial da farinha extrusada de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) para modular a adiposidade, o estresse oxidativo e a inflamação em ratos obesos alimentados com dieta hiperlipídica. [dissertação] Viçosa, MG, 2015.

AUGUSTI, P.R.; BRASIL, A.V.S.; SOUTO, C.; GÖETHEL, G.; DE OLIVEIRA RIOS, A.; EMANUELLI, T., et al. Microcystin-LR exposure induces oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*: Protective effect of lutein extracted from marigold flowers. **Food Chem Toxicol** 2017; 109:60–7. doi:10.1016/j.fct.2017.08.045.



AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W.; WANISKA, R. D. Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 90, p. 293–301, 2003.

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

AZEVEDO L, GOMES JC, et al. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. **Food Chem Toxicol**. 2003; 41(12):1671-6.

BAMDAD, F.; SUN, X.; GUAN, L. L.; CHEN, L. Preparation and characterization of antimicrobial cationized peptides from barley (*Hordeum vulgare* L.) proteins. **Food Science and Technology**, v. 63, p. 29-36, 2015.

BENÍTEZ R, IBARZ A, PAGAN J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquím Clin Latinoam* 2008; 42(2):227-36.

BERG A, et al. Preventive effect of hydrolyzed infant formulas persists until age 6 years: long-term results from the German Infant Nutritional Intervention Study(GINI). **J Allergy Clin Immunol** 2008; 121(6): 1442-47.

BRADFORD, M. M.; *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, v. 77, n. 1, p. 71- 94, 1974.

BURDETTE, A. et al. Anti-Inflammatory Activity of Select Sorghum (*Sorghum bicolor*) Brans. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 4, p. 879-887, 2010.

CABRA, V., ARREGUIN, R., VAZQUEZ-DUHALT, R., & FARRÉS, A. Effect of alkaline deamidation on the structure, surface hydrophobicity, and emulsifying

properties of the z19  $\alpha$ -zein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 439–445, 2007.

CARDOSO, L. D. M. et al. Effects of processing with dry heat and wet heat on the antioxidant profile of sorghum. **Food chemistry**, v. 152, p. 210–217, 2013.

CARDOSO, L. M.; et al. Phenolic compounds profile in sorghum processed by extrusion cooking and dry heat in a conventional oven. **Journal of Cereal Science**, v. 65, p. 220-226, 2015a.

CARDOSO, L. M.; et al. Sorghum (sorghum bicolor L.): Nutrients, Bioactive Compounds, and Potential Impact on Human Health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 2, p. 372-390, 2015b.

CHARÃO, M.F.; SOUTO, C.; BRUCKER, N.; BARTH, A.; JORNADA, D. S.; FAGUNDEZ, D., et al. Caenorhabditis elegans as an alternative in vivo model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage. *Int J Nanomedicine* 2015; 10:5093–106. doi:10.2147/IJN.S84909.

CHAUHAN, VIVEK; KANWAR, SHAMSHER SINGH. Chapter 4 - Bioactive peptides: Synthesis, functions and biotechnological applications. **Biotechnological Production of Bioactive Compounds. Elsevier**. 2020, Pages 107-137. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64323-0.00004-7>

CHUNG, I.M.; YEO, M.A.; KIM, S.J.; KIM, M.J.; PARK, D.S.; MOON, H.I. Antilipidemic activity of organic solvent extract from Sorghum bicolor on rats with diet-induced obesity. **Human & Experimental Toxicology**, v. 3, p.1865-1868, 2011.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends Food Science and Technology**, v.11, n.7, p. 254-262, 2000.

CORSI, A. K., WIGHTMAN, B., CHALFIE, M. A Transparent Window into Biology: A Primer on Caenorhabditis elegans. *Genetics*, v.200, n.2, p. 387–407, 2015.

CRUZ, A. B.; et al. Assessment of bioactive metabolites and hypolipidemic effect of polyphenolic-rich red cabbage extract. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p.3033-3039, 2016.

