

PAULA CRISTINA SILVA SANTOS

**EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE FENÓLICOS DO SORGO:
OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO E EFEITO NA ESTABILIDADE DAS
3-DESOXIANTOCIANINAS**

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

Orientador: Frederico Augusto Ribeiro de Barros

Coorientadores: Paulo César Stringheta

Márcia Cristina T. Ribeiro Vidigal

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S2372e
2022 Santos, Paula Cristina Silva, 1995-
Extração assistida por ultrassom de fenólicos do sorgo:
otimização do processo e efeito na estabilidade das
3-desoxiantocianinas / Paula Cristina Silva Santos. – Viçosa,
MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (72 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Frederico Augusto Ribeiro de Barros.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Tecnologia de Alimentos, 2022.

Referências bibliográficas: f. 64-72.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.391>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Sorgo - Processamento. 2. Antocianinas. 3. Ultrassom.
4. Extração (Química). I. Barros, Frederico Augusto Ribeiro de,
1983-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

CDD 22. ed. 664.22

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

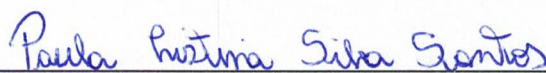
PAULA CRISTINA SILVA SANTOS

**EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE FENÓLICOS DO SORGO:
OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO E EFEITO NA ESTABILIDADE DAS
3-DESOXIANTOCIANINAS**

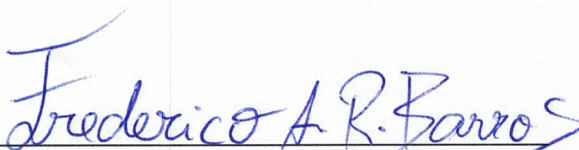
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 2 de maio de 2022.

Assentimento:



Paula Cristina Silva Santos
Autora



Frederico Augusto Ribeiro de Barros
Orientador

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por sempre estar ao meu lado me dando forças para continuar e enfrentar qualquer desafio, por me guiar com sabedoria, determinação e confiança em todas as realizações dos meus sonhos.

Agradeço a minha mãe, Eva e ao meu pai, Cláudio, por sempre me acompanhar em minhas jornadas e me apoiar em tudo que preciso. Agradeço ao meu namorado, Sérgio, pela paciência e pelo apoio em nunca me deixar desistir de algo que me desanime no caminho. Agradeço a minha amiga e professora de vida, Solvane, que sempre acreditou e confiou no meu potencial de me tornar uma ótima profissional na área de alimentos. Agradeço aos meus avós Nair, Alcerino e Maria das Graças que me amam incondicionalmente e são a base da minha vida.

Agradeço ao meu orientador Dr. Frederico Barros, por toda orientação, motivação e paciência, por compartilhar todo seu conhecimento, ser um grande amigo e inspiração para todos.

Agradeço a minha coorientadora professora Dra. Márcia Vidigal, por toda paciência em me auxiliar em toda a parte estatística do meu trabalho. Obrigado pelo seu carinho imenso que tem por mim.

Agradeço ao meu coorientador professor Dr. Paulo Stringheta, por acreditar no meu trabalho e por me disponibilizar a trabalhar em seu laboratório de compostos bioativos com toda sua equipe.

Agradeço a Bárbara Avancini do laboratório LacBio, por ter me ajudado, disponibilizando o seu tempo para me acompanhar nas análises realizadas no método assistido pelo ultrassom e por me ajudar a analisar os meus dados obtidos.

Agradeço a Mariana Sampaio do laboratório LacBio, por me auxiliar nas análises da segunda etapa do meu projeto, ser minha companhia no laboratório e me escutar sempre.

Agradeço a Dra. Valéria Aparecida Vieira Queiroz, pela oportunidade de trabalhar juntamente com a Embrapa Milho e Sorgo, por me receber na Embrapa de braços abertos e acreditar no meu trabalho.

Agradeço ao Rafael, químico e técnico do laboratório da Embrapa, que se disponibilizou a ajudar na realização das análises em HPLC da etapa do meu projeto.

Agradeço aos meus amigos do grupo BIOCARB (coordenado pelo professor Dr. Frederico Barros), que se tornaram a minha família durante todo o mestrado. Em especial à Fátima, Cíntia e Leonara pelo apoio fundamental ao longo do mestrado.

Agradeço a Embrapa Milho e Sorgo por disponibilizar o genótipo de sorgo utilizado nos estudos.

Agradeço as minhas amigas de pedais Vanda, Letícia e Eva (minha mãe) pelas conversas de apoio e todo aprendizado juntas em cada pedal de nossa vida.

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos e Tecnologia pela qualidade de ensino, formação acadêmica e profissional e pela oportunidade de me possibilitar estar concluindo o mestrado.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram direta e indiretamente para a minha formação no mestrado e peço desculpas se esqueci de alguém, pois não seria nada disso sem o apoio de vocês. Termino os meus agradecimentos com a frase de Dalai Lama que levo sempre comigo “Desenvolver força, coragem e paz interior, demora algum tempo. Não espere resultados rápidos ou imediatos, só porque decidiu mudar. Cada ação que você executa permite que essa decisão se torne efetiva dentro do seu coração.”

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 pela concessão da bolsa.

RESUMO

SANTOS, Paula Cristina Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2022. **Extração assistida por ultrassom de fenólicos do sorgo: otimização do processo e efeito na estabilidade das 3-desoxiantocianinas.** Orientador: Frederico Augusto Ribeiro de Barros. Coorientadores: Paulo César Stringheta e Márcia Cristina Teixeira Ribeiro Vidigal.

O sorgo é um cereal que possui atributos relevantes para o seu uso na alimentação humana. Com isso, países como Estados Unidos e Brasil têm aumentado o número de pesquisas na área de alimentos, devido principalmente à sua fonte de compostos fenólicos, como as antocianinas. As principais antocianinas presentes no sorgo são as 3-desoxiantocianinas, que apresentam maior estabilidade quando comparadas com outras antocianinas encontradas em frutas e hortaliças. Porém, a eficiência na extração destes compostos fenólicos em cereais, utilizando métodos convencionais, é baixa, pois a maioria deles estão ligados à parede celular. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi otimizar a extração de antocianinas e compostos fenólicos totais do extrato fenólico do sorgo, assistida por ultrassom (EAU), compará-lo com o método convencional e avaliar a estabilidade das 3-desoxiantocianinas (3-DXA's) nos extratos obtidos, com o tempo de armazenamento de 45 dias. O sorgo SC 84, fornecido pela Embrapa Milho e Sorgo, foi utilizado. Na primeira parte do trabalho, duas frequências (25 e 45 kHz) foram aplicadas em um delineamento Composto Central Rotacional para investigar o efeito de duas variáveis, sendo elas, tempo (5 a 75 minutos) e temperatura (30 a 65°C) utilizando a EAU, com amplitude do poder ultrassônico fixado em 50%. No método convencional, o extrato fenólico foi obtido pelo período de 2 horas sob agitação em temperatura ambiente. O solvente 70% v/v etanol em água foi utilizado para ambos métodos testados. Os teores de antocianinas totais, fenólicos totais e capacidade antioxidante foram determinados. Na segunda parte do trabalho, os extratos foram avaliados pelo processo de degradação das antocianinas durante a extração e armazenamento, por 45 dias, em temperatura ambiente (25°C). As concentrações das antocianinas totais, luteolinidina, apigeninidina, 5-metoxi-luteolinidina e 7-metoxi-apigeninidina foram determinadas nos tempos 0 (tempo inicial), 15, 30 e 45 dias. A constante de degradação (k) e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) foram determinados. As duas frequências tiveram um efeito positivo nos rendimentos de extração de antocianinas totais e compostos fenólicos da farinha de sorgo em relação ao método convencional. Observou-se a eficiência da extração assistida por ultrassom, que aumentou do rendimento de antocianinas totais de >30% e >27% e de compostos fenólicos totais de >10%, respectivamente nas frequências de 25 kHz

e 45 kHz, quando comparado com o convencional. A capacidade antioxidante dos extratos a EUA pelos métodos ABTS e DPPH também foi aumentada em >30% e >35% e >28% e >25%, respectivamente nas frequências de 25 kHz e 45 kHz para o rendimento ótimo de antocianinas totais e um aumento de >15%, >8% para o rendimento ótimo de fenólicos totais comparados com o método convencional. Os extratos submetidos aos tratamentos com ultrassom apresentaram menor estabilidade cinética para a luteolinidina, apigeninidina, 5-metoxi luteolinidina e 7-metoxi apigeninidina ($p < 0,05$) comparados com o método convencional ao final do período de 45 dias. A luteolinidina apresentou-se mais estável que a apigeninidina. Dessa forma, o ultrassom é um método eficiente para a obtenção de extratos com maiores rendimentos de antocianinas e fenólicos totais, porém, pode afetar a estabilidade das 3-dexociantocianinas.

Palavras-chave: Antocianinas. Ultrassom. Sorgo.

ABSTRACT

SANTOS, Paula Cristina Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2022. **Ultrasound-assisted extraction of phenolics from sorghum: optimization of the process and effect on the stability of 3-deoxyanthocyanins.** Advisor: Frederico Augusto Ribeiro de Barros. Co-advisors: Paulo César Stringheta and Márcia Cristina Teixeira Ribeiro Vidigal.

Sorghum is a cereal that has relevant attributes for its use in human food. As a result, countries such as the United States and Brazil have increased its use in food research, mainly due to its valuable source of phenolic compounds, such as anthocyanins. The main anthocyanins present in sorghum are 3-deoxyanthocyanidins, which have greater stability when compared to other anthocyanins found in fruits and vegetables. However, the efficiency in extracting these phenolic compounds from cereals, using conventional methods, is low, since most of them are bound to the cell wall. Thus, the aim of this study was to optimize the ultrasound-assisted extraction (UAE) of anthocyanins and total phenolic compounds from sorghum phenolic extract, compare it with the conventional method and evaluate the stability of 3-deoxyanthocyanins (3-DXA's) in extracts obtained, with a storage time of 45 days. Sorghum SC 84, supplied by EMBRAPA, was used. In the first part of the work, two frequencies (25 and 45 kHz) were applied in a Central Composite Rotational design to investigate the effect of two variables, namely, time (5 to 75 minutes) and temperature (30 to 65°C) using the UAE, with the ultrasonic power amplitude set at 50%. In the conventional method, the phenolic extract was obtained for a period of 2 hours under stirring at room temperature. Solvent 70% v/v ethanol in water was used for both methods tested. The levels of total anthocyanins, total phenolics and antioxidant capacity were determined. In the second part of the work, the extracts were evaluated by the degradation process of anthocyanins during extraction and storage, for 45 days, at room temperature (25°C). The concentrations of total anthocyanins, luteolinidin, apigeninidin, 5-methoxy-luteolinidine and 7-methoxy-apigeninidine were determined at times 0 (initial time), 15, 30 and 45 days. The degradation constant (k) and the half-life time (t_{1/2}) were determined. The two frequencies had a positive effect on the extraction yields of total anthocyanins and phenolic compounds from sorghum flour. The efficiency of ultrasound-assisted extraction was observed, increasing the yield of total anthocyanins by >30%, >27%, respectively, at frequencies of 25 kHz and 45 kHz, when compared to the conventional one. And an increase in the yield of total phenolics of >10%, >5% in the extract obtained in the frequency. The antioxidant capacity of the extracts by the EUA was also increased by the ABTS

and DPPH method by >30% and >35%, >28% and >25%, respectively at frequencies of 25 kHz and 45 kHz for optimal yield of total anthocyanins and a >15%, >8% increase by ABTS and DPPH methods for total phenolic yield compared to conventional method. During the stability study, the extracts submitted to ultrasound treatments showed significantly lower stability for luteolinidine, apigeninidine, 5-methoxy luteolinidine and 7-methoxy apigeninidine ($p < 0.05$) compared to the conventional method during the period of 45 days. Luteolinidine was more stable than apigeninidine. Finally, the application of the ultrasound method is an alternative for obtaining extracts with higher yields of phenolic compounds, therefore, it may affect the stability of 3-dexocyanthocyanins.

Keywords: Anthocyanins. Ultrasound. Sorghum.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. <i>A IMPORTÂNCIA DAS CORES NOS ALIMENTOS.....</i>	<i>12</i>
2.2. <i>CORANTES NATURAIS</i>	<i>14</i>
2.3. <i>ANTOCIANINAS</i>	<i>16</i>
2.4. <i>ESTABILIDADE DAS ANTOCIANINAS</i>	<i>19</i>
2.5. <i>O SORGO.....</i>	<i>20</i>
2.5.1. <i>O SORGO NO BRASIL</i>	<i>21</i>
2.5.2. <i>COMPOSTOS BIOATIVOS DO SORGO</i>	<i>23</i>
2.6. <i>MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DAS ANTOCIANINAS</i>	<i>26</i>
2.7. <i>TÉCNICA ASSISTIDA PELO ULTRASSOM</i>	<i>28</i>
2.8. <i>INFLUÊNCIA DO ULTRASSOM NA ESTABILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....</i>	<i>32</i>
2.9. <i>METODOLOGIA ESTATÍSTICA</i>	<i>33</i>
3.OBJETIVOS	34
3.1. <i>OBJETIVO GERAL.....</i>	<i>34</i>
3.2. <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	<i>34</i>
4.MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. <i>MATÉRIA-PRIMA.....</i>	<i>35</i>
4.2. <i>OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM.....</i>	<i>36</i>
4.2.1. <i>PREPARO DA AMOSTRA.....</i>	<i>36</i>
4.2.2. <i>OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM</i>	<i>36</i>
4.2.3. <i>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</i>	<i>37</i>
4.3. <i>AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....</i>	<i>39</i>
4.3.1. <i>EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM OTIMIZADA</i>	<i>39</i>
4.3.2. <i>EXTRAÇÃO PELO MÉTODO CONVENCIONAL.....</i>	<i>39</i>
4.4. <i>CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS FENÓLICOS.....</i>	<i>39</i>
4.5. <i>AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ULTRASSOM NA ESTABILIDADE DAS ANTOCIANINAS DO SORGO</i>	<i>40</i>
4.5.1. <i>CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO</i>	<i>42</i>
4.6. <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	<i>42</i>
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
5.1. <i>OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM.....</i>	<i>43</i>

5.2. ESTUDO COMPARATIVO DOS MÉTODOS APLICADOS.....	52
5.3.AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO E DA ESTABILIDADE CINÉTICA DAS ANTOCIANINAS NOS EXTRATOS DE SORGO.....	57
6. CONCLUSÃO.....	63
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Há um crescente interesse pela utilização de corantes naturais em alimentos, principalmente devido a estudos que demonstram seus benefícios à saúde e aos problemas relacionados com o consumo de corantes artificiais. Estes benefícios, juntamente com a preocupação do consumidor e a segurança alimentar, levaram a esforços na substituição dos corantes sintéticos pelos naturais (Rodriguez-Amaya, 2016). Neste contexto, as antocianinas ganharam destaque nos últimos anos, pelo seu potencial como corante natural e suas propriedades bioativas, tais como atividade antioxidante e propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladores, anticâncer, antidiabético, neuroprotetor e antiobesidade (Li et al., 2017; Hong et al., 2020).

Um grão que possui antocianinas e vem sendo bastante estudado e explorado é o sorgo. Apesar do sorgo ser pouco utilizado na alimentação humana, estudos revelam os benefícios associados ao consumo desse cereal, em razão da presença de compostos bioativos, como as antocianinas, os quais apresentam elevado potencial antioxidante (Girard & Awika, 2018; Queiroz et al., 2014). As antocianinas do sorgo (3-desoxiantocianidinas) possuem um diferencial quando comparadas com outras antocianinas encontradas em frutas e hortaliças. Elas não apresentam o grupo hidroxila na posição C-3 e por isto possuem uma melhor estabilidade ao calor e a variações de pH (Awika, Rooney, & Waniska, 2004; Yang, Dykes, & Awika, 2014).

Apesar da melhor estabilidade das antocianinas do sorgo, a eficiência na extração de compostos fenólicos de cereais, utilizando métodos convencionais, é baixa, pois a maioria desses compostos estão ligados a parede celular (Adom & Liu, 2002). Entretanto, nos últimos anos, métodos para extração de compostos fenólicos vêm sendo aperfeiçoados, como a extração acelerada por solvente, fluidos pressurizados, extração assistida por micro-ondas e por ultrassom, devido a necessidade de uma alternativa eficaz para otimizar a extração desses compostos. Estes métodos alternativos são mais eficientes, além de serem considerados uma tecnologia limpa, devido as preocupações ambientais e de segurança com os resíduos tóxicos gerados na extração (Herrman et al., 2020; Duval et al., 2016; Barba et al., 2016).

Considerada uma tecnologia potencial emergente, a extração assistida por ultrassom é um método considerado limpo e eficaz na extração de constituintes de interesse nas matrizes vegetais, otimizando a extração de compostos de interesse, mesmo em temperatura ambiente, comparado com processos convencionais de extração (Chemat, Zill-E-Huma, & Khan, 2011; Dong et al., 2010, Rojas et al., 2021). Chen et al. (2007) e He et al. (2016) utilizaram o ultrassom

para extração de antocianinas de framboesa vermelha e do bagaço de mirtilo e demonstraram uma significativa redução no tempo de extração e aumento na concentração de antocianinas, comparado com o método convencional. Entretanto, o ultrassom também pode influenciar a estabilidade dos compostos fenólicos, devido a sua irradiação ultrassônica que pode causar algumas reações químicas tais como oxidação, degradação e copigmentação, devido aos radicais livres que são induzidos pelo ultrassom (Ma et al., 2009; Munekata et al., 2020; Zhang & Wang, 2017).

Não foram encontrados estudos na literatura sobre o uso do método assistido pelo ultrassom na otimização da extração de antocianinas e fenólicos totais do sorgo, bem como a influência deste método na estabilidade das 3-desoxiantocianinas. Portanto, este trabalho tem como objetivo otimizar a extração de fenólicos do sorgo pelo método do ultrassom, bem como avaliar o efeito do ultrassom na estabilidade das 3-desoxiantocianinas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A IMPORTÂNCIA DAS CORES NOS ALIMENTOS

A cor é diretamente relacionada à preferência e à aceitação do consumidor na escolha de um produto alimentício, pois geralmente o seu primeiro contato é com a apresentação visual, onde se destaca a aparência. Os corantes são adicionados ao alimento principalmente para restituir sua aparência original (que pode ter sido afetada durante alguma etapa de processamento na indústria de alimentos), torná-lo visualmente mais atraente, reforçar ou conferir cor aos alimentos desprovidos de cor, ajudando a relacionar o aroma normalmente associado à determinados produtos. Por isto, são de grande importância na indústria de alimentos para atender a satisfação dos consumidores que à associam ao sabor, tato e qualidade do produto (Constant, Stringheta & Sandi, 2002).

Sabendo que os métodos disponíveis para a medida da cor vão de uma simples comparação visual através de um padrão a sofisticados instrumentos (colorímetros e espectrofotômetros). A colorimetria é uma metodologia de análise rápida e simples, baseada na utilização de colorímetros, aparelhos que determinam os parâmetros de cor das amostras (L, a, b, por exemplo). A Comissão Internacional de L' Eclairage (CIE) desenvolveu um sistema específico para sinais de cor, onde os três atributos da cor (matiz, luminosidade e grau de saturação) poderiam ser expressos com uma esfera tridimensional. Este sistema conhecido atualmente como CIE XYZ, baseia-se na transformação de funções das cores originárias das

cores primárias conhecidas como X (vermelho), Y (verde) e Z (Azul), como mostrado na figura 1.

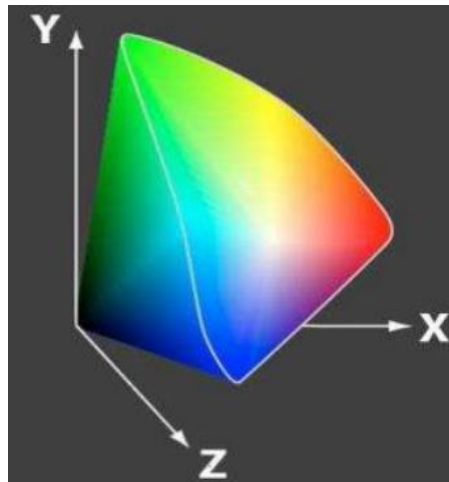


Figura 1: Sistema CIE XYZ.

Fonte: Oliveira, 2011.

O CIELAB é um dos modelos mais atuais (Figura 2), que possui como objetivo aumentar a uniformidade das cores percebidas pelo sistema visual humano. Ele determina um espaço de cor tridimensional onde o eixo a^* até o eixo b^* formam um plano ortogonal ao eixo L^* , representando o estilo da cor como um sinal acromático (L^*) e dois canais cromáticos representando do amarelo ao azul (b^*) e do vermelho ao verde (a^*). Este sistema CIELAB também pode ser descrito como um sistema para aparência da cor do espaço, pois é capaz de representar os estímulos de cor pelas dimensões de croma (grau de saturação) e matiz (coloração do objeto) (Kuehni, 2012).