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

EARP, C.F & McDonough, Cecily & JM, Awika & Rooney, L.W. (2004). Testa development in the caryopsis of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Journal of Cereal Science**. 39. 303-311. 2004.b.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. 2020. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em 22/11/2020

FARIAS, TICIANE CARVALHO. Obtenção enzimática de hidrolisado proteico de soja com atividade antioxidante para uso em alimentos. [dissertação]. Rio de Janeiro, 2017.

FARVIN KH, BARON CP, NIELSEN SN, OTTE J, JACOBSEN C. Antioxidant activity of yoghurt peptides: part 2-characterisation of peptide fractions. **Food Chem** 2010; 123(4): 1090-7.

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

FRUTON, J. S. (2002). A history of pepsin and related enzymes. *The Quarterly Review of Biology*, 77(2), 127–147. <https://doi.org/10.1086/340729>

GOMES MJC, LIMA SLS, ALVES NEG, et al., Common bean protein hydrolysate modulates lipid metabolism and prevents endothelial dysfunction in BALB/c mice fed an atherogenic diet, **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, 2019 <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2019.07.020>

GOMES, BIANCO, A.C. Perfil proteômico, composição centesimal e compostos bioativos do grão e farinha de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) submetidos a tratamentos térmicos.. [dissertação] / Vila Velha, ES, 2020.

GRANCIERI, M.; MARTINO, H.S.D.; MEJIA, E.G. Digested total protein and protein fractions from chia seed (*Salvia hispanica* L.) had high scavenging capacity and inhibited 5-LOX, COX-1-2, and iNOS enzymes. *Food Chemistry* 289 (2019) 204–214. doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.036

GUADIX A, GUADIX EM, PÁEZ-DUEÑAS MP, GONZÁLEZ-TELLO P, CAMACHO F. Procesos tecnológicos y métodos de control em la hidrólisis de proteínas. **Ars Pharmac** 2000; 41(1): 79-89.

GUADIX A, CAMACHO F, GUADIX EM. Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor. **J Food Eng** 2006; 72(4): 398-405.

HAM, Y.M., SONG, H.S., KWON, J.E. et al. Effects of fermented *Sorghum bicolor* L. Moench extract on inflammation and thickness in a vascular cell and atherosclerotic mice model. **J Nat Med** 73, 34–46 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11418-018-1231-9>

HAMID, A.; ILYAS, M. AND KALSOOM, S. Effect of Wheat and Corn Bran and Barley and Sorghum  $\beta$ -Glucan Extracts on the Plasma Cholesterol Level of Dietary-Induced Hypercholesterolemic Rats. **Pakistan Journal of Zoology**, 2017.

HIMANI A., ROBIN J., MAHESH G. Isolation and characterisation of enzymatic hydrolysed peptides with antioxidant activities from green tender sorghum. **LWT - Food Science and Technology**. Volume 84, outubro de 2017, páginas 608-616.

HIMANI, P., TOKAS, J., MALIK, A. et al. Characterization of phenolic compounds and antioxidant activity in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] grains. **CEREAL RESEARCH COMMUNICATIONS** (2021). <https://doi.org/10.1007/s42976-020-00118-w>

IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa\\_201901\\_5.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa_201901_5.shtm)>. Acesso em: 23/11/2020.

JIA, JUN-QIANG, et al. Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Sweet Sorghum Grain Protein: Optimisation of Hydrolysis Conditions and Hydrolysate Characterization. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, vol. 41, no. 1, 2019, p. 175.

KATAN, MB; GRUNDY, SM; JONES, P; et al. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. **Mayo Clin Proct.** 2003, 78 (8), 965-78.

KALIL, I.C.; et al. Antimutagenic activity of *Carica papaya* L. assayed in vivo by micronucleus test. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, 2011;32(3):419-423.

KANEKANIAN A, GALLAGHER J, EVANS EP. Casein hydrolysis and peptide mapping. **Int J Dairy Technol** 2000; 53(1): 1-5.

KHAN I; YOUSIF AM; JOHNSON SK; GAMLATH S. Acute effect of sorghum flour-containing pasta on plasma total polyphenols, antioxidant capacity and oxidative stress markers in healthy subjects: A randomised controlled trial. 2015.