A coordenada L^* representa o quanto a amostra pode ser mais clara ou escura, com valores variando de 0 (tonalidade preta) a 100 (tonalidade branca). A coordenada a^* pode assumir valores de -80 (verde) a $+100$ (vermelho) e a coordenada b^* pode assumir valores variáveis de -50 (azul) a $+70$ (amarelo) (Kuehni, 2012). Além destes sistemas, existe o sistema CIE LCH, que utiliza coordenadas cilíndricas, onde L^* indica a luminosidade exatamente como no modelo CIELAB, o valor C^* indica o croma e h^* o ângulo de tonalidade, se diferem apenas na alta precisão das análises (Oliveira, 2011).

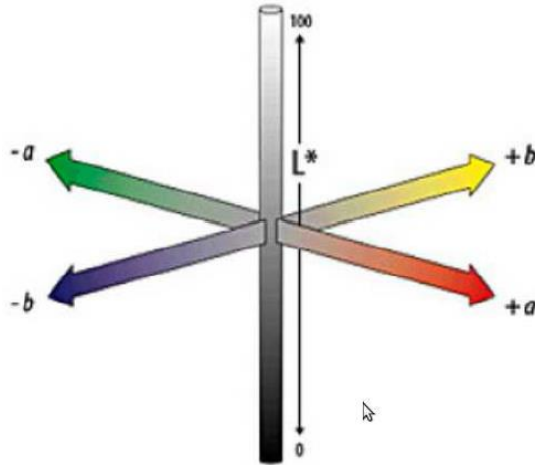


Figura 2: Sistema CIELAB.

Fonte: Kuehni, 2012.

Um outro método diferencial baseado em ondas magnéticas, que consegue detectar pequenas diferenças de cor que não são captadas pelo olho humano, é o espectrofotômetro, capaz de quantificar pigmentos extraídos. Seu princípio é válido quando se tem um comprimento de onda (luz visível) para identificar a intensidade da cor de uma determinada amostra. Quando lançamos uma luz em uma amostra, (radiação incidente) parte desta radiação é absorvida pela amostra, já a outra parte da mesma radiação não é absorvida (radiação transmitida). A radiação incidente sempre será maior que a transmitida (Rocha & Teixeira, 2004).

Uma maneira de se expressar os resultados da determinação do pigmento estudado é em termos da quantidade absoluta total de pigmentos presentes num extrato particular, estimando, dessa maneira, o teor de pigmento expresso usualmente em mg de pigmento/100 gramas de amostra (Teixeira & Stringheta, 2008). As antocianinas são capazes de absorver fortemente luz na região do visível, compreendida entre 496 e 550 nm, diferentemente da grande parte dos flavonoides, que absorvem luz na região entre 350 e 380 nm (Brouillard, 1982). Essa característica particular permite a quantificação das antocianinas por métodos espectrofotométricos em medições simples de absorvância em comprimentos de onda adequados (Teixeira & Stringheta, 2008).

2.2. CORANTES NATURAIS

Corantes são aditivos alimentares definidos como toda substância que confere, intensifica ou restaura a cor de um alimento (Constant, Stringheta e Sandi, 2002). Entre as

classes, temos os corantes sintéticos ou naturais que correspondem a um grande grupo de aditivos (Damodaran & Srinivasan, 2019).

As principais fontes para obtenção de corantes naturais estão entre as plantas (folhas, flores e frutos), animais (insetos) e micro-organismos (fungos e bactérias). O conhecimento da estrutura e das propriedades dos pigmentos naturais são essenciais para o dimensionamento adequado de um processo, preservando a cor natural do pigmento quando aplicados como corantes naturais em alimentos, evitando mudanças indesejáveis (Damodaran & Srinivasan, 2019).

Os três principais grupos de corantes naturais existentes na natureza são: os compostos heterocíclicos com estrutura tetra-pirrólica, representados pelas as clorofilas presentes em vegetais; o heme e as asbilinas encontradas em animais; os compostos de estrutura isoprenóide, compreendidos pelos carotenoides, encontrados em animais e vegetais; e os compostos heterocíclicos contendo oxigênio, representados pelos flavonoides, que são encontrados exclusivamente em vegetais. No mais, há também outros dois grupos de corantes presentes em vegetais: as betalaínas que são compostos nitrogenados e os taninos, que agrupam diversos compostos de estruturas altamente variáveis (Bobbio e Bobbio, 1992).

De acordo com a ANVISA, Resolução nº 04 de 24 de novembro de 1988, os corantes naturais mais importantes, permitidos e utilizados são: os extratos de urucum, carmim de cochonilha, curcumina, betalaínas, antocianinas e carotenoides. Suas aplicações em alimentos são diversas. Por exemplo: o corante natural de urucum, um carotenoide, exibe uma coloração amarela à laranja, é amplamente utilizado em bolos, biscoitos, arroz, laticínios, farinhas, refrigerantes, petiscos e produtos à base de carne; As antocianinas responsáveis pelos pigmentos da natureza, como vermelho, roxo, violeta e azul, que podem ser aplicados em alimentos, são utilizadas em refrigerantes e preparados para confeitarias; O corante de curcumina, um pigmento purificado de açafrão que confere a cor laranja aos alimentos, é muito utilizado em mostarda, iogurte, assados, laticínios, sorvetes e molhos para salada (Carocho, Morales, & Ferreira, 2015).

Além de atribuir cor natural aos alimentos, alguns corantes naturais, tais como antocianinas, carotenoides e betalaínas, possuem propriedades bioativas (Volp, Renhe, & Stringheta, 2009; Damodaran & Srinivasan, 2019). As antocianinas, por exemplo, possuem propriedade anti-inflamatória, e previnem certos tipos de câncer e doenças cardíacas (de Pascual-Teresa, Moreno, & García-Viguera, 2010).

A grande dificuldade de substituição dos corantes sintéticos pelos naturais está em sua menor estabilidade à luz, calor, etc, e seu maior custo em comparação com os sintéticos (Amchova, Kotolova, & Ruda-Kucerova, 2015; Rodriguez-Amaya, 2016). Porém, muitos estudos têm demonstrado efeitos negativos das misturas dos corantes sintéticos sob o comportamento de crianças, principalmente devido a toxicidade quando se é ingerido em grande quantidade e/ou consumido em excesso ao longo da vida. Entretanto, os valores estabelecidos de ingestão, pelas autoridades reguladoras, obviamente não podem eliminar completamente o risco de possíveis reações adversas (não deve haver ameaça de vida) a uma substância específica, especialmente no que diz respeito às populações vulneráveis ou indivíduos hipersensíveis (Amchova, Kotolova, & Ruda-Kucerova, 2015; Feng, Cerniglia, & Chen, 2012).

Recentemente, foi avaliado o risco associado ao alto consumo de Tartrazina e verificou-se que este corante é capaz de atuar como ativador dos receptores de estrogênio (xenoestrogênio), e pode desencadear carcinogênese em doses muito altas ou exposição cumulativa. Além disso, surgiram novas preocupações de toxicidade em vários corantes devido à sua capacidade de se ligar a albumina sérica humana, responsável por manter constante o nível de líquido nos vasos sanguíneos, principalmente em crianças, cuja ingestão de corantes sintéticos é maior (Amchova, Kotolova, & Ruda-Kucerova, 2015).

Devido à esta grande preocupação com a toxicidade de corantes sintéticos, métodos alternativos e mais eficientes para obtenção de corantes naturais vêm sendo estudados, visando, principalmente, aumentar sua estabilidade, a fim de substituir ou limitar o uso de corantes e/ou aditivos sintéticos, especialmente em alimentos destinados ao público infantil.

2.3. ANTOCIANINAS

As antocianinas são classificadas como compostos fenólicos pertencentes à classe dos flavonoides. São responsáveis por diversas cores nas plantas, como azul, roxo, violeta, magenta, laranja e vermelho. A palavra antocianina é derivada de duas palavras gregas, *anthos*: flor, e *kyanos*: azul (Damodaran; Srinivasan, 2019). Como importantes fontes de antocianinas na dieta podem ser citadas as frutas como o açaí, ameixa, amora, cereja, figo, framboesa, uva, maçã, morango e acerola e outros vegetais como, repolho roxo, batata roxa e berinjela (Cardoso, Leite, & Peluzio, 2011).

Segundo Lopes et al. (2007), as funções desempenhadas pelas antocianinas nas plantas são variadas: antioxidantes, proteção à ação da luz, mecanismo de defesa e função biológica. Suas cores vivas e intensas produzem um papel importante em vários mecanismos reprodutivos

das plantas, tais como a polinização e a dispersão de sementes. Todas as antocianinas apresentam a estrutura básica de 15 carbonos, C₆-C₃-C₆, são pigmentos solúveis em água e derivadas da estrutura básica do cátion flavilium deficiente em elétrons sendo, portanto, muito reativo (Brouillard, 1992). Quimicamente pode-se definir antocianinas como glicosídeos de antocianidinas e sua cor depende da presença e do número de substituintes ligados (Constant, Stringheta, & Sandi, 2002; Damodaran & Srinivasan, 2019).

A molécula de antocianina é constituída por duas ou três porções: uma aglicona (antocianidina), um grupo de açúcares e, frequentemente, um grupo de ácidos orgânicos. Diferentes antocianidinas ocorrem na natureza, mas a diversidade dos padrões de glicosilação demonstram que existem quantidades inumeráveis de antocianinas (Figura 3). Uma simples espécie vegetal pode conter um considerável número de diferentes antocianinas (Coultate, 2004). Suas diferenças estruturais estão, essencialmente, relacionadas ao número e à posição dos grupos hidroxila e metoxila, com a natureza, o número e a posição dos açúcares ligados à estrutura básica da antocianidina e, ainda, com a extensão da acilação desses açúcares e a natureza dos agentes acilantes (Kong et al., 2008).

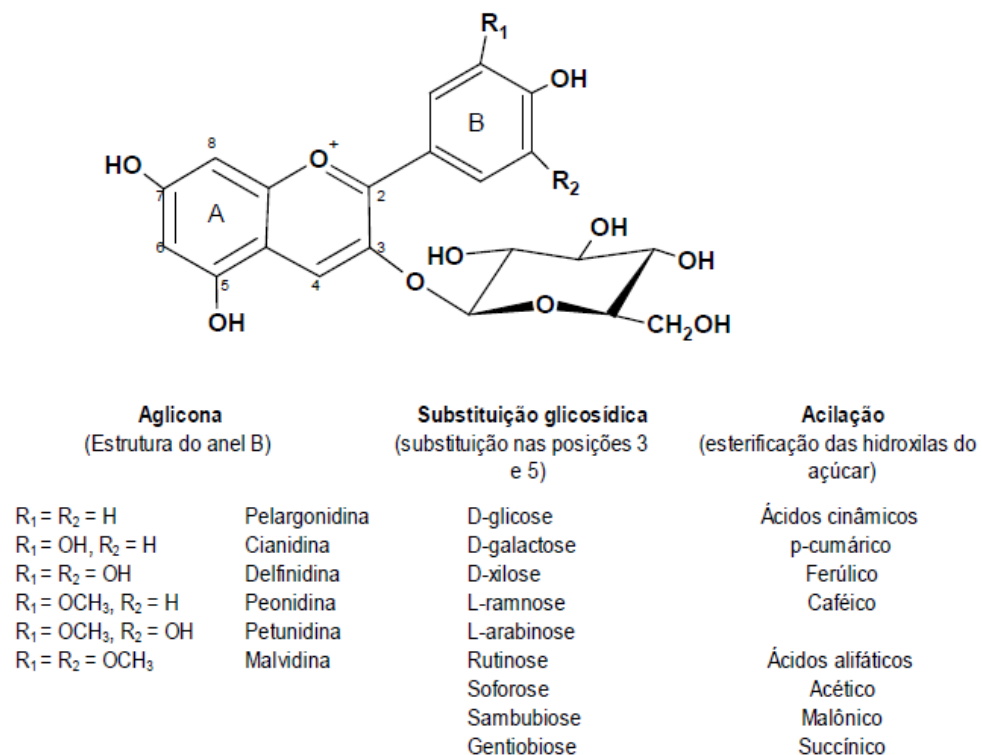


Figura 3: Estrutura química das antocianinas.

Fonte: Francis (1989) Adaptado de Malacrida & da Motta (2006).

As antocianinas apresentam-se frequentemente associadas a açúcares, ligados aos grupos hidroxila OH-. A glicosilação pode ocorrer em várias posições, sendo observada com maior frequência na posição do carbono 3. Geralmente, os açúcares ligados a antocianidina são a glicose, a arabinose, a galactose e a ramnose (Kong et al., 2008). A solubilidade e a estabilidade ao pigmento também são conferidas pela glicosilação em C-3 e quando possui um segundo açúcar presente, normalmente encontra-se ligado a C-5. Isto faz com que elas sejam mais estáveis e solúveis em água do que as antocianidinas (Constant, 2003).

A coloração fornecida pelas antocianinas é diretamente influenciada quando há a substituição dos grupos hidroxila e metoxila em sua molécula. Quando se perde um hidrogênio ácido do cátion flavilium, um grupamento hidroxila se torna livre, o que é essencial para a formação da estrutura quinoidal responsável pela pigmentação de flores e frutas (Lopes et al., 2007).

As antocianinas são consideradas compostos bioativos com um duplo interesse, uma tecnológica, devido a seu impacto sobre as características sensoriais dos alimentos; e o outro por suas propriedades relacionadas com a saúde através de diferentes atividades biológicas (de Pascual-Teresa, Moreno, & García-Viguera., 2010). Estes benefícios incluem a capacidade antioxidante, redução do colesterol, propriedades potencialmente anticancerígenas, atividade anti-inflamatória, entre outros (Cavalcanti, Santos, & Meireles, 2011). Vários estudos mostram que elas ainda evitam a peroxidação de lipídeos e a agregação de plaquetas, reduzem os teores elevados de colesterol e triglicerídeos, prevenindo a ocorrência de doenças cardiovasculares, evitam doenças degenerativas e a ocorrência de cataratas no globo ocular de indivíduos diabéticos e possuem um grande potencial em reduzir o risco de desenvolvimento da aterosclerose (Cardoso, Leite & Peluzio, 2011; de Pascual-Teresa, Moreno, & García-Viguera, 2010; Li et al., 2017). No entanto, para que os benefícios dos alimentos antociânicos sejam alcançados de maneira eficaz, é preciso que o seu consumo seja de forma regular (Vidal et al., 2012).

Entretanto, na sua utilização como corante, as antocianinas possuem desvantagens relacionadas à degradação sofrida durante a extração do vegetal, processamento e armazenamento de alimentos. A estabilidade das antocianinas é maior sob condições ácidas, mas pode ocorrer degradação por vários mecanismos, inicialmente pelo surgimento de coloração amarelada, seguida pela perda da cor e formação de produtos insolúveis (Lopes et al., 2007).

2.4. ESTABILIDADE DAS ANTOCIANINAS

A estabilidade das cores das soluções de antocianinas depende de vários fatores como pH, luz, concentração, tipo de solvente, temperatura, estrutura do pigmento, presença de substâncias capazes de reagir reversível ou irreversivelmente com a antocianina, entre outras presentes nas plantas (Lopes et al., 2007).

Quanto ao pH, as antocianinas possuem uma grande variedade de cores, porém são mais estáveis em meio ácido. Devido à natureza iônica das antocianinas, elas também sofrem modificação em sua estrutura dependente do pH do meio. Em meio bastante ácido ($\text{pH} < 2$), o cátion flavílico (AH^+) vermelho é a única espécie predominante em equilíbrio. Com aumento do pH, há diminuição da intensidade da cor e da concentração do cátion flavílico, devido à hidratação pelo ataque nucleofílico da água, formando o carbinol, incolor, levando a formação da forma quinoidal, coloração azulada (Schiozer & Barata, 2007). Quando ocorre o aumento ainda maior do pH, ocorre a abertura do anel heterocíclico da forma carbinólica, formando a chalcona incolor.

O calor afeta diretamente a estabilidade das antocianinas e sua taxa de degradação está relacionada com o processamento e armazenamento conforme o aumento de temperatura. Elevadas temperaturas podem ocasionar a hidrólise da molécula de açúcar levando a degradação e perda de cor das antocianinas (Schiozer & Barata, 2007). Kirca, Özkan, & Cemeroglu (2007) observaram que a taxa de degradação das antocianinas de cenoura preta aumentou à medida que a temperatura (70 a 90°C) e o teor de sólidos também aumentaram, sendo que uma degradação muito rápida ocorreu em todos os sucos e néctares coloridos durante o armazenamento.

Com relação a copigmentação, a cor das antocianinas pode ser realçada através deste processo, por meio de várias interações, cujos mecanismos mais importantes incluem o intermolecular, nas quais as antocianinas interagem via interações de van der Waals (π - π vertical empilhamento) entre os núcleos polarizáveis planares da antocianina com copigmentos (por exemplo, fenólicos) e o intramolecular que é baseado no empilhamento da fração acil hidrofóbica covalentemente ligado ao açúcar e ao núcleo flavílico. A copigmentação produz um deslocamento máximo de absorção, tornando um comprimento de onda mais longo, observado como um deslocamento batocrômico, no espectro visível, também chamado de efeito azulado já que a cor muda de vermelho para azul, ou como um efeito hiperacrômico, quando a intensidade da cor é elevada pela copigmentação, ou seja, produz um aumento na absorbância. Assim, estes complexos antocianina-copigmentos adotam um empilhamento tipo sanduíche que

estabiliza o cromóforo do cátion flavilium e parcialmente o protege do ataque nucleofílico da água, evitando assim a perda de cor (Awika, 2008; Rodriguez-Amaya, 2016).

Algumas antocianinas encontradas na natureza possuem maior estabilidade em relação as outras, devido à sua estrutura. Por exemplo, há vários estudos demonstrando que as 3-desoxiantocianinas possuem maior estabilidade comparadas com as antocianinas de frutas e hortaliças, devido à falta de um oxigênio no carbono 3 de sua estrutura (Awika., et al 1014). Um cereal que é fonte das 3-desoxiantocianinas é o sorgo.

2.5. O SORGO

O sorgo (*Sorghum bicolor* L.) é um cereal gramineáceo, pertencente à família *Poaceae* e originário da África. Quanto à produção, é o quinto cereal mais importante do mundo, de enorme utilidade em regiões muito quentes e muito secas, onde o homem não consegue boas produtividades de outros tipos de grãos ou de forragem (Ribas, 2003). O sorgo granífero (Figura 4), possui um porte de planta baixo, podendo chegar até 170 cm, desenvolvendo uma película de grãos na parte superior (Pioneer & Unidos, 2020).



Figura 4: Plantação de sorgo.

Fonte: Viana, 2018.

Variedades de sorgo são utilizadas amplamente no mundo como alimento. Por exemplo, variedades de sorgo com taninos são utilizados, na África Austral e Oriental, para alimentos básicos como: mingaus, cuscuz, produtos de panificação farinhas pré-cozidas e na produção de bebidas alcoólicas. Outros sorgos pigmentados são preferidos pela sua coloração característica e que produzem certos tipos de alimentos, que por tradição, são benéficos à saúde dos bebês, na terapia contra doenças do sistema digestivo (Awika et al., 2005; Queiroz et al., 2014).

O sorgo enfrenta vários desafios como ingrediente competitivo no processamento de alimentos. A funcionalidade do endosperma do sorgo é julgada em relação às alternativas abundantes, especialmente arroz, milho e trigo. As tecnologias de moagem industrial que são desenvolvidas especialmente para milho e arroz, não são ideais para o sorgo, devido ao grão sem de estrutura mais resistente e geralmente não há sistemas modernos de moagem desenvolvidos exclusivamente para o sorgo. Além disto, faltam tecnologias para otimizar o processamento do sorgo em suas várias aplicações. Entretanto, a combinação do interesse do consumidor por uma alimentação saudável favorece esta utilização do sorgo como ingrediente principal de muitos alimentos (Girard & Awika, 2018).

Cada vez mais, as vantagens nutricionais e agrônômicas do sorgo, combinadas com um movimento crescente de consumo dedicado à "vida saudável", despertam interesses comerciais e econômicos no desenvolvimento de produtos alimentares à base de sorgo, em que sejam mais acessíveis aos consumidores. O seu valor nutricional é semelhante ao dos grãos de milho e varia de acordo com o genótipo. Vários estudos têm demonstrado os potenciais benefícios do sorgo para a saúde, como na redução percentual de gordura corporal, modulação do tecido adiposo, anti-inflamatório, redução do risco metabólico de esteatose hepática e melhoramento da microbiota intestinal (Anunciação et al., 2019; Arbex et al., 2018; de Sousa et al., 2019, 2018), entretanto, mais pesquisas ainda são necessárias para comprovação. Diversos benefícios do consumo do sorgo na prevenção de doenças crônicas estão relacionados à digestibilidade lenta do amido, à presença de compostos bioativos e de fibra alimentar (Dykes & Rooney, 2006). Outro fato importante é que o sorgo não contém glúten e é seguro para pessoas com doença celíaca e outros tipos de sensibilidade ao glúten, não celíacas (Stefoska-Needham et al., 2015).

2.5.1. O SORGO NO BRASIL

No Brasil, o sorgo chegou através dos escravos africanos, na mesma época que chegou à América do Norte e Central. O “milho d’ Angola” ou “Milho da Guiné” até hoje é encontrado na literatura como vocabulário nordestino do sertão, indicando que as primeiras sementes de sorgo trazidas ao Brasil foram no Nordeste (Ribas, 2003).

Foi divulgado em uma pesquisa feita pela CONAB em abril de 2022, uma estimativa de produção da safra de 21/22 de sorgo no Brasil em 3065,8 mil toneladas. Um aumento de 47,1% de sua produção em relação à safra de 20/21. O maior aumento de produção, em termos de volume, foi informado por Goiás, maior produtor do cereal produzido no Brasil na safra de 20/21, com um crescimento de 44,7% em relação à safra de 20/21. Por se tratar de uma cultura

resistente à seca e adaptável a regiões com altas temperaturas, o sorgo em Goiás é cultivado no mês de março, ou seja, na segunda safra. Além disto, a cultura do sorgo apresenta menor custo de produção em relação a cultura do milho (Conab, 2022).

A cultura do sorgo vem crescendo no Brasil, principalmente, no período da Safrinha (segunda safra). O seu interesse para uso na alimentação humana vem sendo despertado, principalmente, por não possuir glúten, sendo totalmente seguro para o desenvolvimento de produtos para celíacos, ou seja, indivíduos portadores de doença celíaca; apresenta valor nutricional semelhante ao milho, porém seu sabor é mais neutro, o que se torna uma grande vantagem para a indústria de alimentos; apresenta melhor adaptação e menor custo de produção, vislumbrando a possibilidade de redução de custos na indústria alimentícia e apresenta uma variedade de compostos bioativos, com elevada capacidade antioxidante, com potencial para a utilização em produtos que agregam valores nutricionais benéficos para a saúde humana (Queiroz et al., 2011).

Existem diversos trabalhos relacionados a aplicação de produtos à base de sorgo. Por exemplo, a utilização da farinha de sorgo tem um grande potencial para ser usada como substituta da farinha de trigo, especialmente, na preparação de produtos alimentícios destinados à indivíduos celíacos. As farinhas produzidas a partir de cultivares de sorgo branco são de cor clara e têm sabor neutro agradável e, por isso, não causam impacto negativo na cor e no sabor das preparações (Ciacci et al., 2007).

Pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo desenvolveram o produto “Barra de Cereais com Pipoca de Sorgo”, que obteve boa aceitação, com médias de 7,68; 7,92; 7,75 e 7,38, que se situam entre os termos hedônicos “gostei moderadamente” e “gostei muito”, para os atributos aparência geral, sabor, textura e cor, respectivamente. (Queiroz et al., 2009). Outros produtos à base de sorgo desenvolvidos recentemente foram: massas secas sem glúten, em que os avaliadores celíacos gostaram mais do macarrão de sorgo, em comparação com os julgadores não celíacos, em relação à qualidade global e aos atributos de cor, sabor e textura do produto, cujo as médias dos termos hedônicos (nota mínima de 0: desgostei extremamente, e nota máxima de 10: gostei extremamente) foram de $\pm 7,0$; $\pm 6,9$ e $\pm 6,6$ respectivamente; os cereais matinais que foram avaliados através da escala de classificação de Ação Alimentar (FACT), sendo atribuída nota 9 a “Eu comeria sempre que eu tiver chance ”e nota 1 para “Apenas comeria isso se eu for forçado”, obtiveram resultados superiores de 70% no índice de aceitação; e misturas em pó para bebidas com baixa caloria que obtiveram uma aceitabilidade geral de 85% em termos hedônicos entre “gostei moderadamente” e “gostei muito” para todos os

atributos de cor, aroma, textura, sabor e aparência global (Paiva et al. 2019; Anunciação et al., 2017; Queiroz et al., 2018). Todos os produtos apresentaram alta aceitabilidade e ofereceram alternativas de consumo para pessoas intolerantes ao glúten. Isto mostra que os consumidores possuem uma grande aceitabilidade de produtos à base de sorgo, podendo ser utilizado na maioria de preparações usualmente feitas com trigo como bolos, biscoitos, cereais matinais e massas alimentícias.

2.5.2. COMPOSTOS BIOATIVOS DO SORGO

A maioria dos compostos bioativos dos grãos são produzidos como moléculas de defesa ou sinalização ou como moléculas estruturais; são metabólitos secundários e a grande maioria desses compostos é estruturalmente categorizada como polifenóis ou lipídeos. No sorgo, como outros grãos de cereais, os compostos bioativos estão localizados principalmente no pericarpo (fração de farelo). O sorgo possui uma maior variedade e/ou maior concentração de compostos bioativos do que a maioria dos outros grãos de cereais (Awika, 2014; Awika et al., 2005; Girard & Awika, 2018). A diversidade de compostos fenólicos é responsável por uma ampla variação de cores do pericarpo do sorgo, variando de branco creme a vermelho, amarelo limão e preto. Esta característica de variações de cores pode fornecer um meio natural para diversificar o apelo sensorial dos alimentos (Girard & Awika, 2018).

Todo sorgo possui ácidos fenólicos e a maioria contém flavonoides (Awika et al., 2005). Isto faz com que o sorgo se destaque no meio científico, devido ao fato de que o seu potencial funcional está ligado a presença destes compostos fenólicos, que têm sido amplamente investigados por seus benefícios à saúde relacionados à sua capacidade de eliminar radicais livres e modular várias vias de sinalização relevantes para a prevenção de doenças (Awika, 2014; Girard & Awika, 2018).

Os tipos e quantidades de compostos fenólicos presentes no grão são controlados geneticamente (Dykes & Rooney, 2006). Os principais ácidos fenólicos encontrados normalmente são os derivados do ácido hidrobenzóico e o ácido hidrocínâmico (Awika et al., 2005). Os ácidos fenólicos formam os principais componentes da estrutura da parede celular dos cereais. No sorgo, 70-95% estão covalentemente ligados a polissacarídeos da parede celular, comumente chamados de “ligados” (Awika et al., 2005).

Outro grupo de fenólicos encontrado no sorgo são os flavonoides, em que incluem flavonas e flavononas (compartilham a estrutura 4-quinona) e as 3-desoxiantocianinas (antocianinas), associadas a fortes propriedades bioativas relacionadas a função anti-

inflamatória e quimioprotetora (Awika; Rooney & Waniska, 2004; Girard & Awika, 2018; Yang; Dykes & Awika, 2014). Por último, temos as proantocianidinas, ou taninos condensados, que estão presentes apenas em uma pequena variedade de sorgo (Awika et al., 2005; Girard & Awika, 2018). Na figura 5 são demonstradas as estruturas dos principais ácidos fenólicos, flavonoides e proantocianidinas do sorgo.

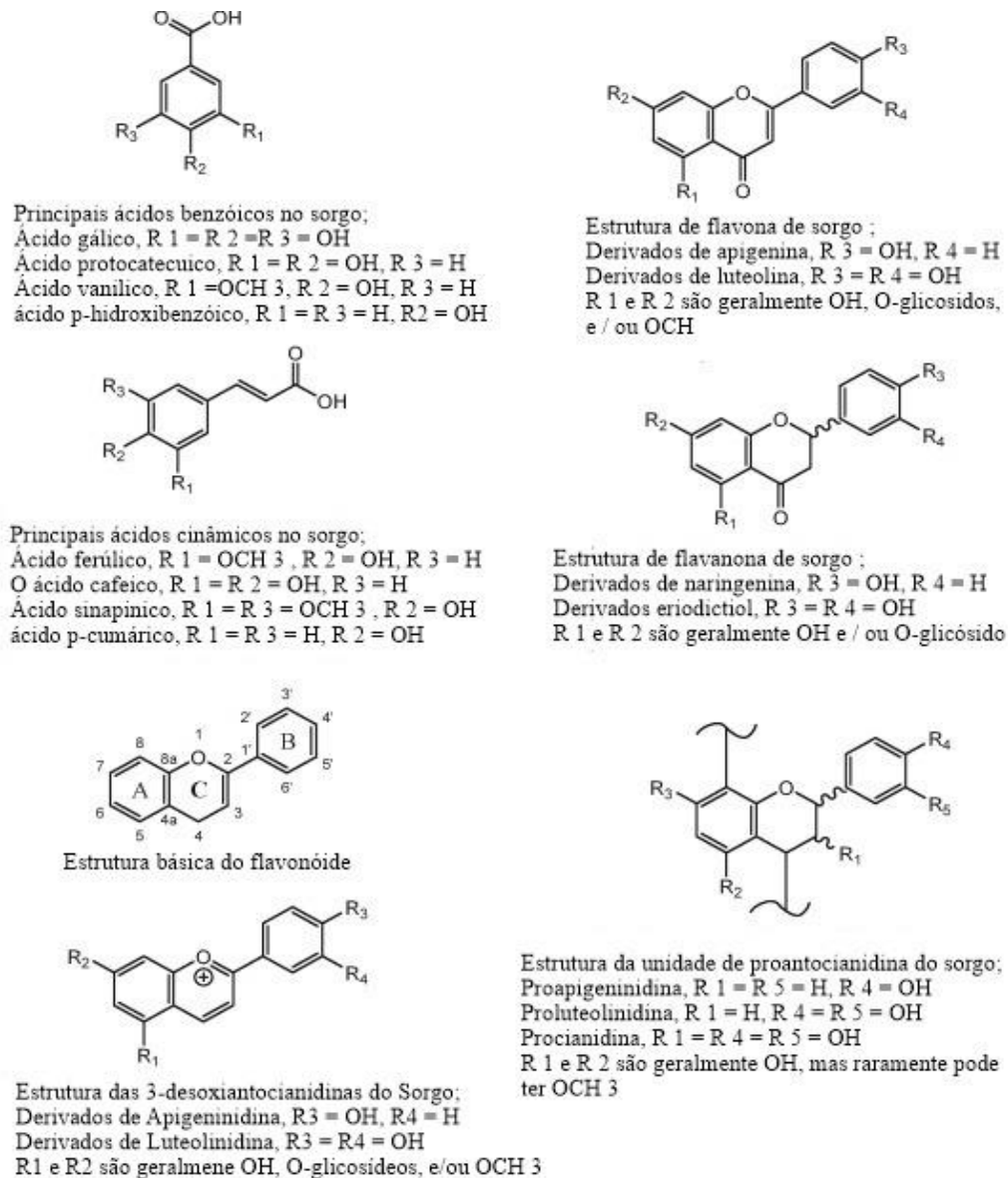


Figura 5: Estrutura dos principais ácidos fenólicos, flavonoides e taninos condensados (proantocianidinas) do sorgo.

Fonte: Adaptado de Girard & Awika, 2018.

As antocianinas do sorgo, denominadas 3-desoxiantocianinas (3-DXA), se destacam como compostos bioativos nos genótipos de pericarpo com colorações mais escuras, como os

pretos, marrons e vermelhos. Além do pericarpo, as glumas que são partes descartadas do sorgo, também podem conter antocianinas. As principais 3-DXA são a luteolinidina e a apigeninidina, encontradas em maiores quantidades nos pericarpos preto e avermelhado (Awika et al., 2005), cujas estruturas químicas são representadas na figura 5. Estes compostos, por não possuírem uma hidroxila na posição C-3 do anel, têm uma maior estabilidade em diferentes valores de pH, o que as diferenciam daquelas encontradas em hortaliças e frutas, possibilitando a sua utilização na produção de corantes naturais (Dykes et al., 2009).

O sorgo é a única fonte de 3-DXA presentes em grandes quantidades. Quando comparado com o teor destas antocianinas, o sorgo negro é o que apresenta maiores teores disponíveis deste pigmento. De acordo com Awika et al (2005), o sorgo preto apresentou concentração de 4,0 a 9,8 mg. g⁻¹ de antocianinas totais, enquanto demais fontes apresentaram 0,2 a 10 mg. g⁻¹. Observou-se, também, uma correlação altamente positiva entre os teores de antocianinas presentes nas amostras de sorgo e sua atividade antioxidante, o que confirmou a contribuição das antocianinas neste papel antioxidante.

Dykes et al. (2009) demonstraram, também, que o sorgo com genes para pericarpo vermelho, produzem elevadas quantidades de 3-desoxiantocianidinas (figura 6) e maiores níveis de flavonas e taninos do tipo condensado. Os taninos são responsáveis pelo sabor amargo e adstringente em alguns alimentos.

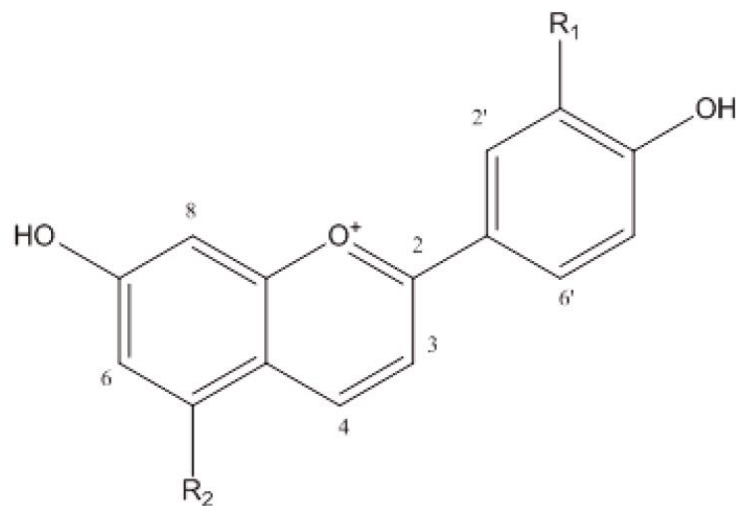


Figura 6: Estrutura química das principais 3-desoxiantocianidinas do sorgo: Apigeninidina (R₁ = H; R₂ = OH); Luteolinidina (R₁ = OH; R₂ = OH).

As 3-desoxiantocianinas são mais estáveis em relação ao pH, calor e aditivos quando comparadas com aquelas encontradas em frutas e hortaliças. Isto acaba tornando-se um grande potencial para a sua exploração na produção de corantes naturais na indústria de alimentos

(Ojwang & Awika, 2010; Queiroz et al., 2014; Yang; Dykes & Awika, 2014). Yang et al (2014) avaliaram a estabilidade térmica das 3-desoxiantocianidinas brutas e puras em 95 °C/2 h e 121 °C/30 min em valores de pHs de 1-7. Eles observaram que as 3-desoxiantocianidinas apresentaram alta estabilidade térmica a 95 °C/2 hr e 121°C/30 min, sendo mais estáveis no pH 1–2 do que no pH 3-7. A retenção de cores foi melhor em pH 1-2 (70,2-100%) do que em pH 3-7 (39,0-86,8%), demonstrando que o pH afeta significativamente a estabilidade térmica das antocianinas.

2.6. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DAS ANTOCIANINAS

Existem muitos métodos para a extração de compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, o subgrupo que contém as antocianinas. Vários solventes possuem alto poder de extração quando relacionado as antocianinas, devido a sua característica de serem altamente solúveis em solventes polares, como a água, etanol e metanol. Na maioria das vezes, são extraídas em meio ácido com o objetivo de desnaturar as membranas celulares, favorecendo o processo de difusão dos pigmentos e para manter o cátion flavilium, ou seja, deixando sua estabilidade maior e preservando a sua coloração (Paludo, 2013).

Na extração das antocianinas, o principal objetivo é obter uma extração eficiente, otimizando-a e resultando em mínima degradação das mesmas e um extrato com alta atividade antioxidante, utilizando uma tecnologia de baixo custo e limpa (Cavalcanti et al., 2011). Esta demanda por desenvolvimento de extração adequada e mais eficiente de compostos ativos nas plantas vem crescendo. Além disto, o método experimental para alcançar condições apropriadas para um rendimento ideal é exigente e demorada (Ravanfar, Tamadon, & Niakousari, 2015).

Segundo Adom & Liu (2002), a dificuldade de extração de compostos fenólicos nos cereais, por exemplo, é devido a sua ligação na parede celular. Os grãos contêm uma grande variedade de fitoquímicos que exercem benefícios à saúde dos seres humanos. Por este motivo, criar tecnologias de melhoramento de extração para facilitar a interrupção celular, tem sido importante para adquirir os benefícios destes compostos (Adom & Liu, 2002; Barba et al., 2016).

Até o momento, várias técnicas de extração convencionais foram relatadas para a extração de compostos fenólicos: extração por solvente, extração com água quente, extração alcalina, extração à base de resina e extração assistida por enzima. Entretanto, elas dependem geralmente de solventes orgânicos e estes podem apresentar problemas, como toxicidade, transformação química de extratos e potencial poluição ambiental devido a grandes volumes de

solvente orgânico utilizado. Ademais, estas técnicas podem possuir outras desvantagens, como a perda de compostos devido à hidrólise e oxidação durante a extração, assim como tempo de extração prolongado, já que muitas vezes a extração convencional é limitada pelas resistências à transferência de massa de ambas as fases (Homayoonfal et al., 2018).

Com isto, pesquisadores procuram atender as indústrias de alimentos aprimorando o desempenho das extrações convencionais, superando alguns dos problemas encontrados. Novas tecnologias inovadoras ou não-convencionais, tais como micro-ondas, extração por líquido pressurizado, por fluido supercrítico e o ultrassom foram desenvolvidas. Todas estas tecnologias visam evitar/minimizar o uso de solventes orgânicos, reduzir o tempo de tratamento, diminuir a temperatura de processamento, intensificar o processo de transferência de massa, aumentar os rendimentos de extração e/ou reduzir consumo de energia (Barba et al., 2016).

Na técnica pelo micro-ondas se utiliza energia para facilitar a partição dos analitos de uma amostra para o solvente, facilitando a extração do composto desejado. É uma técnica que se pode utilizar várias amostras ao mesmo tempo, podendo ser feita na ausência de luz. Sua desvantagem é a alta temperatura, o que no caso também ocorre na técnica de Líquido Pressurizado onde se utiliza altas pressões e temperaturas em tempo muito curto de extração (Garcia-Salas et al., 2010; Liazid et al., 2007).

Herman et al (2020) determinaram a estabilidade relativa e a capacidade de extração das 3-desoxiantocianinas (3-DXA) do sorgo sob a extração assistida por microondas (MAE) comparadas com antocianinas de milho e feijão-caupi. As 3-DXA permaneceram estáveis às condições MAE até 1200 W, por 100 ° C em 30 minutos, aumentando o seu o rendimento em 100% comparado com o método convencional. Por outro lado, as antocianinas do milho e do feijão-caupi foram instáveis e foram rapidamente degradadas sob MAE.

Barros et al. (2013) avaliaram a extração de compostos fenólicos de sorgo utilizando solventes sob condições de alta pressão e temperatura. Polifenóis de farelos de sorgo foram extraídos usando um extrator de solvente acelerado (ASE). Concluiu-se que houve um aumento significativo na extração de compostos fenólicos do farelo de sorgo preto utilizando o ASE e água como solvente, em temperaturas acima de 100 °C, comparado às extrações convencionais. Além disso, a mesma quantidade de fenólicos e maiores capacidades antioxidantes foram obtidas com o etanol. Esses resultados mostram a importância de otimizar métodos não-convencionais mais rápidos e de fonte limpa para extração industrial de compostos fenólicos

através do sorgo para uso em corantes, alimentos e bebidas com altos níveis de antioxidantes e, portanto, potencial benéficos para a saúde.

Dessa forma, podemos citar a técnica de extração pelo ultrassom, um método que é rápido, fácil e eficiente nas extrações de compostos fenólicos. Tem sido tópico de pesquisa e desenvolvimento, uma tecnologia considerada limpa e de grande interesse nos efeitos que as ondas de ultrassom de alta potência têm sobre as características físicas, bioquímicas e nas propriedades dos alimentos. O ultrassom tem a possibilidade de produzir uma variedade de efeitos, dependendo da combinação de características entre suas ondas e o produto. Esta tecnologia, consideravelmente chamada de “verde”, está sendo utilizada inclusive em aplicações de sustentabilidade ambiental (Chemat et al., 2011).

2.7. TÉCNICA ASSISTIDA PELO ULTRASSOM

A técnica de ultrassom é uma alternativa econômica oferecida aos processos de extração que utilizam reagentes de custo elevado. É um método eficaz na extração de constituintes de matrizes vegetais, sendo realizadas em tempos mais curtos e possui vantagens como baixo aquecimento e maiores rendimentos, comparada com os outros processos de extração (Dong et al., 2010).

Os fatores mais importantes que podem influenciar no processo de extração por ultrassom são: atividade de água, tamanho das partículas da amostra, o solvente empregado, temperatura, pressão, frequência e tempo (Barba et al., 2016).

O ultrassom se baseia num processo que utiliza ondas ultrassônicas transmitidas em frequência superior à capacidade de audição humana, estabelecida de 20kHz a 100MHz, que se propaga em um meio pelo processo de expansão e compressão. Este processo gera o crescimento e colapso das bolhas, chamado de cavitação, o processo no qual as bolhas se formam, crescem e sofrem colapso implosivo (Chemat et al., 2011; Veggi, 2013).