KIM Y, JE Y. Dietary fibre intake and mortality from cardiovascular disease and all cancers: a meta-analysis of prospective cohort studies. **Arch Cardiovasc Dis.** 2016;109(1):39-54.

KOOPMAN R, et al. Ingestion of a protein hydrolysates is accompanied by an accelerated in vivo digestion and absorption rate when compared with its intact protein. **Am J Clin Nutr** 2009; 90(1):106-15.

KREPSKY, P. B., ISIDÓRIO, R. G., DE SOUZA FILHO, J. D., CÔRTEZ, S. F., & BRAGA, F. C. (2012). Chemical composition and vasodilatation induced by *Cuphea carthagenensis* preparations. **Phytomedicine**, 19(11), 953–957.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, **Elsevier**. Volume 455, Issues 1–2, 2000, Pages 155-166. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00117-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00117-2)

LEE, D.-E. et al. Getting the message across: mechanisms of physiological cross talk by adipose tissue. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 296, n. 6, p. E1210-E1229, June 2009.

LEIVA, E. et al. Role of Oxidized LDL in Atherosclerosis. In: Intech. 1. ed. Talca: Intech, 2016. p. 13.

LIU, HAIYING; LU, HUANG; XINLI, PEI. Effects of sorghum rice and black rice on genes associated with cholesterol metabolism in hypercholesterolemic mice liver and intestine. **Food Science & Nutrition**, 2021. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1986>

LOPEZ, N. J. S.; et al. 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.

LUO, ARONG; LING, CHENG; SIMON Y.W., AND CHAODONG ZHU. Comparison of Methods for Molecular Species Delimitation across a Range of Speciation Scenarios. **Systematic Biology** 67(5), 2018. DOI: 10.1093/sysbio/syy011.

MADAMANCHI, N. R.; VENDROV, A.; RUNGE, M. S. Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 25, n. 1, p. 29–38, 2005.

MARANGONI, F., POLI, A. Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacol Res.* 2010, 61 (3), 193-96.

MARTIN, R.J., ROBERTSON, A.P., BUXTON, S.K., BEECH, R.N.; CHARVET, C.L & NEVEU, C. Levamisole receptors: a second Awakening. **Trends in Parasitology** 28: 289-296, 2012.

MARTINO, H. S. D.; CARDOSO, L. de M.; MORAES, E. A.; SANT'ANA, H. M. P.; QUEIROZ, V. A. V. Por que utilizar o sorgo na alimentação humana? In: KARAN, D.; MAGALHÃES, P. C. Sete Lagoas: **Associação Brasileira de Milho e Sorgo**, 2014. Cap. 11, p. 95-114.

MARTINS, V. G; COSTA, J. A. V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado proteico de pescado obtido por via química e enzimática a partir de corvina. **Química Nova**, Brasília, v.32, n. 1, p. 61-66, 2009.

MEGIAS C, YUST MDM, PEDROCHE J, LQUARI H, GIRÓN-CALLE J, ALAIZ M, et al Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. **J Agr Food Chem** 2004; 52: 1928-1932.

MENEELY, P. M., DAHLBERG, C. L., & ROSE, J. K. (2019). Working with worms: *Caenorhabditis elegans* as a model organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 19, e35. doi: 10.1002/cpet.35.

MINATTI, JAQUELINE. O chá verde no processo aterosclerótico em camundongos knockout para receptor de lipoproteína de baixa densidade [dissertação] / Florianópolis, SC, 2010.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of

epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 247, n. 10, p. 3170–3175, 1972.

MORAES, ERIKA AGUIAR. Atividade antioxidante, qualidade proteica e potencial funcional de genótipos de sorgo disponíveis à alimentação humana. Viçosa, MG, 2011.

MOTLHAODI, T., T. BRYNGELSSON, S. CHITE, M. FATIH, R. ORTIZ, AND M. GELETA. 2018. Nutritional variation in sorghum [*Sorghum Bicolor* (L.) Moench] accessions from Southern Africa revealed by protein and mineral composition. *Journal of Cereal Science* 83:123–9. doi: 10.1016/j.jcs.2018.08.010.