As forças de cavitação resultantes da aplicação de ultrassom ocorrem pela implosão de microbolhas que são formadas devido a oscilações de pressão (compressões e rarefações alternadas) causadas pela passagem das ondas acústicas no meio líquido. Essas microbolhas formadas crescem até atingirem tamanho instável e colapsarem, como ilustrado na Figura 7 (Barba et al., 2016).

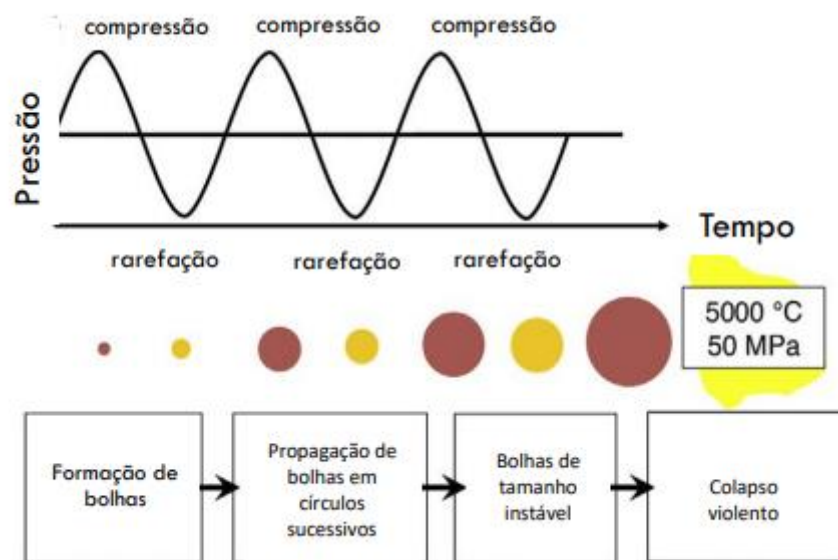


Figura 7: Fenômeno de cavitação.

Fonte: Barba et al. (2016).

Este processo também é mostrado na figura 8 na superfície de um vegetal no momento do colapso em um banho ultrassônico à temperatura ambiente. Quando essas bolhas colapsam na superfície de um material sólido (a), geram microjatos direcionados para a superfície sólida (b e c), o que acelera drasticamente a reatividade química no meio. A alta pressão e a adequada temperatura envolvidas neste processo destruirão as paredes celulares da matriz da planta e seu conteúdo é liberado no meio (d). Esta é uma ferramenta muito interessante para extração de ingredientes de produtos naturais (Barba et al., 2016; Chemat et al., 2011).

O mecanismo de extração envolve dois tipos de fenômenos físicos: a difusão através da parede celular do vegetal e, logo após o rompimento da célula, a saída do seu conteúdo. O efeito cavitacional das ondas modifica as propriedades físicas e químicas da parede celular, o que facilita a liberação do material e aprimora o transporte de transferência de massa. Isto também resultada em um aumento da eficiência e/ou redução do tempo de extração (Chemat et al., 2011).

Por se tratar de uma onda mecânica, suas características, como frequência, comprimento de onda e amplitude, podem influenciar a cavitação acústica e, portanto, a extração dos compostos de interesse, acarretando no interesse em otimizar todas essas variáveis de processo para a melhor utilização de energia, tempo, matéria-prima e/ou solvente (Chemat et al., 2017; Garcia-Salas et al., 2010).

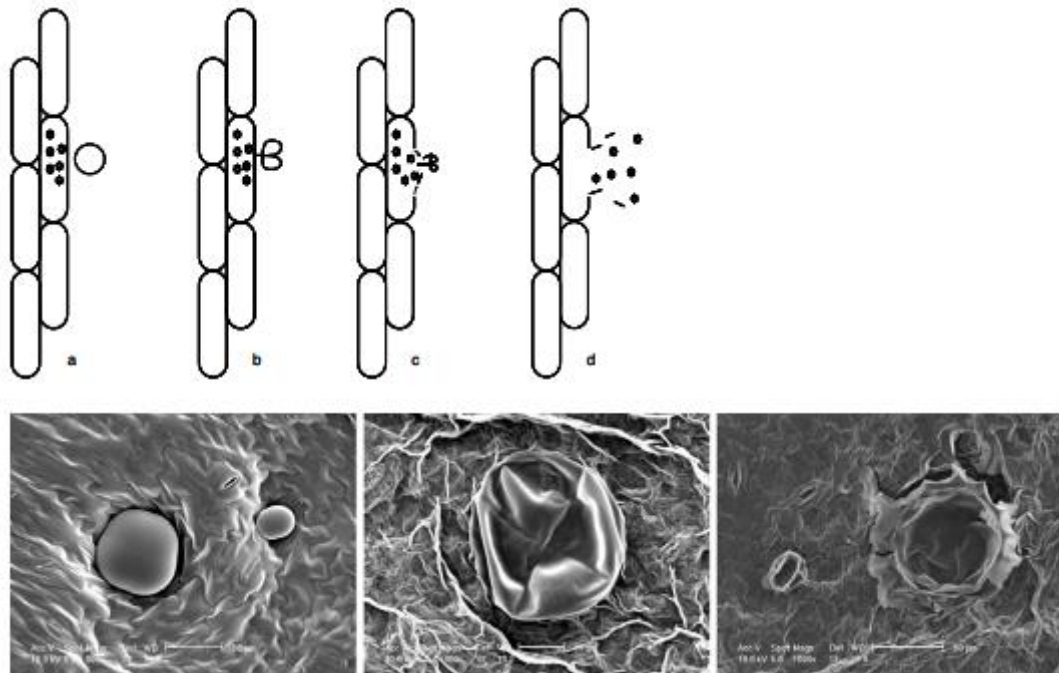


Figura 8: Colapso de bolhas em processo de cavitação e liberação do material vegetal: exemplo de extração de óleo essencial de manjerição.

Fonte: Chemat et al. (2011).

Vários estudos têm mostrado a aplicação da tecnologia do ultrassom em relação a estrutura, processamento, quantidade e qualidade dos compostos bioativos encontrados em frutas e vegetais. Espera-se que os compostos bioativos sejam liberados no meio com a ruptura do tecido celular resultante do processamento de ultrassom e dessa forma, um aparente aumento do conteúdo de compostos bioativos pode ser verificado. O uso do ultrassom também pode permitir a redução do tempo, temperatura e quantidade de solvente utilizado, o que é especialmente importante ao lidar com compostos pouco estáveis (Rojas et al, 2021).

Chen et al. (2007) estudaram a extração de antocianinas de framboesa vermelha (*Rubus idaeus* L. var. Heritage) por ultrassom. Eles demonstraram o seu grande potencial para melhorar a eficiência e a redução do tempo nos processos de extração das antocianinas. As condições otimizadas obtidas pelos autores foram: proporção de solventes para materiais de 4:1 (mL/g), tempo de extração de 200 s e potência ultrassônica de 400 W. Além disso, em comparação com a extração convencional, a otimização pelo ultrassom foi mais eficiente e rápida de se extrair antocianinas da framboesa vermelha.

Carrera et al. (2012) realizaram uma otimização assistida pelo ultrassom para extração de compostos fenólicos da uva. Eles avaliaram diversas variáveis: temperatura de extração (0–

75 ° C), amplitude de saída (20, 50 e 100%), ciclo de trabalho (0,2 s, 0,6 s e 1 s), quantidade de amostra (0,5–2 g) e o tempo total de extração (3–15 min). A temperatura de melhor extração foi de 10 °C; quanto maior a amplitude, maior foi a extração dos compostos e a quantidade de amostra que teve melhores resultados foi a de 1g. Os autores também compararam a extração por ultrassom com o método convencional e demonstraram que o tempo de extração reduziu de 60 minutos (convencional) para 6 minutos (ultrassom).

Ravanfar et al. (2015) demonstraram que o método assistido por ultrassom teve um grande potencial na extração das antocianinas do repolho roxo. Eles obtiveram um rendimento de 21 mg/L, adequado a um tempo, temperatura e potência, respectivamente 30 min, 15 °C e 100W. Contudo, o que mais caracterizou a utilização deste método foi a baixa temperatura, pois a mesma influencia no processo de degradação das antocianinas.

He et al. (2016) utilizaram o ultrassom para otimizar a extração de antocianinas e fenólicos totais do bagaço de vinho do mirtilo. Um delineamento Box-Behnken foi usado para prever que as condições otimizadas foram: temperatura de extração de 61,03 °C, relação líquido-sólido de 21,70 mL/g e tempo de sonicação de 23,67 min. Os rendimentos de antocianinas e fenólicos totais obtidos através do método otimizado foram superiores aos do método de extração convencional, sendo um rendimento de quase 80% do total em 4 min pelo ultrassom. Além disso, o método do ultrassom produziu cerca de 2,5 vezes mais antocianinas totais e cerca de 3,2 vezes o teor de compostos fenólicos comparados com o método convencional.

Espada-Bellido et al. (2017) otimizaram a extração assistida por ultrassom para a determinação de antocianinas e compostos fenólicos totais presentes em amoras. Diversas variáveis de extração, incluindo composição de metanol (50 a 100%), temperatura (10 a 70 ° C), amplitude de ultrassom (30 a 70%), ciclo (0,2 a 0,7 s), pH do solvente (3 a 7) e solvente a proporção sólida (10: 1,5–20: 1,5) foram otimizadas. Duas variáveis de resposta foram consideradas: antocianinas totais e compostos fenólicos totais. A temperatura de extração e a composição do solvente foram os parâmetros mais influentes para antocianinas (48 °C e 76%) e compostos fenólicos (64 °C e 61%). A temperatura e o pH foram as variáveis que influenciaram diretamente na extração. Quanto maior a temperatura maior a recuperação dos compostos e quanto menor o pH melhor a extração das antocianinas. Concluiu-se que as condições ideais para a extração de dessas antocianinas foram as seguintes: solvente de extração com 76% de metanol em água a pH 3, temperatura de extração de 48°C, amplitude de ultrassom de 70%, ciclo de 0,7 e 12:1,5 como a proporção ideal solvente-sólido. As condições ideais para

os compostos fenólicos totais foram as seguintes: solvente de extração com 61% de metanol em água a pH 7, temperatura de extração de 64°C, amplitude de ultrassom de 70%, ciclo de 0,7 e 11: 1,5 como a relação solvente-sólido ideal. Para ambas variáveis resposta, o tempo ideal foi de 10 minutos.

Mesmo com poucos estudos relacionados com a técnica assistida por ultrassom na obtenção de antocianinas, pode-se inferir que com otimização e controle ideal dos parâmetros envolvidos nesta técnica, os resultados são positivos quando comparados com o método convencional mostrando bons rendimentos, diminuição de tempo e de temperatura de extração, maior estabilidade dos compostos fenólicos (Espada-Bellido et al. (2017), He et al. (2016), Carrera et al. (2012), Chen et al. (2007), além de ser um método mais sustentável, do ponto de vista ambiental.

2.8. INFLUÊNCIA DO ULTRASSOM NA ESTABILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS

As antocianinas e os compostos fenólicos participam de inúmeras reações, tais como oxidação, precipitação, copigmentação e condensação, que resultam na formação de novos compostos e alteração na cor. Acredita-se que uma irradiação ultrassônica pode iniciar algumas reações químicas em cadeias devido aos radicais livres que são induzidos pelo ultrassom (Munekata et al., 2020; Zhang & Wang, 2017).

Ma et al. (2009) avaliaram sete compostos fenólicos de dois grupos diferentes: ácidos cinâmicos e os ácidos benzóicos, encontrados na casca de citros. A extração ocorreu entre 15, 30 e 40°C no tempo de 10, 20, 30 e 40 minutos para o método assistido pelo ultrassom e o método convencional com temperatura de 40°C, no tempo de 1 e 8 horas. A condição ideal de extração, pelo método assistido pelo ultrassom, para o rendimento dos ácidos cinâmicos foi de 30°C por 40 minutos e para os ácidos benzóicos foi de 40°C por 10 minutos. Além disso, quando os compostos fenólicos dos extratos de casca de citros foram submetidos ao processo de ultrassom, os fenólicos do grupo do ácido benzóicos foram mais estáveis que os fenólicos do grupo do ácido cinâmicos, o que foi atribuído às estruturas químicas diferentes dos ácidos fenólicos e aos efeitos combinados das variáveis ultrassônicas.

Zhang & Wang (2017) demonstraram os efeitos da irradiação por ultrassom na evolução das propriedades da cor e dos principais compostos fenólicos durante o armazenamento do vinho. Os resultados mostraram que com o aumento do tempo do ultrassom, a faixa visível no espectro se tornava maior, o que foi sugerido que a aplicação do ultrassom pode acelerar a

formação de novos pigmentos. As concentrações de malvidina-3-glicosídeo e catequinas diminuíram com o tempo de armazenamento devido ao ultrassom. Este fato foi atribuído às reações de oxidação, degradação, precipitação e copigmentação. Por outro lado, as concentrações de epicatequina e ácidos fenólicos aumentaram, devido principalmente à hidrólise e decomposição de outros compostos poliméricos.

No entanto, há uma insuficiência de informações sobre a extração simultânea desses compostos fenólicos, principalmente direcionados para as antocianinas nessa área. Contudo, mais trabalhos são necessários para entender o efeito do ultrassom na estabilidade química das antocianinas. Além disto, não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram o efeito do ultrassom na estabilidade das 3-desoxiantocianinas do sorgo.

2.9. METODOLOGIA ESTATÍSTICA

O delineamento experimental Composto Central (CCD) é uma metodologia para superfície de resposta (MSR), apresentado por Box e Wilson, em 1951. Ele é uma ferramenta matemática e estatística amplamente utilizada, como uma evolução dos planejamentos 3^3 , que necessitavam de muitos experimentos para um pequeno número de fatores, mesmo para planejamentos fracionários. Possui outras vantagens, como rotabilidade e blocagem ortogonal, além do pouco número de ensaios. O delineamento com rotabilidade, chamado de delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) consiste de pontos centrais e axiais situados nos eixos do sistema de coordenadas com distância $\pm \alpha$ da origem e formam a parte estrela do planejamento, e pode ser utilizado na investigação de possíveis interações entre as variáveis experimentais de diversos processos. Desse modo, tal metodologia pode ser utilizada para otimizar qualquer variável resposta que possa ser influenciada por determinados fatores (Teófilo & Ferreira, 2006).

Quando utilizamos uma metodologia de resposta temos como objetivo maximizar ou minimizar uma resposta de possíveis variáveis no processo, com o intuito de avaliar a relação presente entre uma resposta de interesse e um número de variáveis de controle. O CCD oferece vantagens de definir o número de variáveis a serem estudadas (k), qual planejamento fatorial será empregado (completo $2k$ ou fracionário $2k-b$) e quantos experimentos serão realizados no ponto central ($2k$) (Teófilo & Ferreira, 2006). Outra propriedade a ser observada neste delineamento é que ele permite que os modelos de ordem crescente sejam construídos sequencialmente, o que resulta numa boa construção nas etapas de modelagem e deslocamento da MSR.

No planejamento de experimentos em que o principal objetivo é caracterizar a relação entre uma ou mais variáveis resposta e um conjunto de fatores de interesse, procura-se contruir um modelo que descreva a variável resposta em função dos intervalos estudados destes fatores. Logo, pela MRS é possível aproximar um modelo empírico a uma relação, que inicialmente é desconhecida, entre os fatores e a resposta gerada pelo processo. Essa função que relaciona estas variáveis é chamada de superfície de resposta (Mendonça, 2012).

A aplicação de um delineamento experimental ideal para o estudo da otimização de processos é de extrema importância para obtenção de uma rentabilidade dos experimentos e um modelo que relacione as minhas variáveis a uma maior qualidade de ajuste, associado a um menor custo.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Otimizar as condições de extração de fenólicos do sorgo assistida por ultrassom e avaliar o efeito do ultrassom na estabilidade das 3-desoxiantocianinas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato bruto do sorgo, rico em compostos fenólicos, utilizando o ultrassom de acordo com as combinações geradas pelo delineamento experimental Composto Central Rotacional;
- Ajustar um modelo matemático que melhor explique o comportamento da extração assistida pelo ultrassom de acordo com a combinação dos efeitos estudados (tempo, temperatura e frequência) na resposta das concentrações de antocianinas e de fenólicos totais na farinha de sorgo;
- Comparar os resultados das análises das condições otimizadas por ultrassom com o método convencional de extração;
- Avaliar o efeito do ultrassom na cinética das 3-desoxiantocianinas presentes nos extratos fenólicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Corantes Naturais e Compostos Bioativos (LaCBio) do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG. As etapas do estudo estão indicadas na figura abaixo (Figura 9).

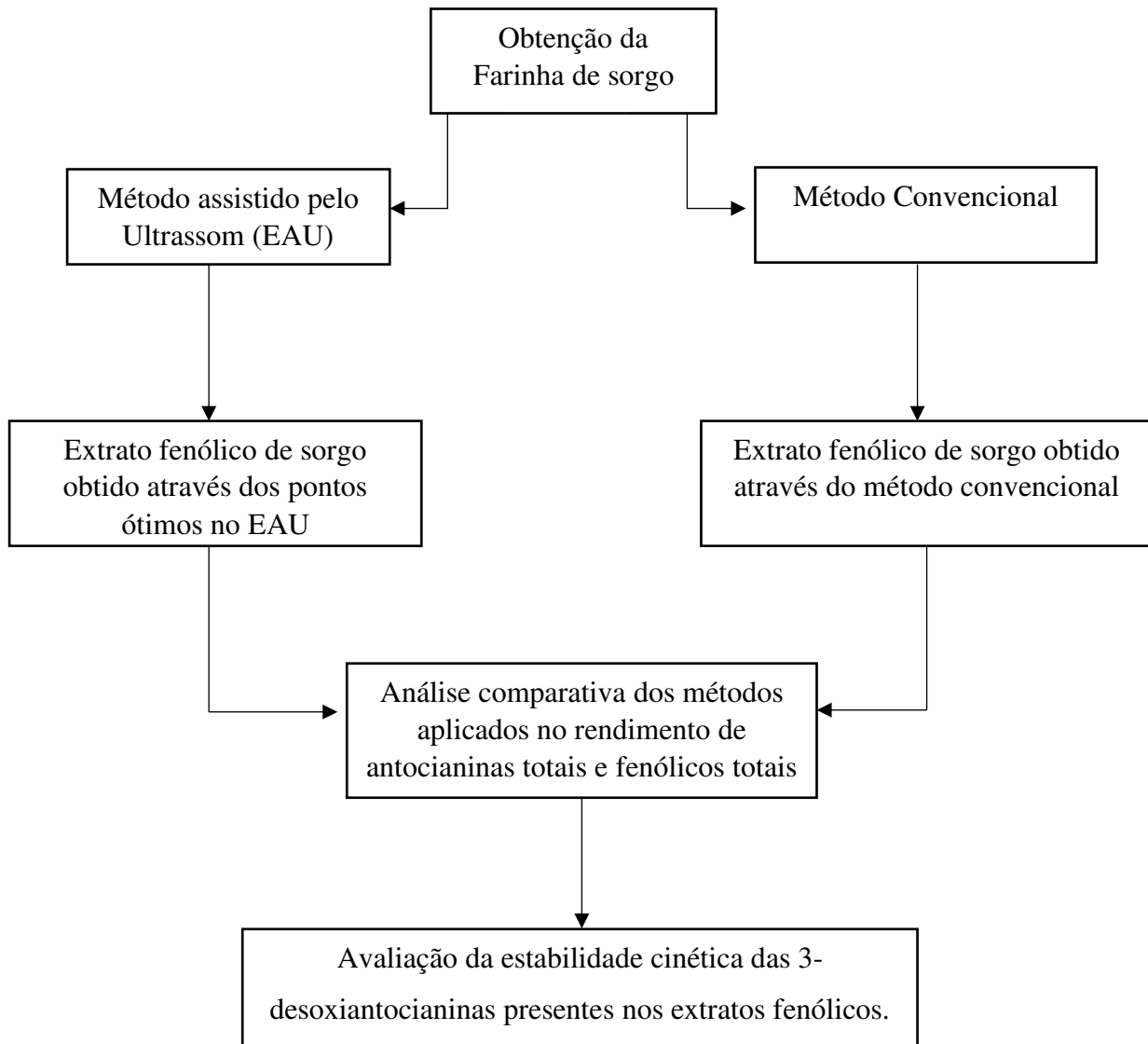


Figura 9: Esquema demonstrativo das etapas do estudo.

4.1. MATÉRIA-PRIMA

A linhagem de sorgo SC 84 (Figura 10), de grãos marrons com taninos, safra 2019, foi fornecida pela Embrapa Milho e Sorgo, situada na cidade de Sete Lagoas, Minas Gerais. Em estudo prévio realizado pela Embrapa (dados não publicados), o genótipo escolhido apresentou maior teor de antocianinas totais, entre 240 genótipos, pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético de Sorgo da Embrapa Milho e Sorgo. Para obtenção da farinha de

sorgo, os grãos foram moídos em moinho vibratório de facas e sua granulometria foi padronizada em peneira de 125 μm . A farinha foi armazenada em sacos plásticos refrigeradas em freezer convencional a -20°C até o momento das análises.



Figura 10: Sorgo SC 84, coloração marrom, fornecido pela Embrapa Milho e Sorgo.

4.2. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

4.2.1. PREPARO DA AMOSTRA

A amostra de farinha de sorgo foi misturada com o solvente utilizado para a extração: Etanol 70% (v/v) em água acidificado com HCL a 1%. A proporção foi de 1:10 (m/v) de farinha e o procedimento foi de acordo com a metodologia de Rocha et al. (2018). Os extratos fenólicos de sorgo foram obtidos através da extração assistida por ultrassom, utilizando um sonicador de banho (Elmasonic TI-H-10, Elma, Alemanha). Os extratos foram filtrados e centrifugados (centrifugador NÜVE, modelo NF 1200 R) por 10 min a 5000 rpm. O sobrenadante foi recuperado e armazenado a -20°C até análises subsequentes.

4.2.2. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

A extração assistida por ultrassom foi otimizada com base nas condições controladas do equipamento, de acordo com a combinação de variáveis geradas pelo delineamento experimental. Os extratos foram submetidos a algumas variáveis: frequência, tempo de extração e temperatura. Posteriormente, os extratos obtidos foram filtrados em papel Whatman nº1 a vácuo e armazenados em frascos de 10 ml, a -20°C até análises posteriores.

4.2.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este experimento fatorial foi realizado de acordo com o delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com três pontos (fatorial, axial e central). O DCCR consistiu em quatro experimentos nos pontos fatoriais (combinações entre os níveis -1 e +1), quatro experimentos nos pontos axiais (níveis $\pm \alpha = 1,4142$) e cinco experimentos nos pontos centrais (Teófilo & Ferreira, 2006). As variáveis independentes (X) e seus respectivos níveis serão: tempo de extração ultrassônica de 5-75 min e temperatura de extração de 35-65°C. O modelo experimental dos níveis das variáveis independentes usadas nos DCCRs está apresentado na Tabela 1, e a matriz do modelo DCCR com as duas variáveis independentes expressas em unidades codificadas e reais está apresentada na Tabela 2. De acordo com a frequência selecionada (25 ou 45 kHz) e o poder ultrassônico de 50%, 13 combinações das duas variáveis em cinco níveis foram obtidas, incluindo a repetição de cinco pontos centrais. As ordens dos ensaios foram realizadas aleatoriamente para minimizar os efeitos de variabilidades inesperadas nas respostas observadas.

Tabela 1: Modelo experimental dos níveis das variáveis selecionadas.

Variável	Unidade	Fatores	Níveis				
			-1,4142 (Axial)	-1 (Cúbico)	0 (Central)	+1 (Cúbico)	+1,4142 (Axial)
Tempo	Minutos	X1	5	15	40	65	75
Temperatura	°C	X2	35	40	50	60	65

Tabela 2: Matriz do modelo do DCCR com duas variáveis independentes expressas em unidades codificadas e reais.

Ensaio	Tempo (min)		Temperatura (°C)	
	Código	Real	Código	Real
1	-1	15	-1	40
2	-1	15	+1	60
3	+1	65	-1	40
4	+1	65	+1	60
5	-1,4142	5	0	50
6	+1,4142	75	0	50
7	0	40	-1,4142	35
8	0	40	+1,4142	65
9	0	40	0	50
10	0	40	0	50
11	0	40	0	50
12	0	40	0	50
13	0	40	0	50

A resposta prevista foi calculada por uma equação polinomial de segunda ordem, de acordo com o modelo da superfície de resposta verdadeira estimulada, para ambas as frequências estudadas. A função de resposta (Y) foi dividida em componentes lineares, componentes quadráticos e de interação, conforme expresso na Equação 1 :

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_1 X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=0}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon_i$$

em que Y é a variável resposta para antocianinas totais e fenólicos totais; β_0 é a constante do modelo; β_i é o coeficiente linear; β_{ii} é o coeficiente quadrático; e β_{ij} o coeficiente de interação; ε_i representa o erro aleatório; k é o número de fatores estudados no experimento; X_i e X_j são os valores das variáveis independentes de tempo e temperatura na escala real ($i \neq j$). A equação polinomial ajustada foi apresentada como gráficos de superfície e de contorno a partir dos valores obtidos de antocianinas totais e compostos fenólicos totais, no intuito de ilustrar a

relação entre a resposta e os níveis experimentais de cada fator e para obter as condições ótimas, a fim de maximizar a variável resposta.

4.3. AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Foi realizado um estudo comparativo entre a extração assistida por ultrassom (pontos ótimos) e a extração convencional, em que foi avaliado a influência do ultrassom na eficiência de extração de antocianinas e compostos fenólicos da farinha de sorgo. A capacidade antioxidante e os teores de antocianinas e fenólicos totais também foram determinados.

4.3.1. EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM OTIMIZADA

Os pontos otimizados da extração por ultrassom, ou seja, combinações das variáveis independentes estudadas (tempo e temperatura) que forneceram maiores concentrações das variáveis dependentes (antocianinas totais e compostos fenólicos totais) nas duas frequências estudadas (25kHz e 45kHz), foram utilizados para a produção de extratos fenólicos da farinha de sorgo em estudo. As extrações foram realizadas em triplicata.

4.3.2. EXTRAÇÃO PELO MÉTODO CONVENCIONAL

O procedimento de extração convencional foi baseado na metodologia descrita por Barros et al. (2013). Foi utilizado o solvente de extração: Etanol 70% (v/v) em água acidificado com HCL a 1%. O procedimento de extração envolveu a adição de 40 mL de solvente a 4g de farinha em tubos de centrífuga, os quais foram agitados por duas horas em temperatura ambiente (25°C), em baixa velocidade. A proporção do solvente foi 1:10 (m/v) em todas as extrações. Os extratos foram filtrados e centrifugados (centrifugador NÜVE, modelo NF 1200 R) por 10 min a 5000 rpm. Após este processo, o sobrenadante foi recuperado e armazenado a -20°C até análises subsequentes. A extração foi realizada em triplicata.

4.4. CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS FENÓLICOS

O teor de antocianinas totais foi determinado pelo método do pH-único de acordo com a metodologia de Fuleki e Francis (1968) adaptada por Awika et al. (2004). Os extratos foram analisados em um comprimento de onda específico de 480 nm referente a absorção máxima, baseado na luteolinidina. O conteúdo de antocianinas totais foi expresso em mg por 100 mL de extrato. A equação 2 é dada pelo cálculo do teor de antocianinas no extrato:

$$C = \frac{Abs \times MM}{\varepsilon \times b}$$

Em que C é a concentração de antocianinas totais em g/L, Abs é a absorbância lida em 480 nm, MM é a massa molar da antocianina majoritária (luteolinidina) do grão em 270g/mol, ε é o coeficiente de absorvidade molar da antocianina majoritária (luteolinidina) em 29157 L/mol.cm, e b é a espessura da cubeta, 1 cm (Awika, et al., 2004).

A determinação de compostos fenólicos totais dos extratos de sorgo foi realizada de acordo com metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965). Os compostos fenólicos totais foram quantificados através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu e os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico/100 g de farinha de sorgo (mg EAG/100 g de farinha de sorgo).

A capacidade antioxidante dos extratos foi realizada pelos métodos ABTS e DPPH, como descrito por Re et al. (1999) e Kim et al. (2002), respectivamente. A capacidade antioxidante foi calculada e expressa como μ mol equivalente de Trolox (TE)/mL de extrato.

4.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ULTRASSOM NA ESTABILIDADE DAS ANTOCIANINAS DO SORGO

O estudo do efeito do ultrassom na estabilidade das antocianinas do sorgo foi realizado com os extratos obtidos (T1, T2, T3, T4, T5) na utilização de pontos ótimos e pontos selecionados de maior extração após a otimização com o ultrassom comparados com o método convencional.

Os extratos foram avaliados pelo processo de degradação das antocianinas durante a extração e armazenamento, por 45 dias, em temperatura ambiente (25°C), em frascos âmbar, hermeticamente fechados, na ausência de luz. Durante o armazenamento, as concentrações de antocianinas totais foram determinadas nos tempos 0 (tempo inicial), 15, 30 e 45 dias. As etapas deste estudo são representadas na figura 11. O estudo foi realizado em triplicata.

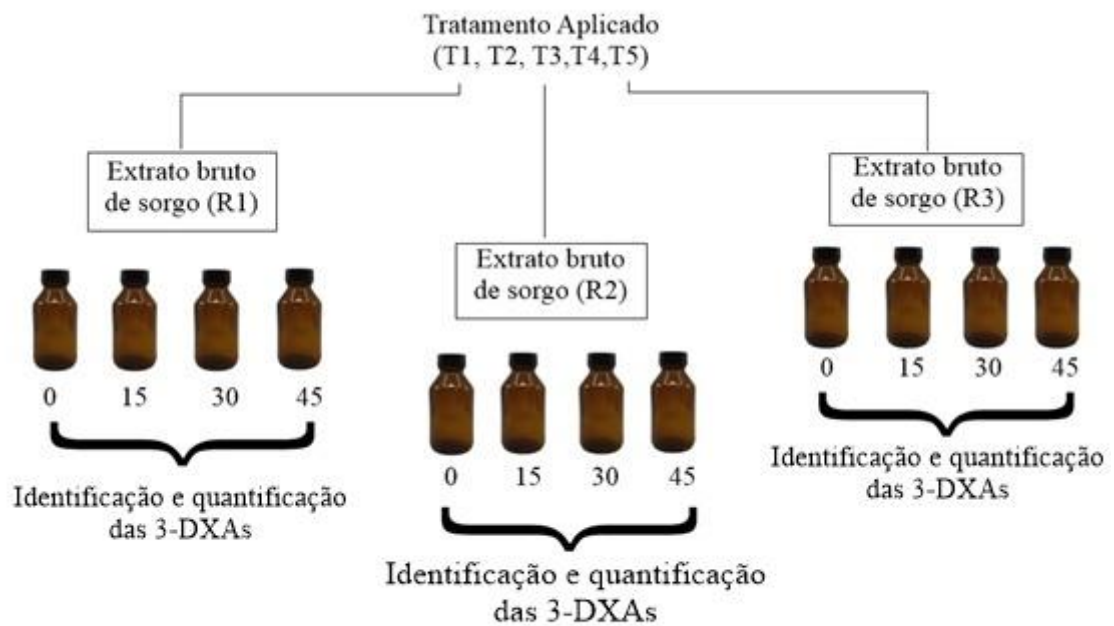


Figura 11: Desenho experimental sob ausência de luz: 5 tratamentos (T1, T2, T3, T4, T5), em 3 repetições (R1, R2, R3). Um frasco âmbar, contendo 10 mL de extrato, foi retirado de cada tratamento e repetição, para a análise nos tempos 0, 15 dias, 30 dias e 45 dias.

Além disso, as 3-DXAs, luteolinidina, apigeninidina, 5-metoxi-luteolinidina e 7-metoxi-apigeninidina foram identificadas e quantificadas nas amostras durante o armazenamento por 45 dias. A análise foi realizada de acordo com a metodologia de identificação e quantificação de antocianinas nos extratos fenólicos descrito em Cardoso et al. (2014) com modificações. Os extratos foram analisados em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Waters, Alliance 2695). As antocianinas foram separadas utilizando uma coluna C-18 de fase reversa (150 × 4,6 mm i.d., 5 µm) equipado com coluna de proteção C-18 (10 mm × 3,9 mm) de fase reversa. A temperatura da coluna foi de 35°C, volume de injeção de 10 µL, detecção do espectro a 480 nm. A fase móvel consistiu em (A), água com 4% de ácido fórmico (v/v) e (B), acetronitrila P.A. O gradiente de fluxo para B foi: 0-3min, 10% isocrático, 3-4 min, 10-12%; 4-5 min, 12% isocrático; 5-8 min, 12-18%; 8-10 min, 18% isocrático; 10-12 min, 18-19%; 12-14 min, 19% isocrático; 14-18 min, 19-21%; 18-22 min, 21-26%; 22-28 min, 26-28%; 28-32 min, 28-40%; 32-34 min, 40-60%; 34-36 min, 60% isocrático; 36-38 min, 60-10%; 38-45 min, 10% isocrático. O fluxo ocorreu em 1,0 mL/min em gradiente. O tempo de corrida foi de 45 minutos para cada repetição, sendo os tempos de retenção aproximadamente, 8 minutos para o cloreto de luteolinidina, 10 minutos

para o cloreto de apigeninidina, 12 minutos para o [] 5-metoxi luteolinidina, 14 minutos para o 7-metoxi apigeninidina, 16 minutos para o 5,7-Dimetoxi luteolinidina e 18 minutos para o 5,7-dimeoxi apigeninidina, respectivamente.

A identificação de luteolinidina, apigeninidina e 5 - Metoxi Luteolinidina foi baseada nos tempos de retenção dos padrões comerciais e nos espectros de UV-Vis. A quantificação foi realizada comparando-se as áreas dos picos com as obtidas na curva padrão construída a partir da injeção, em duplicata, de seis concentrações diferentes de soluções padrão. A quantificação da 7-metoxi-apigeninidina foi realizada usando os padrões de luteolinidina e apigeninidina, respectivamente, juntamente com o fator de correção de peso molecular apropriado. As concentrações de 3-DXAs foram expressas em $\mu\text{g/g}$ de farinha, como compostos únicos.

4.5.1. CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO

Para os tratamentos aplicados a degradação das antocianinas totais e das 3-dexoantocianinidinas individuais foram determinadas, conforme descrito na metodologia de Barbosa et al., 2020 com modificações. A perda das antocianinas foi ajustada através de um modelo de cinética de degradação de primeira ordem, permitindo o cálculo da constante de degradação (kd). A concentração das antocianinas totais foi determinada nos tempos 0, 15, 30 e 45, a partir da absorbância obtida conforme o item 4.5. As concentrações das 3-DXAs foram determinadas conforme descrito no item 4.6. O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) foi determinado através dos valores de k para representar a estabilidade da luteolinidina, apigeninidina, 5-metoxi-luteolinidina e 7-metoxi-apigeninidina.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o método de otimização dos extratos fenólicos utilizando ultrassom, as análises de regressão foram realizadas para ajustar o melhor modelo da equação polinomial de segunda ordem para as variáveis dependentes estudadas em cada frequência aplicada, através da análise da metodologia de superfície de resposta. Os testes de normalidade dos dados foram avaliados. Os critérios de avaliação para a escolha do melhor modelo foram a significância dos coeficientes do modelo e o valor de R^2 ajustado. Os rendimentos ótimos de conteúdo de antocianinas totais e dos fenólicos totais foram obtidos a partir do perfil de desejabilidade, numa escala de 0-1, para os modelos validados nas duas frequências estudadas (45 kHz e 25 kHz). Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa estatístico TIBCO Statistica, versão 13.5.0.

Os dados obtidos no estudo comparativo da eficiência de extração das 3-desoxiantocianinas e das antocianinas totais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e os valores médios foram comparados no nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

O tratamento ultrassônico foi realizado para a obtenção dos extratos fenólicos através da farinha de sorgo sob o estudo de duas frequências aplicadas (25 kHz e 45 kHz) com as seguintes variáveis: tempo, X_1 , variando de 5 a 65 minutos e Temperatura, X_2 , variando de 35 a 65°C. A amplitude do poder ultrassônico foi fixada em 50 % W, baseado em testes preliminares. Os conteúdos de antocianinas totais (TA) e fenólicos totais (TP) obtidos dos extratos da farinha de sorgo a partir dos 13 experimentos para cada frequência (25 kHz e 45 kHz), nas diferentes combinações estudadas, estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Conteúdo total de antocianinas (TA) e conteúdo de fenólicos totais (TP) obtidos da farinha de sorgo nas frequências de 25 e 45 kHz, obtidos por delineamento Composto Central Rotacional.

Experimentos	X ₁	X ₂	Frequência 25 kHz		Frequência 45 kHz	
	min	°C	TA	TP	TA	TP
1	15	40	39,2	1404,4	41,3	1374,69
2	15	60	49,5	1658,5	54,7	1638,48
3	65	40	43,8	1471,0	44,4	1647,80
4	65	60	62,5	1674,7	62,5	1516,96
5	5	50	47,6	1432,5	42,6	1554,94
6	75	50	48,8	1534,5	48,9	1718,50
7	40	35	45,8	1533,3	44,5	1522,96
8	40	65	53,1	1604,3	57,3	1575,11
9	40	50	50,9	1530,2	50,9	1612,10
10	40	50	49,9	1518,5	50,4	1707,15
11	40	50	51,5	1570,1	50,7	1619,25
12	40	50	53,0	1570,7	51,8	1639,99
13	40	50	49,6	1575,0	53,3	1603,43

(TA) Conteúdo total de antocianinas (mg equivalente a luteolinidina 100 g⁻¹); (TP) Teor de fenólicos totais (mg GAE 100 g⁻¹), X₁ Tempo e X₂ Temperatura.

Dentre os resultados do experimento para o conteúdo de antocianinas totais na frequência de 25 kHz, o 4º experimento (65 minutos e 60°C) apresentou maior teor de antocianinas totais (62,5 mg 100 g⁻¹) seguido pelos experimentos 8 (40 minutos e 65°C) e 12 (40 minutos e 50°C), em que no experimento 8 a temperatura foi de 65°C mostrando a eficiência da extração de antocianinas da farinha de sorgo em altas temperaturas. Na frequência de 45 kHz, os experimentos 4 (65 minutos e 60°C), 8 (40 minutos e 65°C) e 2 (15 minutos e 60°C) apresentaram os maiores teores de antocianinas totais, obtidos também a partir de altas temperaturas. Espada-Bellido et al. (2017) observaram que o aumento da temperatura favoreceu a recuperação das antocianinas totais em extratos de polpas de amoras, através da extração assistida por ultrassom.

Para a extração de fenólicos na frequência de 25 kHz, o maior teor observado foi no experimento 4 (65 minutos e 60°C) (1674,7 mg AGE 100g⁻¹) seguidos pelos experimentos 2 (15 minutos e 60°C) e 8 (40 minutos e 65°C). Foi observado que a maior a extração de fenólicos

também acontece em temperaturas mais altas, devido à maior a mobilidade das moléculas do soluto para o volume do solvente e ao maior fornecimento de energia necessária para a remoção dos compostos fenólicos ligados na parede celular (Adom & Liu, 2002; Goula et al., 2017). Além disso, nos extratos obtidos na frequência de 45 kHz, os maiores teores de fenólicos foram obtidos nos experimentos 6 (75 minutos e 50°C), 10 (40 minutos e 50°C) e 3 (65 minutos e 40°C). Foi observado a temperatura mais baixa de extração em relação as antocianinas.

As variáveis independentes codificadas para cada frequência estudada foram um modelo mais adequado em comparação as variáveis decodificadas, em que as variáveis dependentes são conteúdo de antocianinas totais (TA) e teor de fenólicos totais (TP) e as independentes são: tempo, em minutos, ($X_{1\text{ cod}}$) e temperatura, em °C, ($X_{2\text{ cod}}$) codificadas. Na análise estatística, a primeira hipótese testada foi para a normalidade dos dados entre os tratamentos para antocianinas totais (TA) e fenólicos totais (TP). Para o teste de normalidade, o p valor foi não significativo (n.s) nos testes de Kolmogorov-Sminov e Lilliefors nos extratos fenólicos para as duas variáveis dependentes (TA e TP), ou seja, os dados seguem distribuição normal. O teste da ANOVA realizado para as respectivas variáveis dependentes de cada frequência estudada indicou que existe diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Os resultados para a análise de regressão das concentrações de fenólicos totais são apresentados na tabela 4, em que são exibidos os coeficientes do modelo e p-valor das análises de regressão para as respostas nas frequências de 25 e 45 kHz. Neste caso foi testado o efeito linear, quadrático e da interação, sendo um teste de modelo completo com grau de liberdade suficiente. A falta de ajuste foi calculada a partir do erro puro.

Tabela 4: Análise da regressão do DCCR para fenólicos totais (mg EAG/100 g de farinha de sorgo) na frequência de 45kHz.

Variável	Frequência de 25 kHz		Frequência de 45 kHz	
	Coeficiente	Valor-p	Coeficiente	Valor-p
Constante	1552,848	0,000000	1636,385	0,000000
X₁	28,371	0,038744	47,865	0,031718
X₂	69,791	0,001729	25,838	0,155340
X₁²	-28,198	0,048360	-11,930	0,493487
X₂²	14,449	0,223445	-55,775	0,024472
X₁X₂	-12,583	0,395663	-98,658	0,009171

(X₁) Tempo; (X₂) Temperatura; (X_x²) Efeito quadrático e (X₁X₂) interação.