MUSA-VELOSO, K; POON, TH; ELLIOT, JA; CHUNG, C. A comparison of the LDL-cholesterol lowering efficacy of plant stanols and plant sterols over a continuous dose range: results of a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2011, 85 (1), 9-28.

NEUHOFF, V. ET AL. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255–262 (1988).

NEVES RAM, MIRA NVM, MARQUEZ UML. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de pescado. **Cienc Tecnol Aliment** 2004; 24(1): 101-8.

NIELSEN, P. M., PETERSEN, D., & DAMBMANN, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. **Journal of Food Science**, 66(5), 642–646.

NILSANG, S.; LERTSIRI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; ASSAVANIG, A. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Fish Soluble Concentrate by Commercial Proteases. **Journal of Food Engineering**, Bangkok, v. 70, n. 4, p. 571-578, 2005.



OECD, 2016. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. <https://doi.org/10.1787/9789264264762-en>

OLIVEIRA OTTO MC, AFSHIN A, MICHA R, KHATIBZADEH S, FAHIMI S, SINGH G, ET AL; Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases (**NutriCoDE**). The impact of dietary and metabolic risk factors on cardiovascular diseases and type 2 diabetes mortality in Brazil. *PLoS One*. 2016;11(3):e 0151503.

OLIVEIRA LB, CARVALHO IB, ESCÓRCIO-DOURADOCSM, DOURADO JCL, NASCIMENTO MO. Prevalência de dislipidemias e fatores de risco associados. **J Health Biol Sci**. 2017 Out-Dez; 5(4): 320-325.

PACHECO, M. T. B. et al. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. 2005, vol.25, n.2. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000200026>.

PAIGEN, B. et al. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in renal arteries. *Atherosclerosis*, v. 68, n. 1, p. 231–240, 1987.

PARK, J. H.; et al. Sorghum extract exerts an anti-diabetic effect by improving insulin sensitivity via PPAR- $\gamma$  in mice fed a high-fat diet. **Nutrition Research and Practice**, v. 6, p. 322-327, 2012.

PATOCKOVÁ, J.; MARHOL, P.; TŮMOVÁ, E.; KRSIAK, M; ROKYTA, R.; STÍPEK, S.; CRKOVSKÁ, J.; ANDEL, M. Oxidative Stress in the Brain Tissue of Laboratory Mice With Acute Post Insulin Hypoglycemia. **Physiol Res., PubMed**. 2003;52(1):131-5.

PEDERSEN, B. Removing bitterness from protein hydrolysates. **Food Technology**, v.48, p 96-99, 1994.

PEREIRA, J.L., et al. Ganho de peso e alterações metabólicas em camundongos

submetidos à dieta hiperlipídica. **Ciência & Saúde**, ISSN: 1983-652X, 2018;11(1):51-57 <http://dx.doi.org/10.15448/1983-652X.2018.1.00000>

POLEDNE R, JURČÍKOVÁ-NOVOTNÁ L. Experimental models of hyperlipoproteinemia and atherosclerosis. **Physiol Res**. 2017 Apr 5;66 (Suppl 1):S69-S75. doi: 10.33549/physiolres.933585.

POWER, O.; JAKEMAN, P.; FITZGERALD, R. J. Antioxidant peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidante activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids*, v. 44, p. 797-820, 2013.

PRADO, DANIELLE MARIA FERNANDES. Hidrólise enzimática de proteínas isoladas de grãos para produção de peptídeos bioativos in vitro. [dissertação]. Rio Verde,GO. 2016.

PRZYBYLSKA-BALCEREK, ANNA; FRANKOWSKI, JAKUB; STUPER-SZABLEWSKA, KINGA. The influence of weather conditions on bioactive compound content in sorghum grain. **European Food Research and Technology** (2020) 246:13–22. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03391-0>

QIU, HAOWEN. Effect of Red Grain Sorghum Whole Kernel Surface Lipid, Wax, and Oil Fractions on Saturated Fat Diet Induced Changes on Hepatic Metabolic and Energy Homeostasis in Hamsters. Diss. The University of Nebraska-Lincoln, 2020.

QUEIROZ, V.A.V.; MORAES, E.A.; MARTINO, H.S.D.; PAIVA, C.L.; MENEZES, C.B. de. Potencial do sorgo para uso na alimentação humana. **Informe Agropecuário**, v.35, p.7-12, 2014.

QUEIROZ, V.A.V; MORAES, E.A.; SCHAFFERT, R.E.; MOREIRA, A.V.; RIBEIRO, S.M.R. e MARTINO, H.S.D. Potencial funcional e tecnologia de processamento do sorgo para alimentação humana. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.10, n.3, p. 180-195, 2011.

RUTHERFURD SM. Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: a review. *Food Comp Additives* 2010; 93(5): 1515-22.

RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F., MARQUES, E. K. Mutagênese Ambiental. Ed Ulbra. Canoas – RS, 356pp, 2003.

SALAZAR-LÓPEZ, et al. Sorghum bran supplementation ameliorates dyslipidemia, glucose dysregulation, inflammation and stress oxidative induced by a high-fat diet in rats. **CyTA - Journal of Food**. 18:1, 20-30, DOI:10.1080/19476337.2019.1702105.

SARMADI BH, ISMAIL A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides* 2010; 31(10):1949-56.

SCHÄGGER, Hermann; VON JAGOW, Gebhard. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 166, n. 2, p. 368–379, 1987. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90587-2.

SELA, PETER H.; et al. Composição e caracterização da kafirina, a fração proteica dominante no sorgo de grãos. **Animal Production Science**. 60 (9) 1163-1172, 2020. <https://doi.org/10.1071/AN19393>

SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G. Cereal seed storage proteins : structures , properties and role in grain utilization. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 947–958, 2002.

SHIMIZU, M.; SAWASHITA, N.; MORIMATSU, F.; ICHIKAWA, J.; TAGUCHI, Y.; IJIRI, Y.; Antithrombotic papain-hydrolyzed peptides isolated from pork meat. **Thrombosis Research**, v. 123, p. 753–757, 2008

SILVA, M.O.; PALLONE, J.; FERREIRA, D.S. Determinação do teor de fibras totais no sorgo granífero para alimentação humana. In: **Anais do Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos**, 2013.

SILVA, NATACHA. Quantificação de amido e proteínas totais em grãos de sorgo [Sorghum bicolor (L.) Moench - Família: Poaceae] visando à alimentação humana. Brasília, 2015.

SILVA, J. C. da, SILVA, S. da C.. Avaliação do possível efeito genotóxico do Gergelim (Sesamum indicum L.) através do Teste de Micronúcleos, em medula óssea de ratos (Rattus norvegicus, linhagem Wistar). Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande (PB): 2003.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry, [S. l.], v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.

SOARES, R.R.A.; VASCONCELOS, C.M.; OLIVEIRA, M.V. de; MINIM, V.P.R.; QUEIROZ, V.A.V.; BARROS, F. Starch digestibility and sensory acceptance of gluten-free foods prepared with tannin sorghum flour. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.54, e01205, 2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, Arquivos Brasileiros de Cardiologia, ISSN-0066-782X, Volume 109, Nº 2, Supl. 1, Agosto 2017.

SOUSA, ANDRESSA RODRIGUES DE, et al. Efeito da farinha de sorgo (Sorghum bicolor L.) extrusado na esteatose hepática, na microbiota intestinal, na inflamação e no estresse oxidativo em ratos obesos. Viçosa, MG, 2017. **Journal of Functional Foods , Elsevier**, Volume 58, July 2019, Pages 282-291.

SOUZA, C. C. D.; DANTAS, J. P.; SILVA, S. D. M.; SOUZA, V. C. D.; ALMEIDA, F. A. D.; SILVA, L. E. D. Produtividade do sorgo granífero cv. Sacarino e qualidade de produtos formulados isoladamente ou combinados ao caldo de cana-de-açúcar. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 25, p. 512-517, 2005.