Observou-se na tabela 4, que os coeficientes para as variáveis tempo linear, temperatura quadrática e interação entre o tempo e a temperatura se mostraram significativos ($p < 0,05$). O efeito quadrático do tempo (X_1^2) não se mostrou significativo para o conteúdo de fenólicos totais do extrato da farinha de sorgo. Na frequência de 25 kHz, os efeitos linear e quadrático do tempo e linear da temperatura se mostraram significativos ($p < 0,05$). A interação entre o tempo e a temperatura não se mostrou significativa para o modelo proposto. A significância do modelo foi influenciada pelas frequências estudadas.

Para a variável resposta de fenólicos totais, os modelos lineares também foram ajustados para as duas frequências, apresentando valores de p significativos, falta de ajuste não significativo, e valores de R^2 0,69 e 0,9235 para as frequências de 25 kHz e 45 kHz, respectivamente. O baixo valor de R^2 da equação de regressão ajustada para a frequência de 25 kHz (Equação 3) indica que o modelo não se ajustou adequadamente aos dados experimentais. Para a frequência de 45 kHz (Equação 4), o modelo é capaz de prever satisfatoriamente o TP a partir do tempo e temperatura.

$$Y_1(TP) = 1562,949 + 28,371X_1 - 30,083X_1^2 + 69,791X_2 \quad \text{Equação 3}$$

$$Y_2(TP) = 1628,086 + 47,865X_1 + 25,838X_2 - 54,219X_2^2 + 98,658X_1X_2 \quad \text{Equação 4}$$

Na frequência de 25 kHz, apesar do modelo para fenólicos totais ter baixo R^2 , é possível observar o efeito das variáveis independentes sobre a capacidade de extração dos compostos fenólicos na farinha de sorgo. A temperatura influenciou positivamente na recuperação de fenólicos totais, em que maiores taxas de extração foram obtidas a partir de 50 – 60 °C (Figura 12A). O efeito do tempo mostrou-se favorável para a recuperação de fenólicos totais (Figura 12A), exibindo melhores recuperações em uma faixa de 40 a 75 minutos. Da mesma forma, no estudo de Rocha et al. (2018) que estudaram o efeito do EAU para otimizar a extração de compostos fenólicos dos frutos Jussara e mirtilo indicando que uma extração mais longa levou a maiores teores de fenólicos totais nos extratos de mirtilo.

O termo quadrático do tempo influenciou negativamente na aplicação da frequência de 25kHz e o mesmo ocorreu para o termo quadrático de temperatura no estudo da frequência de 45kHz. O efeito positivo da interação dos fatores foi significativo para a obtenção do modelo, mostrando a eficiência da extração destes compostos em tempos maiores.

O mesmo foi observado para a frequência de 45 kHz (Figura 11B), em que temperaturas acima de 50 °C também foram favoráveis na extração de fenólicos totais. O efeito do tempo,

acima de 50 minutos, foi positivo para a recuperação de fenólicos totais. Também pode-se observar que o rendimento de fenólicos totais melhorou com o efeito da interação do tempo e temperatura. Teixeira et al., (2018) apresentaram resultados semelhantes em seu estudo com amora-preta, mirtilo e morango utilizando o ultrassom. O efeito do tempo se mostrou positivo para a recuperação de fenólicos totais dos três frutos estudados, apresentando maiores taxas de extração a partir de 30 - 40 minutos, tendo melhores extrações em 75 minutos.

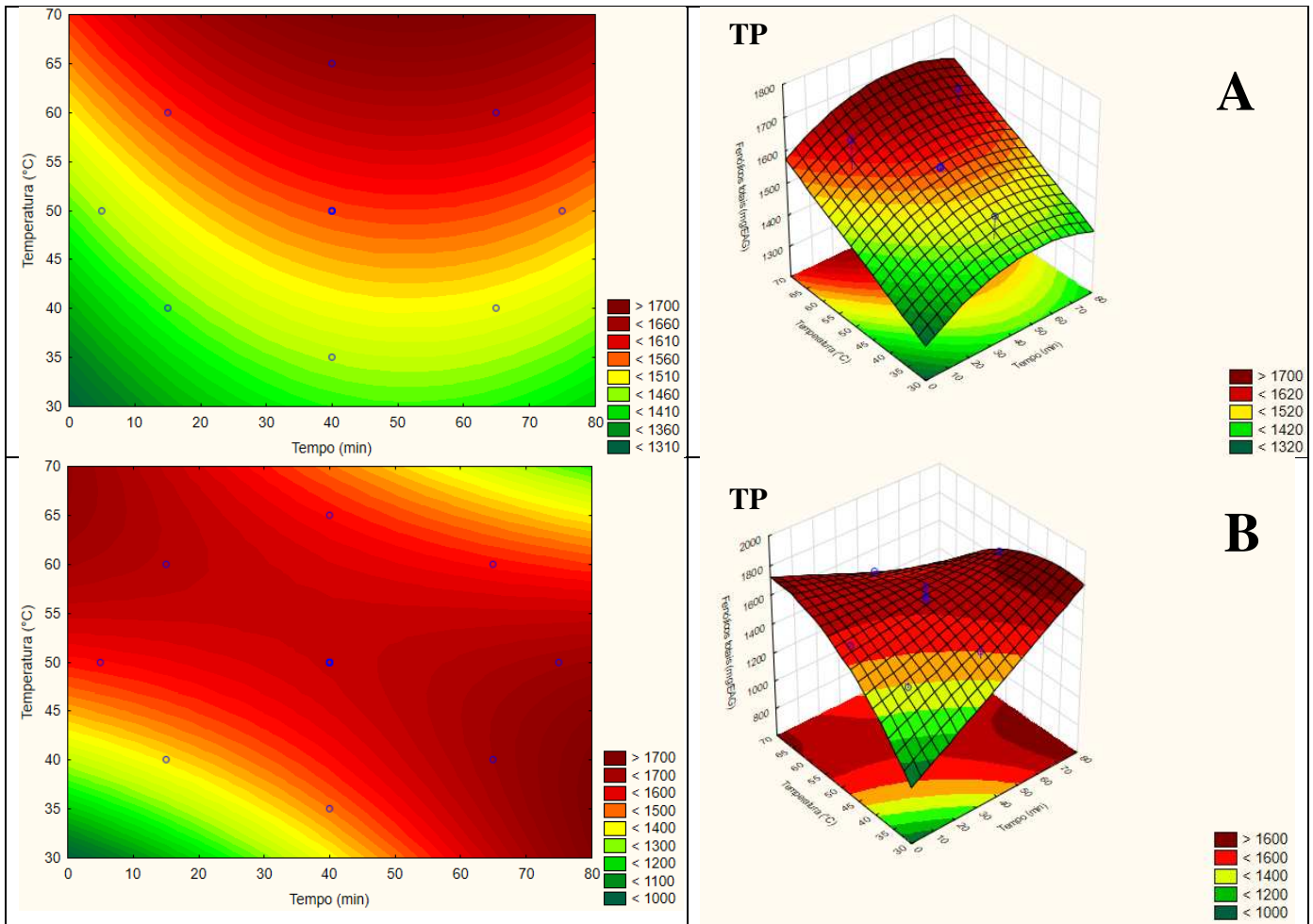


Figura 12: Curvas de superfície de resposta (coluna direita) e de contorno (coluna esquerda) do conteúdo de fenólicos totais (mg EAG/ 100g de farinha de sorgo) em função do tempo (minutos) e temperatura (°C) para a extração assistida pelo ultrassom da farinha de sorgo nas frequências de 25 kHz (A) e 45 kHz (B).

Para o rendimento de fenólicos totais na frequência de 45 kHz o ponto ótimo foi alcançado no tempo de 75 minutos e na temperatura de 42,5 °C, predizendo um conteúdo de 1749,1 mg EAG/ 100g de farinha de sorgo, obtendo-se um valor experimental de 1601,44 mg EAG/ 100g de farinha de sorgo (Figura 13). O erro percentual obtido foi de 8,44%.

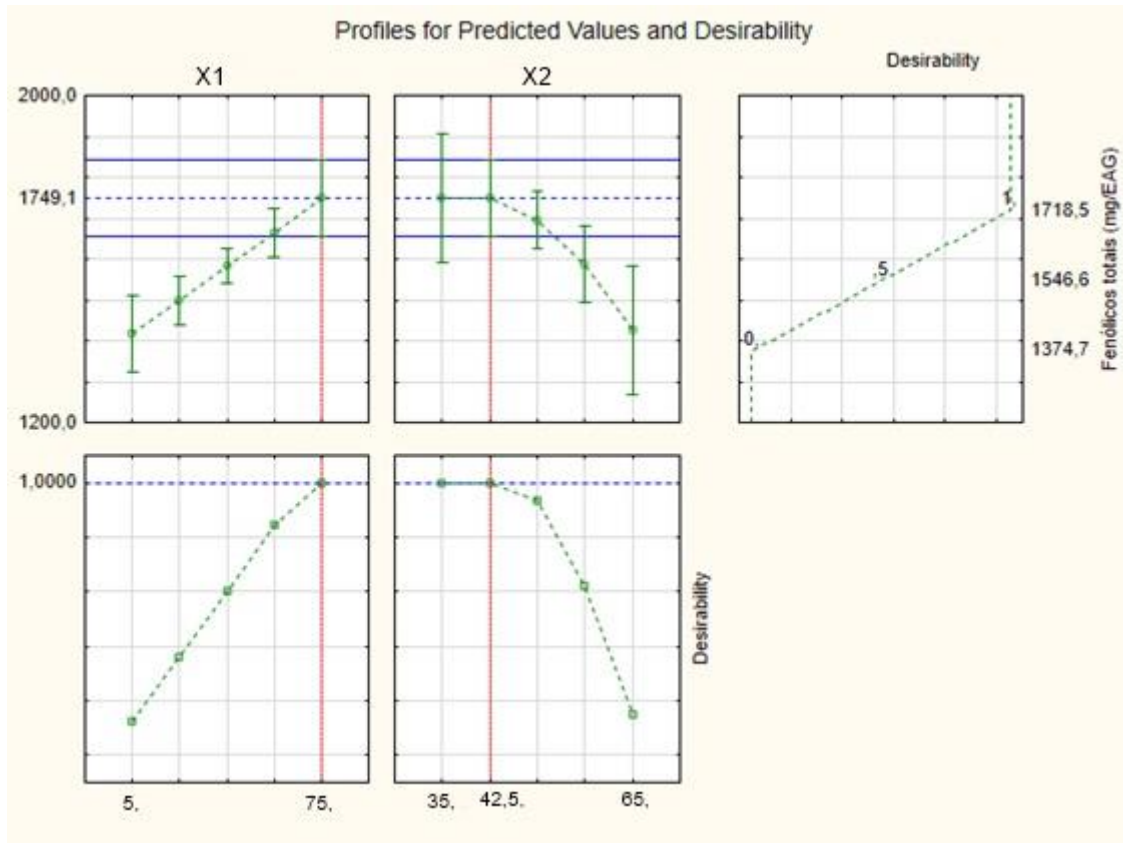


Figura 13: Otimização da extração assistida por ultrassom de fenólicos totais da farinha de sorgo (mg EAG/100 g de farinha de sorgo) na frequência de 45 kHz, X1 – tempo (min), X2 – temperatura (°C).

Na análise de regressão para a predição do teor de antocianinas totais para a frequência de 25 kHz observou-se na tabela 5, que o efeito linear do tempo (X_1) e da temperatura linear (X_2) assim como a interação entre o tempo e a temperatura (X_1X_2) foram significativos ($p \leq 0,05$) para a predição do conteúdo de antocianinas totais do extrato fenólico da farinha de sorgo. O efeito do tempo quadrático (X_1^2) foi significativo ($p < 0,05$) para o conteúdo de antocianinas totais nos extratos fenólicos da farinha de sorgo. Para a frequência de 45 kHz, os efeitos das variáveis independentes, efeito linear do tempo (X_1) e quadrático (X_1^2) e o efeito da temperatura linear (X_2) foram significativos ($p \leq 0,05$). O efeito da interação entre o tempo e a temperatura (X_1X_2) não foi significativo ($p > 0,05$) para o conteúdo de antocianinas totais do extrato fenólico da farinha de sorgo.

Tabela 5: Análise da regressão do DCCR para antocianinas totais (mg equivalente de luteolinidina/100 g de farinha de sorgo) nas frequências de 25kHz e 45kHz.

Variável	Frequência de 25 kHz		Frequência de 45 kHz	
	Coeficiente	Valor-p	Coeficiente	Valor-p
Constante	50,97280	0,000000	51,38840	0,000000
X₁	2,40538	0,008202	2,46910	0,003827
X₂	4,90769	0,000575	6,19615	0,000112
X₁²	-1,40321	0,056933	-2,22164	0,007210
X₂²	-0,77321	0,217893	0,35911	0,459815
X₁X₂	2,07675	0,040944	1,18000	0,111504

(X₁) Tempo; (X₂) Temperatura; (X_x²) Efeito quadrático e (X₁X₂) interação.

Os valores de R² ajustado dos modelos para predição e otimização do TA foram de 0,7706 e 0,9183 para as frequências de 25 kHz e 45 kHz, respectivamente. As equações de regressão do modelo final para TA dos extratos da farinha de sorgo obtidos na frequência de 25 kHz (Equação 5) e na de 45 kHz (Equação 6) são fornecidos.

$$Y_1(TA) = 50,43491 + 2,40538X_1 - 1,30236X_1^2 + 4,90769X_2 + 2,07675X_1X_2 \quad \text{Equação 5}$$

$$Y_2(TA) = 51,63922 + 2,4691X_1 - 2,24691X_1^2 + 6,19615X_2 + 1,18X_1X_2 \quad \text{Equação 6}$$

Pode-se observar pelas equações 5 e 6 que a temperatura teve relação linear positiva com os teores de antocianinas totais, na faixa empregada. A interação entre tempo e temperatura influenciaram positivamente no teor de TA. Os gráficos de superfície de resposta e contorno (Figura 14) para as duas frequências estudadas apresentaram semelhança no comportamento dos fatores para otimização da extração dos extratos fenólicos do sorgo. Maiores teores de antocianinas totais foram obtidos para tempos superiores a 60 minutos e temperatura acima de 50 °C, sendo o ponto de máximo a 75 minutos na temperatura de 65 °C. Isto indica o efeito da temperatura no aumento da solubilidade dos analitos no solvente que facilita sua difusão da matriz celular para outras regiões (Goula et al., 2017). A combinação do tempo de extração e da temperatura favoreceu a obtenção de extratos com maiores teores de antocianinas totais.

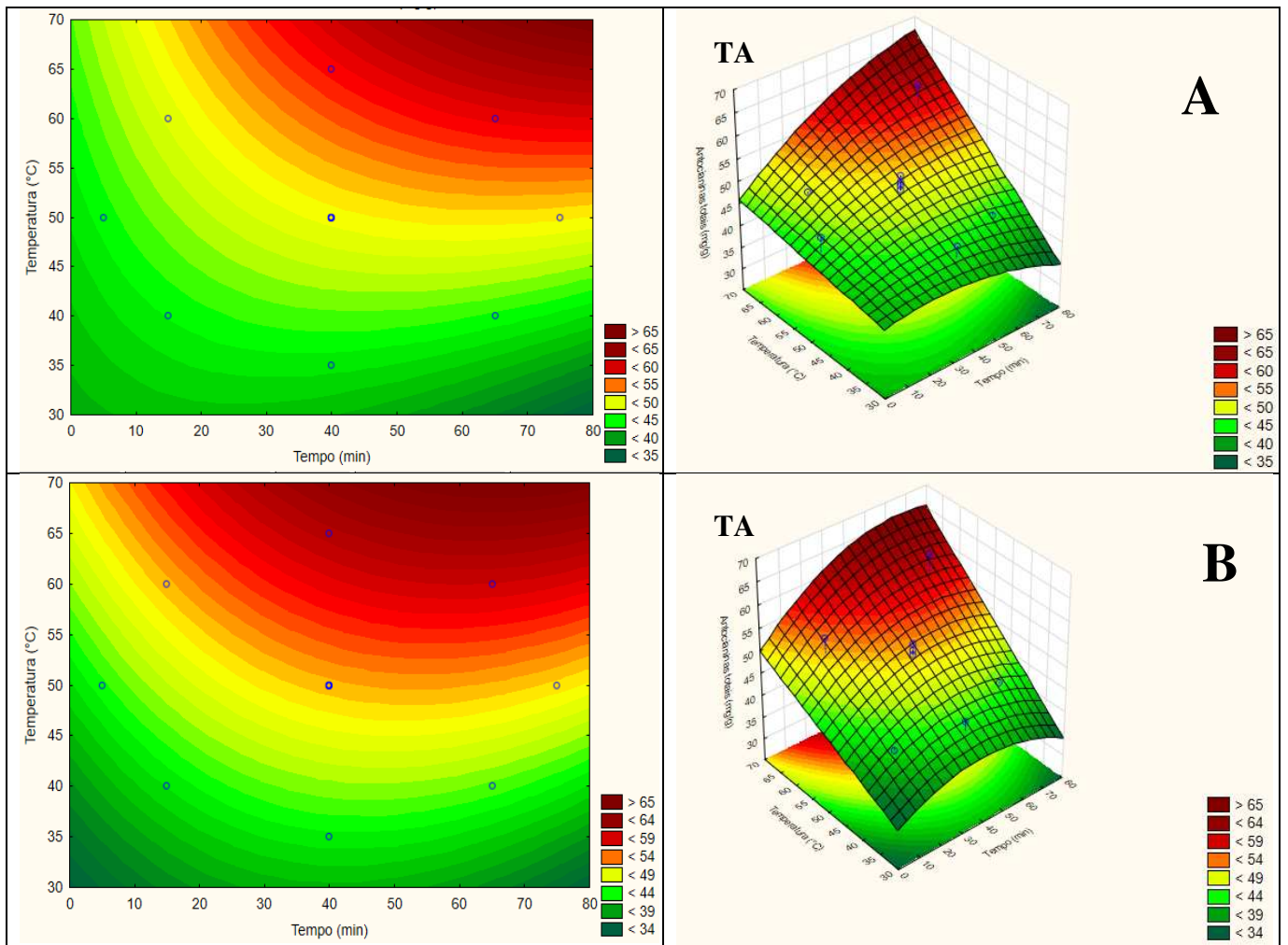


Figura 14: Curvas de superfície de resposta (coluna direita) e de contorno (coluna esquerda) do conteúdo de antocianinas totais (mg equivalente de luteolinidina/ 100g de farinha de sorgo) em função do tempo (minutos) e temperatura (°C) para a extração assistida pelo ultrassom da farinha de sorgo nas frequências de 25 kHz (A) e 45 kHz (B).

O rendimento ótimo para o conteúdo de antocianinas totais, na frequência de 25 kHz, pode ser alcançado no tempo de 75 minutos e na temperatura de 65°C, predizendo um conteúdo de 62,326 mg equivalente de luteolinidina/100 g de farinha de sorgo, obtendo um valor experimental de 59,467 mg equivalente de luteolinidina/100g de farinha de sorgo (Figura 15), com um erro percentual de 4,58%. Para o extrato obtido na frequência de 45 kHz, o ponto ótimo foi alcançado no tempo de 57,5 minutos com temperatura de 65°C, predizendo um conteúdo de 62,194 mg equivalente de luteolinidina/ 100 g de farinha de sorgo, obtendo-se um valor experimental de 57,819 mg equivalente de luteolinidina/ 100g de farinha de sorgo (Figura 16) com erro percentual de 7,03%.

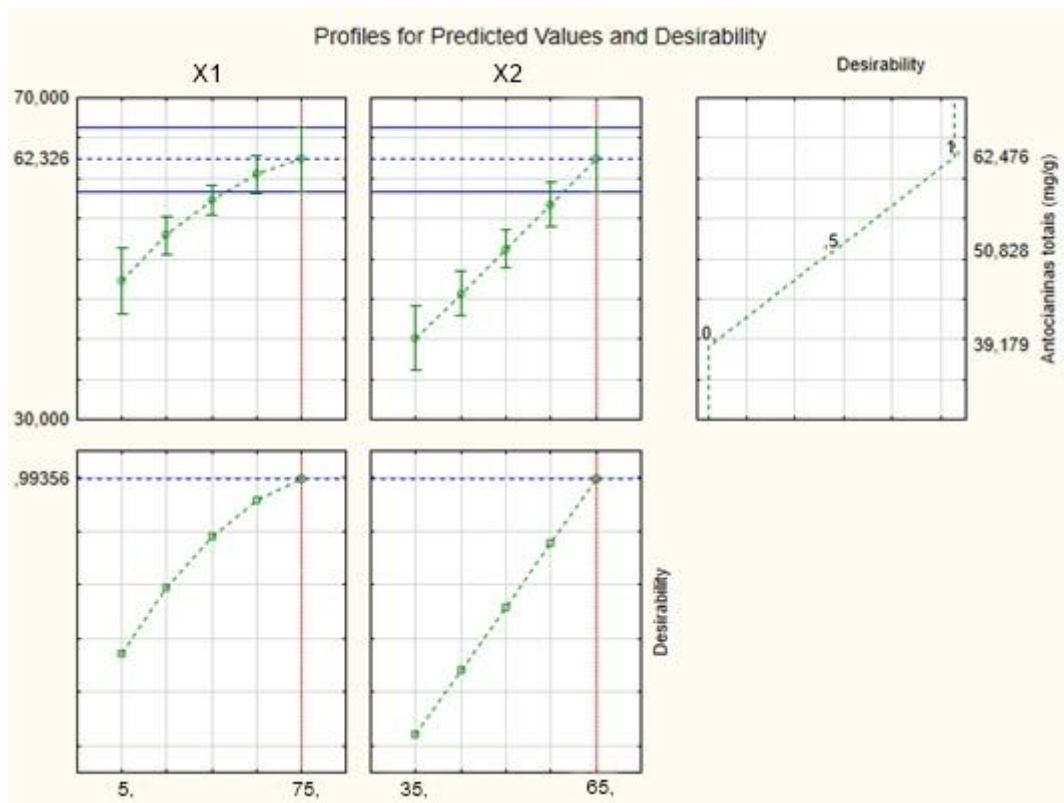


Figura 15: Otimização da extração assistida por ultrassom de antocianinas totais da farinha de sorgo (mg equivalente de luteolinidina/100 g de farinha de sorgo) na frequência de 25 kHz, X1 – tempo (min), X2 – temperatura (°C).

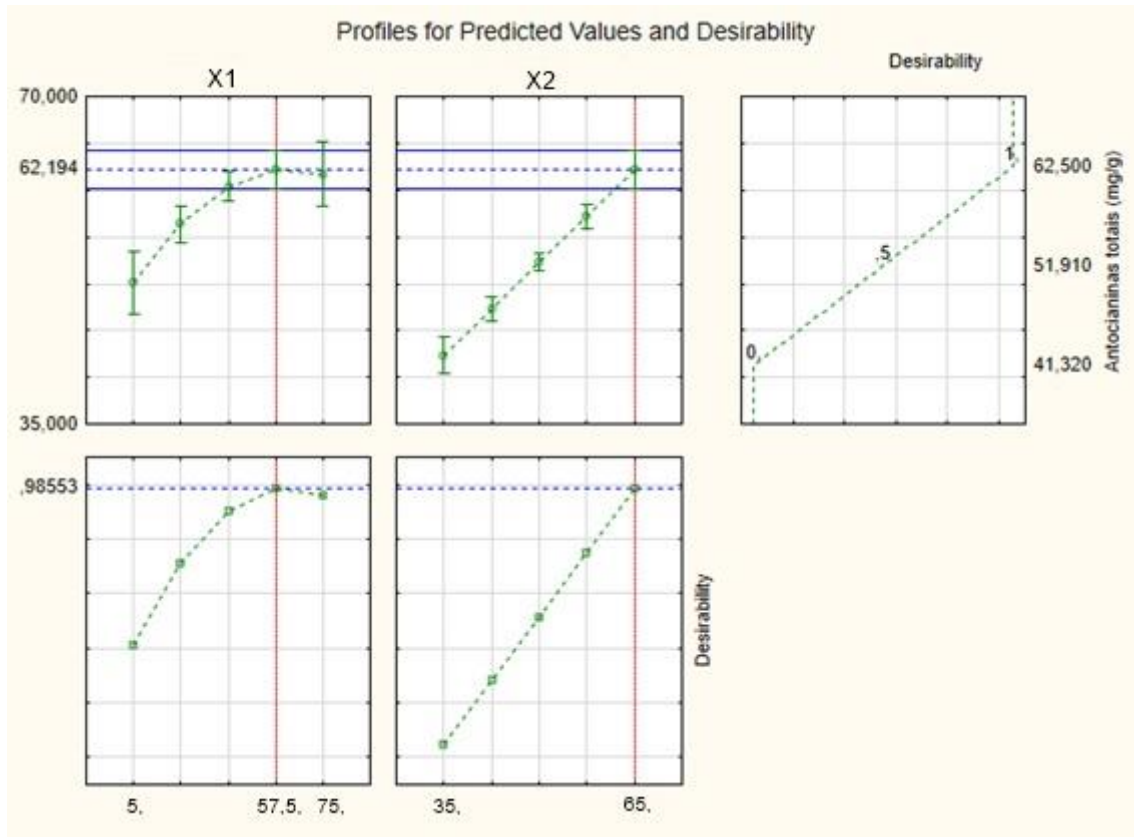


Figura 16: Otimização da extração assistida por ultrassom de antocianinas totais da farinha de sorgo (mg equivalente de luteolinidina/100 g de farinha de sorgo) na frequência de 45 kHz, X1 – tempo (min), X2 – temperatura (°C).

5.2. ESTUDO COMPARATIVO DOS MÉTODOS APLICADOS

A análise comparativa entre o processo de extração convencional e a EAU otimizada é mostrada nas figuras 17 e 18. Para o método de EAU, a condição ótima de rendimento de antocianinas totais na frequência de 25 kHz foi para o tempo de 65 minutos e temperatura de 65 °C. Para a frequência de 45 kHz o rendimento ótimo de antocianinas totais foi alcançado no tempo de 57,5 minutos com temperatura de 65 °C, ambos com poder ultrassônico de 50% W.

A EAU aumentou o rendimento da extração de antocianinas totais de forma significativa ($p < 0,05$) da farinha de sorgo preto nas frequências de 25 kHz e 45 kHz, com valores médios de 59,47 mg e 57,82 mg equivalente de luteolinidina/100g de farinha de sorgo, respectivamente, quando comparado com 45,41 mg equivalente de luteolinidina/100g de farinha de sorgo obtidos pelo método convencional (Figura 17).

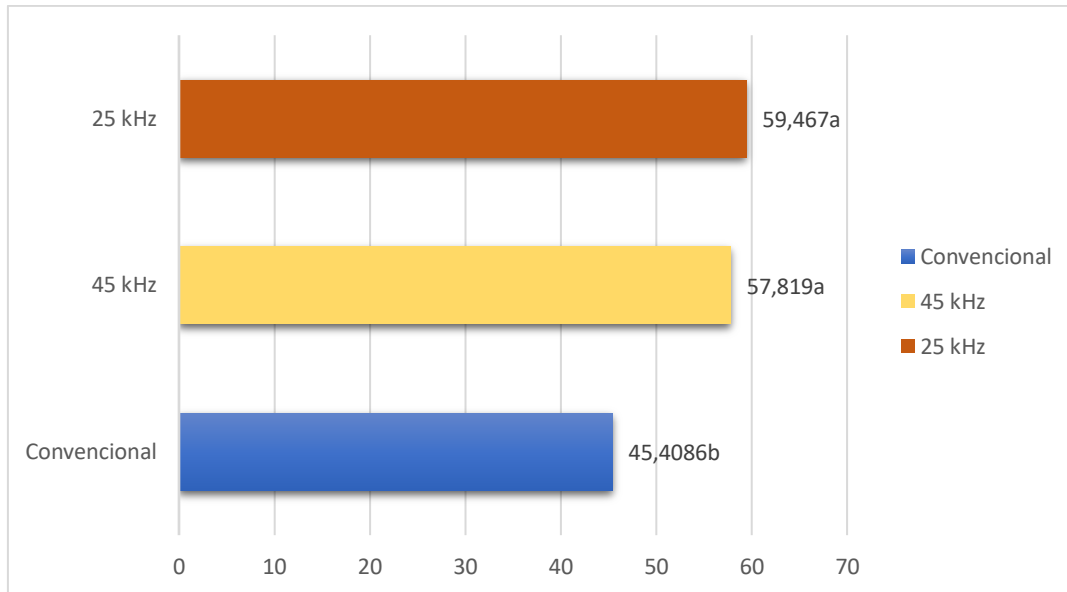


Figura 17. Comparação da EAU e extração convencional sobre os conteúdos de antocianinas totais (mg equivalente de luteolinidina/100 g de farinha de sorgo), na frequência de 25 kHz e 45kHz. Letras diferentes indicam que as amostras diferem significativamente entre si a 5% no teste de Tukey.

Para a combinação ótima das variáveis estudadas na frequência de 45 kHz, no tempo de 75 minutos e na temperatura de 42,7°C, com um poder ultrassônico fixado em 50% W, observa-se que, na figura 18, a EAU aumentou o rendimento da extração de fenólicos totais, de forma significativa ($p < 0,05$), com valores de 1601,44 mg EAG/ 100 g de farinha de sorgo, quando comparados com 1518,87 mg EAG/ 100g de farinha de sorgo, obtidos pela extração convencional. Na frequência de 25 kHz, o conteúdo de fenólicos totais obtido experimentalmente foi superior (1628,11 mg EAG/100 g de farinha de sorgo) quando comparado com o valor obtido pela extração convencional (1518,87 mg EAG/100 g).

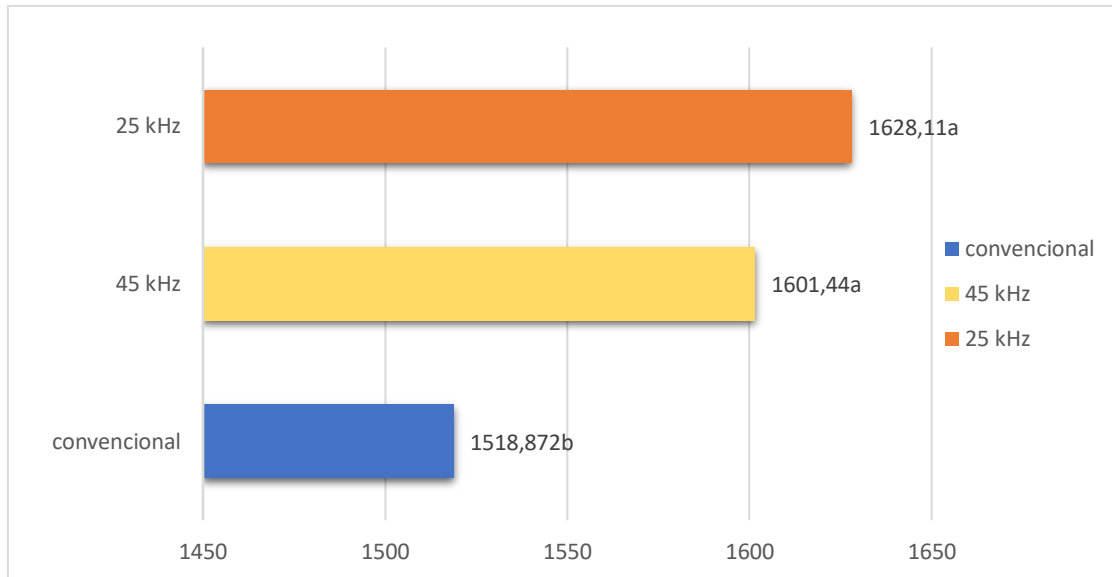


Figura 18. Comparação da EAU e extração convencional sobre os conteúdos de fenólicos totais (mg de EAG/100 g de farinha de sorgo), na frequência de 25 kHz e 45kHz. Letras diferentes indicam que as amostras diferem significativamente entre si a 5% no teste de Tukey.

Desta forma, na frequência de 25 kHz, foi possível obter um extrato rico em antocianinas e fenólicos totais não diferindo da extração a 45 kHz ($p > 0,05$), sendo superiores ao tratamento convencional. Isto mostra que os efeitos gerados pelas frequências ultrassônicas, causam a ruptura das paredes celulares do grão, através das bolhas de cavitação formadas na superfície da matriz sólida que se colapsam, aumentando a transferência de massa entre o solvente e o material experimental (Chemat et al., 2011; Rojas et al., 2021).

As duas frequências (25 e 45 kHz) tiveram um efeito positivo nos rendimentos de extração de antocianinas totais e compostos fenólicos da farinha de sorgo. Observou-se a eficiência da extração assistida por ultrassom, em que o rendimento de antocianinas totais aumentou em $>30\%$ e $>27\%$, respectivamente nas frequências de 25 kHz e 45 kHz, quando comparado com o convencional. E um aumento no rendimento de fenólicos totais de $>10\%$, $>5\%$ no extrato obtido na frequência de 25 e 45 kHz, comparado com o convencional. Sendo assim, a EUA torna-se eficiente no tempo de extração, ou seja, 75 minutos foram necessários para extrair os compostos fenólicos em comparação a 120 minutos utilizados pelo método convencional, com redução de 62,5% do tempo de extração.

A capacidade antioxidante determinada pelos métodos ABTS e DPPH dos extratos obtidos pelas combinações ótimas para maximizar o teor de antocianinas totais foram de $1201,5 \pm 1,27$ e $1015,87 \pm 1,75$ $\mu\text{M TE/g}$ de farinha de sorgo para a frequência de 45 kHz e $1210,87 \pm 1,01$ e $1101,87 \pm 0,74$ $\mu\text{M TE/g}$ de farinha de sorgo para a frequência de 25 kHz,

comparadas com o método convencional $916,37 \pm 1,42$ e $812,5 \pm 0,5$ $\mu\text{M TE/ g}$ de farinha de sorgo, respectivamente (Figuras 18 e 19). Para a condição ótima para obtenção de fenólicos totais na frequência de 45 kHz, a capacidade antioxidante foi de $1062,5 \pm 1,59$ $\mu\text{M TE/ g}$ de farinha de sorgo pelo método ABTS (Figura 19) e $883,75 \pm 0,94$ $\mu\text{M TE/ g}$ de farinha de sorgo pelo método DPPH (Figura 20).

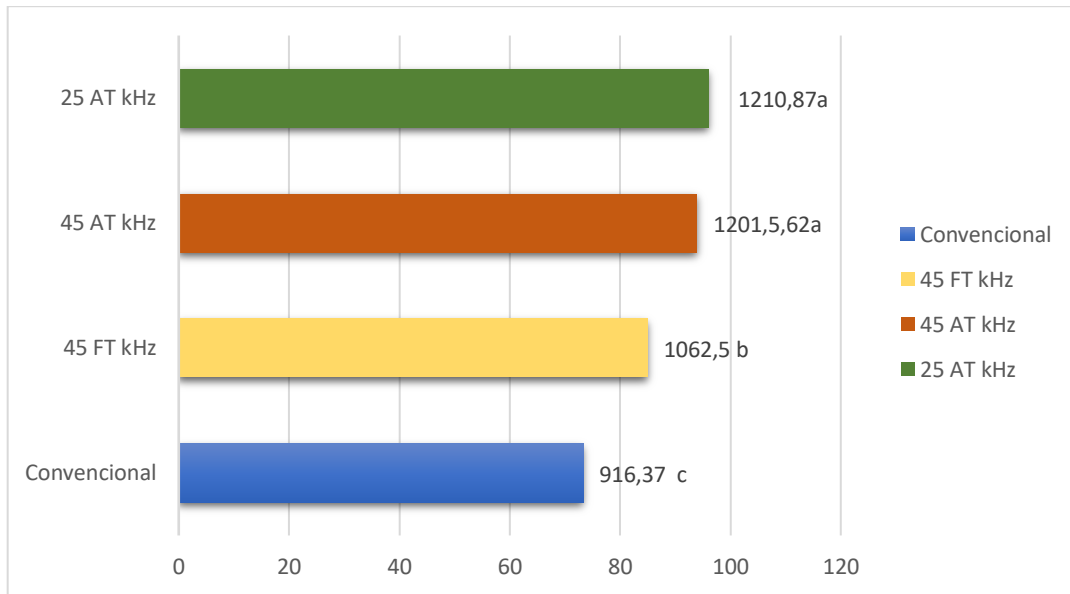


Figura 19. Comparação da EAU e extração convencional sobre a capacidade antioxidante (μM de TE/mL de extrato) pelo método ABTS, na frequência de 25 kHz e 45kHz, para as condições ótimas de extração de antocianinas totais (AT) e fenólicos totais (FT). Letras diferentes indicam que as amostras diferem significativamente entre si a 5% no teste de Tukey.

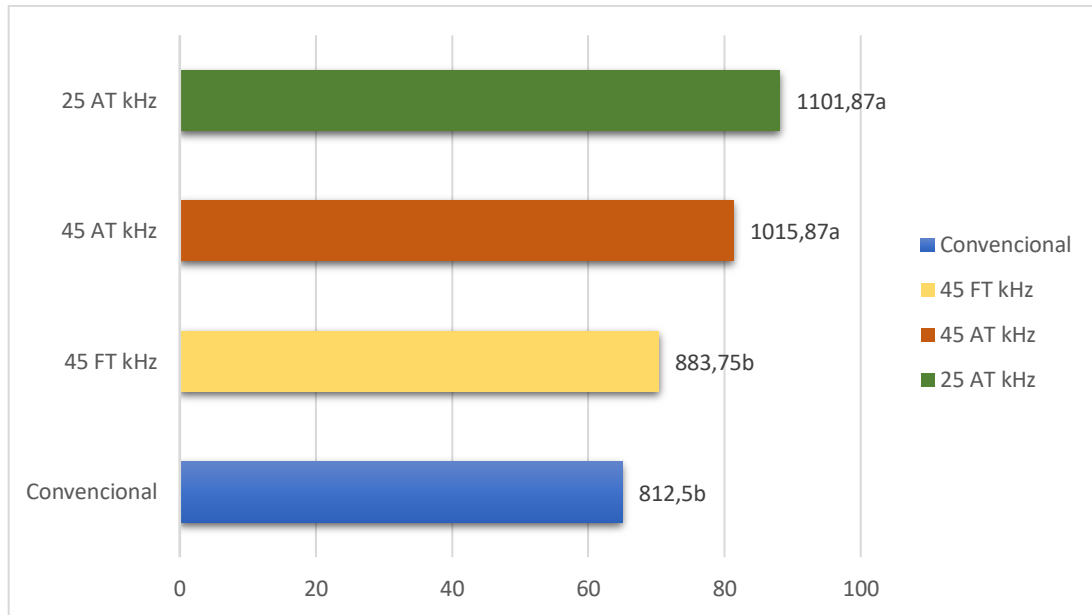


Figura 20. Comparação da EAU e extração convencional sobre a capacidade antioxidante (μM de TE/mL de extrato) pelo método DPPH, na frequência de 25 kHz e 45kHz, para as condições ótimas de extração de antocianinas totais (AT) e fenólicos totais (FT). Letras diferentes indicam que as amostras diferem significativamente entre si a 5% no teste de Tukey.

Observou-se um aumento da capacidade antioxidante pelo método ABTS e DPPH em >30% e >35%, >28% e >25%, respectivamente nas frequências de 25 kHz e 45 kHz na condição ótima (tempo e temperatura) para a obtenção do teor de antocianinas totais, quando comparado com o convencional. E um aumento na capacidade antioxidante para a condição ótima de obtenção de fenólicos totais de >15% e >8% pelos métodos ABTS e DPPH, obtido na frequência de 45 kHz, comparado com o convencional.

Nas condições ótimas de extração das antocianinas totais e dos fenólicos totais nas frequências de 25 e 45kHz, o emprego do ultrassom influenciou positivamente para o aumento da capacidade antioxidante dos extratos, devido ao aumento do rendimento na extração dos compostos fenólicos. Isso implica que o método assistido pelo ultrassom é um método mais poderoso do que o método convencional na extração de antioxidantes de sorgo.

A temperatura elevada aplicada nos tratamentos utilizando o ultrassom (42,5 a 65°C) também teve efeito positivo na obtenção de extratos com alta atividade antioxidante. Além disso, as duas frequências contribuíram com o aumento da extração de antocianinas totais e fenólicos totais, o que se resultou também numa maior capacidade antioxidante nos extratos, já que estes compostos estão diretamente relacionados ao potencial antioxidante (Awika et al.,

2004). Portanto, o ultrassom se mostrou uma alternativa promissora para obtenção de extratos ricos em compostos com alto potencial antioxidante.

5.3. AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO E DA ESTABILIDADE CINÉTICA DAS ANTOCIANINAS NOS EXTRATOS DE SORGO

5.3.1. ALTERAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DAS 3-DESOXIANTOCIANINAS

As concentrações das 3-desoxiantocianinas foram determinadas nos extratos obtidos dos 5 tratamentos aplicados. A escolha dos tratamentos foi referente aos pontos ótimos para maximizar o teor de antocianinas totais nas frequências de 25 kHz (ULTRA1) (65°C, 75 minutos) e 45 kHz (ULTRA2) (65°C, 57,5 minutos), e a condição ótima obtida para obtenção de fenólicos totais na frequência de 45kHz (ULTRA3) (42,5°C, 75 minutos). Para avaliar o efeito da frequência ultrassônica de 25kHz no tratamento obtido pela combinação ótima de antocianinas totais, um tratamento (ULTRA 4) (50°C, 75 minutos) foi escolhido para comparação, com temperaturas e tempo próximo do ponto ótimo de antocianinas totais. O método convencional (CONV) também foi escolhido para ser aplicado. Após a extração, foram retiradas amostras dos extratos para avaliação da concentração das 3-desoxiantocianinas durante o tempo, nos dias 0 (dia inicial em que foi obtido os extratos do sorgo), 15, 30 e 45 dias corridos, respectivamente. Os extratos foram armazenados na ausência de luz e em temperatura ambiente (25°C).