SOUZA, CAROLINA PAULA GOUVÊA DE. Fermentação espontânea de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): caracterização nutricional, bioativa, físico-química, microbiológica e avaliação toxicológica *in vivo*. Dissertação de mestrado, Universidade Vila Velha, 2020.

SOUZA, NATÁLIA APARECIDA DE et al. Dislipidemia familiar e fatores associados a alterações no perfil lipídico em crianças. *Ciência & Saúde Coletiva* [online]. 2019, v. 24, n. 1.

SPELLMAN, D. e cols. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: methods for quantification of degree of hydrolysis. **International Dairy Journal**. Barking, v. 13, n.6, p. 447-453, 2003.

STADTMAN, E. R. Protein oxidation and aging. **Free Radicals Research**, v. 40, p. 1250-1258, 2006.

STEFOSKA-NEEDHAM, ANITA; TAPSELL, LINDA. Considerations for progressing a mainstream position for sorghum, a potentially sustainable cereal crop, for food product innovation pipelines. **Trends in Food Science & Technology, Elsevier**. Volume 97, March 2020, Pages 249-253.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.012>.

TONG, L.; FUJIMOTO, Y.; SHIMIZY, N.; TSUKINO, M.; AKSAKA, T.; KATO, Y. Rice  $\alpha$ -globulin decreases sérum cholesterol concentrations in rats fed a hypercholesterolemic diet ameliorates atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. **Food Chemistry**, v. 132, p. 194-200, 2012

TUROLLA, MONICA SILVA DOS REIS, & NASCIMENTO, ELIZABETH DE SOUZA. (2006). Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42(2), 289-306.  
<https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000200015>

VIEGAS, E.M.M. Elaboração e caracterização de hidrolisados protéicos de peixe e sua utilização na nutrição de organismos Aquáticos. Jaboticabal: Unesp, 2000.

WANG, Q.; WANG, P.; XIAO, Z. Resistant starch prevents tumorigenesis of dimethylhydrazine-induced colon tumors via regulation of an ER stress-mediated mitochondrial apoptosis pathway. **International Journal of Molecular Medicine**, v.41, p.1887-1898, 2018.

WANG, J. C.; BENNETT, M. Aging and atherosclerosis: Mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circulation Research*, v. 111, n. 2, p. 245–259, 2012.

WANISKA, R. D.; ROONEY, L. W. Chapter 4.1 Structure and chemistry of the sorghum caryopsis. *Sorghum: Origin, History, Technology, and Production*, p.649–688, 2000.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000–2016*. **Geneva: World Health Organization**; 2018.

WU, QIONG-YING; DU, JIN-JUAN; JIA, JUN-QIANG; KUANG, CONG. Production of ACE inhibitory peptides from sweet sorghum grain protein using alcalase: Hydrolysis kinetic, purification and molecular docking study. **Food Chemistry**. 2016.

WU, Y., YUAN, L., GUO, X. et al. Mutation in the seed storage protein kafirin creates a high-value food trait in sorghum. **Nat Commun** **4**, 2217 (2013).

XU, SHIWEI; SHEN, YANTING; LI, YONGHUI. Antioxidant Characteristics and Identification of Peptides from Sorghum Kafirin Hydrolysates. **Journal of Food Science**. 2019-a.

XU, SHIWEI; SHEN, YANTING; LI, YONGHUI. Antioxidant Activities of Sorghum Kafirin Alcalase Hydrolysates and Membrane/Gel Filtrated Fractions. *Antioxidants*, **8**, 131. 2019-b.

YANG, H. et al. Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. **Circulation Research**, v. 95, n. 11, p. 1075–1081, 2004.

ZAIA, DIMAS A. M., ZAIA, CÁSSIA THAÏS B. V., & LICHTIG, JAIM. (1998). Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, 21(6), 787-793. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000600020>

ZAVAREZE, E. R.; SILVA, C. M.; SALAS-MELLADO, M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Funcionalidade de Hidrolisados Proteicos de Cabrinha (*Prionotus punctatus*) obtidos a partir de diferentes proteases microbianas. **Química Nova**, Rio Grande do Sul, v. 32, n.7, p.1739-1743, 2009.