Os resultados dos teores de 3-desoxiantocianinas totais, luteolinidina, apigeninidina, 5-metoxi luteolinidina e 7-metoxi apigeninidina nas amostras de extratos de sorgo são mostrados na tabela 6 . A apigeninidina foi a principal 3-DXA encontrada. Observou-se no início do armazenamento (tempo zero) que os teores de luteolinidina, 5-metoxi luteolinidina e 7-metoxi apigeninidina foram muito superiores nos tratamentos aplicados utilizando o ultrassom, o que era esperado, uma vez que foi demonstrado neste estudo que a extração de fenólicos totais e antocianinas totais por ultrassom foi mais eficiente do que o método convencional.

Tabela 6: Concentração inicial e final das 3-desoxiantocianinas e das antocianinas totais, expressos em $\mu\text{g/g}$ farinha de sorgo, obtidas dos extratos pelos métodos convencional e assistido pelo ultrassom.

Tratamentos	Luteolinidina		Apigeninidina		5 – Metoxi Luteolinidina		7 – Metoxi Apigeninidina		Antocianinas Totais	
	C _o	C _f	C _o	C _f	C _o	C _f	C _o	C _f	C _o	C _f
CONV	27,04±1,36b	25,65±1,65a	165,67±3,45a	117,83±3,68a	6,70±0,29b	7,68±0,27a	46,93±1,95b	21,30±0,76a	48,14±0,87b	45,86±0,34a
ULTRA 1	29,42±0,37a	23,23±0,28a	162,43±0,8a	106,24±2,05a	15,05±0,5a	6,39±0,19a	73,31±2,16a	16,28±0,05b	58,11±1,21a	52,74±1,87a
ULTRA 2	30,30±0,37a	23,57±0,63a	161,5±1,56a	105,51±1,75a	12,91±0,68a	5,85±0,45a	66,29±2,13a	17,60±0,18a	56,64±0,37a	49,91±0,76a
ULTRA 3	30,18±0,44a	23,35±0,16a	158,07±2,91a	108,57±1,04a	11,57±0,31a	4,65±0,32b	64,59±0,77a	19,66±0,56a	53,56±0,33a	50,81±0,60a
ULTRA 4	27,41±0,78b	22,50±0,84b	154,68±2,28a	105,46±2,92a	8,94±0,19b	6,68±0,1a	50,10±2,1b	18,76±0,27a	51,09±1,01a	45,49±0,76a

Co: Concentração inicial ($\mu\text{g/g}$ de farinha de sorgo); Cf: Concentração final; AT: antocianinas totais; FT: fenólicos totais; CONV: método convencional (Temperatura ambiente e 120 minutos); ULTRA1: 25 kHz (65°C e 75 minutos); ULTRA2: 45 kHz (65°C e 57,5 minutos); ULTRA3: 45 kHz (42,5°C e 75 minutos); ULTRA4: 25 kHz (50°C e 75 minutos). Letras diferentes, nas colunas, indicam que as amostras diferem significativamente entre si a 5% no teste de Tukey.

Observou-se que não houve diferença significativa na concentração inicial (C_0) de apigeninidina entre os tratamentos (Tabela 6). Porém, foi observado maiores concentrações de luteolinidina, 5 – Metoxi luteolinidina e 7 – metoxi apigeninidina nos tratamentos ULTRA 1, ULTRA 2 e ULTRA 3, comparados com o tratamento convencional (CONV). Isto mostra a eficiência do ultrassom em promover o aumento da concentração das 3-DXAs, compostos antioxidantes, devido ao aumento da transferência de massa do solvente e na modificação da estrutura da matriz celular dos grãos de sorgo provocado pelas ondas ultrassônicas (Rojas et al., 2021).

Ao final do tempo de armazenamento, 45 dias, observou-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para as concentrações finais (C_f) de apigeninidina e das antocianinas totais entre os tratamentos estudados (Tabela 6). As reduções na concentração da apigeninidina durante os 45 dias nos tratamentos CONV, ULTRA 1, ULTRA 2, ULTRA 3 e ULTRA 4 foram 28,87%, 34,59%, 34,66%, 31,31% e 31,82%, respectivamente. Dessa forma, foi demonstrado que houve pouca diferença na estabilidade das antocianinas totais entre os tratamentos aplicados comparado com o método convencional.

Após 45 dias de armazenamento, as reduções na concentração de luteolinidina nos tratamentos CONV, ULTRA 1, ULTRA 2, ULTRA 3 e ULTRA 4 foram 5,14%, 21,04%, 22,21%, 22,63% e 17,91%, respectivamente. As reduções nas concentrações de luteolinidina foram menores quando comparado com as reduções em apigeninidina, demonstrando uma maior estabilidade cinética da luteolinidina. Os tratamentos ULTRA 1, ULTRA 2 e ULTRA 3 foram mais eficientes para extração da luteolinidina, porém, o extrato obtido pelo tratamento ULTRA 4 (25 kHz, 50°C por 75 minutos) demonstrou ter melhor estabilidade entre os tratamentos com ultrassom após 45 dias de armazenamento. Ojwang & Awika (2008) demonstraram que a luteolinidina foi a 3-DXA mais estável a reações de oxidação. Reações como oxidação, pirólise, reação com radical livre e interações com outros compostos podem acontecer devido ao método de ultrassom, que pode causar redução nos teores de compostos bioativos, incluindo os compostos fenólicos (Rojas et al. 2021).

As concentrações de 5-metoxi luteolinidina reduziram após 45 dias de armazenamento em 57,54% (ULTRA 1), 54,69% (ULTRA 2), 59,81% (ULTRA 3) e 25,27% (ULTRA 4). Como aconteceu com a luteolinidina, o tratamento ULTRA 4 foi o que conferiu melhor estabilidade e menor extração das 5-metoxi luteolinidina entre os tratamentos com ultrassom. De acordo com a tabela 6, não houve diferença significativa para a concentração final da 5-metoxi luteolinidina entre os tratamentos, apenas para o tratamento ULTRA 3, onde a

degradação foi maior. Entretanto, para a concentração inicial, os tratamentos ULTRA1, ULTRA2 e ULTRA3 tiveram diferença significativa em comparação com o método CONV, em que mais que o dobro da concentração de 5-metoxi luteolinidina foi encontrado. Esse resultado demonstra que o ultrassom foi mais eficiente na extração dessas 3-DXAs. Porém, a estabilidade da 5-metoxi luteolinidina foi menor comparado com a luteolinidina.

Observou-se que a 7- metoxi-apigeninidina apresentou-se menos estável que a apigeninidina, com uma redução de 54,61% (CONV), 77,79% (ULTRA 1), 73,45% (ULTRA 2), 69,56% (ULTRA 3) e 62,55% (ULTRA 4), em relação a sua concentração inicial. Como observado na tabela 6, a concentração inicial das 7- metoxi apigeninidina também apresentou diferença significativa entre os tratamentos ULTRA1, ULTRA2, ULTRA3 comparados com o tratamento CONV. Os tratamentos otimizados pelo ultrassom aumentaram o rendimento inicial das 7- metoxi apigeninidina em mais de 39% nos extratos obtidos. Também se observou que a degradação de 7- metoxi apigeninidina foi acelerada nos extratos obtidos pelo ultrassom. Yang et al. (2014) demonstraram que as 3-DXAs metoxiladas (5-metoxi luteolinidina e 7- metoxi apigeninidina) são menos estáveis, com destaque a estabilidade ao calor, comparado com as 3-DXAs não metoxiladas. A redução na concentração das 3-DXAs totais variou de 4,73% (CONV) até 11,88% (ULTRA 2).

Oliveira et al. (2017) avaliaram a estabilidade das 3-DXAs em farinhas de sorgo armazenadas em diferentes temperaturas (4, 25 e 40°C) por 180 dias e demonstraram que houve retenções de 77,9% de luteolinidina, 71,4% de apigeninidina, 72,3% de 5-metoxiluteolinidina e 69,0% de 7-metoxiapigeninidina. A maior porcentagem de degradação aconteceu nos primeiros 60 dias de armazenamento. Apesar dos autores terem estudado farinhas, produto com baixa atividade de água, valores semelhantes de degradação de algumas 3-DXAs foram observados quando comparado com nosso estudo, onde foram utilizados extratos, com alta atividade de água, que favorece as reações químicas. Esse fato demonstra o grande potencial de utilização do método do ultrassom para obtenção de extratos fenólicos de farinha de sorgo, ricos em 3-DXAs, sua utilização na indústria de alimentos, devido também a grande redução de tempo de extração.

5.3.2. CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DAS 3-DESOXIANTOCIANINAS

Os resultados da cinética de degradação das 3-DXAs estão apresentados na tabela 7. Os valores da constante de degradação (k) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) das 3-DXAs apresentaram diferença significativa para os tratamentos utilizando o método convencional ou o EAU. Os

gráficos representados no anexo A, mostram o perfil de degradação das 3-desoxiantocianinas e das antocianinas totais.

Os teores de luteolinidina e a apigeninidina não variaram significativamente entre os tratamentos com a aplicação do EAU, apenas em comparação com o método convencional. Para a cinética de degradação das antocianinas totais, a constante de degradação (k) foi menor para a luteolinidina, ou seja, foi a que menos se degradou em reação aos parâmetros avaliados. A 5-Metoxi luteolinidina e a 7-Metoxi Apigeninidina apresentaram maiores valores de k . Essas informações corroboram os resultados já discutidos no item 5.3.1, em que foi demonstrado que a luteolinidina apresentou melhor estabilidade cineticamente. Além disso, o método ULTRA 4 foi o que menos influenciou na degradação das 3-DXAs.

Tabela 7: Cinética de degradação das antocianinas totais e das 3-DXAs em extrato fenólico de sorgo durante os 45 dias de armazenamento em ausência de luz.

Tratamentos	Luteolinidina		Apigeninidina		5 – Metoxi Luteolinidina		7 – Metoxi Apigeninidina		Antocianinas Totais	
	k	t _{1/2} (dias)	k	t _{1/2} (dias)	k	t _{1/2} (dias)	k	t _{1/2} (dias)	k	t _{1/2} (dias)
CONV	0,0009 ±0,0007a	787,66±13,8a	0,007 ±0,0008a	91,2±10,6a	0,001 ±0,004a	726,15±5,38a	0,019 ±0,008a	36,53±1,32a	0,001 ±0,0005a	1101,91±29a
ULTRA 1	0,005 ±0,0005b	133,29±19,2b	0,009 ±0,0005b	72,96±4,49b	0,018 ±0,00008b	36,74±0,24b	0,033 ±0,0007b	21,62±0,88b	0,003 ±0,0007a	262,64±27,6a
ULTRA 2	0,006 ±0,0007b	123,77±15,06b	0,009 ±0,0004b	73,73±3,51b	0,017 ±0,001b	39,36±3,8b	0,029 ±0,0007b	23,56±0,59b	0,003 ±0,0003a	267,21±34a
ULTRA 3	0,006 ±0,0001b	119,50±3,51b	0,008 ±0,0004b	82,51±3,94b	0,0141 ±0,0007b	32,18±1,17b	0,027 ±0,0006b	25,71±0,63b	0,001 ±0,0001a	511,63±18,8a
ULTRA 4	0,004 ±0,0004b	161,21±18,93b	0,008 ±0,0002b	81,55±2,65b	0,007 ±0,001b	70,65±32,0b	0,022 5±0,001a	30,86±1,34a	0,003 ±0,0007a	275,64±16,3a

k: constante de degradação; t_{1/2} (dias): tempo de meia vida; CONV: método convencional (Temperatura ambiente e 120 minutos); ULTRA1: 25 kHz (65°C e 75 minutos); ULTRA2: 45 kHz (65°C e 57,5 minutos); ULTRA3: 45 kHz (42,5°C e 75 minutos); ULTRA4: 25 kHz (50°C e 75 minutos). Letras diferentes, nas colunas, indicam que as amostras diferem significativamente entre si a 5% no teste de Tukey.

6. CONCLUSÃO

A aplicação do método assistido pelo ultrassom (EAU) possibilitou a otimização das variáveis estudadas para a extração de antocianinas totais e compostos fenólicos totais de grãos de sorgo, pela metodologia de superfície de resposta e o delineamento em Composto Central Rotacional.

Na frequência de 25 kHz, a combinação ótima para a variável antocianinas totais foi em 75 min e 65 °C, proporcionando o aumento na recuperação de antocianinas de >30%, quando comparada com a extração convencional. Na frequência de 45 kHz, a melhor combinação ocorreu no tempo de 57,5 min e na temperatura de 65 °C, aumentando em >27% a recuperação de antocianinas, quando comparada com a extração convencional. O rendimento ótimo de fenólicos totais para a frequência de 45kHz, ocorreu no tempo de 75 min e 42,5 °C, promovendo um aumento de >5% na recuperação destes compostos, quando comparada com a extração convencional. Para a frequência de 25 kHz houve um aumento de >10% na recuperação destes compostos pela combinação ótima de antocianinas totais, quando comparada a extração convencional.

No estudo da estabilidade cinética dos extratos obtidos pelo método ultrassônico mostraram que a EAU aumentou o rendimento das antocianinas totais, resultando na obtenção de extratos ricos em capacidade antioxidante e com uma redução de 62,5% do tempo de extração. Porém, o método afetou a estabilidade destes compostos comparados com método convencional. A luteolinidina, a apigeninidina e seus metoxilados apresentaram mais estáveis no extrato obtido pelo método convencional.

Desta forma, o estudo indica que a utilização da extração assistida por ultrassom para compostos fenólicos a partir dos grãos de sorgo é uma metodologia eficiente para o aumento de rendimento das antocianinas totais, mas pode influenciar na estabilidade das 3-desoxiantocianinas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6182–6187. <https://doi.org/10.1021/jf0205099>
- Amchova, P., Kotolova, H., & Ruda-Kucerova, J. (2015). Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(3), 914–922. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.026>
- Anunciação, P. C., Cardoso, L. de M., Alfenas, R. de C. G., Queiroz, V. A. V., Carvalho, C. W. P., Martino, H. S. D., & Pinheiro-Sant’Ana, H. M. (2019). Extruded sorghum consumption associated with a caloric restricted diet reduces body fat in overweight men: A randomized controlled trial. *Food Research International*, 119(October 2018), 693–700. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.048>
- Anunciação, P. C., Cardoso, L. de M., Gomes, J. V. P., Della Lucia, C. M., Carvalho, C. W. P., Galdeano, M. C., ... Pinheiro-Sant’Ana, H. M. (2017). Comparing sorghum and wheat whole grain breakfast cereals: Sensorial acceptance and bioactive compound content. *Food Chemistry*, 221, 984–989. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.065>
- ANVISA. (1988). *Resolução CN/MS nº04, de 24 de novembro de 1988 (*)*. 1988. Retrieved from http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/04_cns.pdf/a85ab159-9cc5-41b8-9ee1-512af02d1a10
- Arbex, P. M., Moreira, M. E. de C., Toledo, R. C. L., de Moraes Cardoso, L., Pinheiro-Sant’ana, H. M., Benjamin, L. dos A., ... Martino, H. S. D. (2018). Extruded sorghum flour (*Sorghum bicolor* L.) modulate adiposity and inflammation in high fat diet-induced obese rats. *Journal of Functional Foods*, 42(May 2017), 346–355. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.01.010>
- Awika, J. M. (2008). Behavior of 3-deoxyanthocyanidins in the presence of phenolic copigments. *Food Research International*, 41(5), 532–538. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.03.002>
- Awika, J. M. (2014). Sorgo : a sua única nutricional e Atributos Promotoras de Saúde. In *Gluten-Free Ancient Grains*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100866-9/00003-0>
- Awika, J. M., Rooney, L. W., & Waniska, R. D. (2004). Properties of 3-deoxyanthocyanins from sorghum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4388–4394. <https://doi.org/10.1021/jf049653f>
- Awika, J. M., Rooney, L. W., & Waniska, R. D. (2005). Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 90(1–2), 293–301.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.058>

Akogou F.U.G., Kayodé, A.P.P., den Besten, H.M.W., Linnemann, A.R., Fogliano, V. (2018). Effects of processing and storage on the stability of the red biocolorant apigeninidin from sorghum. *Food science & technology*, 2018-04, Vol.90, p.592-597. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.12.071

Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A. S., & Orlie, V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 49, 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.006>

Barbosa, M. P., Rigolon, T. C. B., Borges, L. L. R., QUEIROZ V. A. V., Stringheta P. C., de Barros, F. A. R. Effect of light, food additives and heat on the stability of sorghum 3-deoxyanthocyanins in model beverages. *International Journal of Food Science & Technology*. 56(9):4746-4755, September 2021. <https://doi-org.ez35.periodicos.capes.gov.br/10.1111/ijfs.15123>

Barros, F., Dykes, L., Awika, J. M., & Rooney, L. W. (2013). Accelerated solvent extraction of phenolic compounds from sorghum brans. *Journal of Cereal Science*, 58(2), 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.05.011>.

Bevilacqua, A., Petruzzi, L., Perricone, M. et al. (2018). Nonthermal technologies for fruit and vegetable juices and beverages: Overview and advances. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, 2–62.

Bobbio, F.A. *Introdução à química de alimentos*. 2.ed. São Paulo: Varela, 1992. 234 p.

Brand-Williams, W. et al. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, London, 28 (1), 25-30

Brouillard, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.) *Anthocyanins as food colors*. New York: Academic Press, 1982. p. 1-39.

Cardoso, L. D. M., Montini, T. A. et al. (2014). Effects of processing with dry heat and wet heat on the antioxidant profile of sorghum. *Food Chemistry*, 152, 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.106>

Cardoso, L., Viana Leite, J., & Gouveia Peluzio, M. (2011). Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico. *Revista Colombiana de Ciências Químico - Farmacéuticas*, 40(1), 116–138.

Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science and Technology*, 45(2), 284–295. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.007>

Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2012). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, 732, 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.032>

Cavalcanti, R. N., Santos, D. T., & Meireles, M. A. A. (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. *Food Research International*, 44(2), 499–509. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.007>

Corrales, M., Toepfl S., Butz P., Knorr D., Tauscher B. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(1), 85–91.

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>

Chemat, F., Zill-E-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813–835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>

Chen, F. et al. (2007). Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(6), 767–778. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2006.12.011>

Ciacci, C., Maiuri, L., Caporaso, N., Bucci, C., Del Giudice, L., Rita Massardo, D., ... Londei, M. (2007). Celiac disease: In vitro and in vivo safety and palatability of wheat-free sorghum food products. *Clinical Nutrition*, 26(6), 799–805. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2007.05.006>

CONAB. (2022). Indicadores da Agropecuária. Observatório Agrícola, Boletim de safra de grãos 8º Levantamento (21/22). <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/gaos/boletim-da-safra-de-graos>

Constant, P. B. L. (2003). Extração, caracterização e aplicação de antocianinas de açaí (*Euterpe oleracea*, M.). 183.

Constant, P. B. L., Stringheta, P. C., & Sandi, D. (2002). Corantes Alimentícios. *Boletim Do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 20(2), 203–220. <https://doi.org/10.5380/cep.v20i2.1248>

Coultrate, T. P. (2004). *Alimentos: a química de seus componentes*. 3ª Edição. Porto Alegre. 349p.

Damodaran, S., Parkin, K. L. (2019). *Química de Alimentos de Fennema*. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed.1104p.

de Pascual-Teresa, S., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2010). Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1679–1703. <https://doi.org/10.3390/ijms11041679>

de Sousa, A. R., de Castro Moreira, M. E., Grancieri, M., Toledo, R. C. L., de Oliveira Araújo, F., Mantovani, H. C., ... Martino, H. S. D. (2019). Extruded sorghum (*Sorghum bicolor* L.) improves gut microbiota, reduces inflammation, and oxidative stress in obese rats fed a high-fat diet. *Journal of Functional Foods*, 58(May), 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.05.009>

de Sousa, A. R. et al. (2018). Extruded sorghum (*Sorghum bicolor* L.) reduces metabolic risk of hepatic steatosis in obese rats consuming a high fat diet. *Food Research International*, 112(May), 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.004>

Dong, J. et al. (2010). Investigation on ultrasound-assisted extraction of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* root. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(1), 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.05.006>

Duval, J. et al. (2016). Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. *Industrial Crops and Products*, 94, 812–833. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.056>

Dykes, L., & Rooney, L. W. (2006). Sorghum and millet phenols and antioxidants. *Journal of Cereal Science*, 44(3), 236–251. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.06.007>

Dykes, L. et al. (2009). Flavonoid composition of red sorghum genotypes. *Food Chemistry*, 116(1), 313–317. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.052>

Espada-Bellido, E., Ferreira-González, M., Carrera, C., Palma, M., Barroso, C. G., & Barbero, G. F. (2017). Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. *Food Chemistry*, 219, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.122>

Feng, J. C. E., Cerniglia, H., Chen. (2012). Toxicological significance of azo dye metabolism by human intestinal Microbiota *Front. Biosci* (4), 568-586.

Fuleki, T.; Francis, F. J. (1968). Quantitative methods for anthocyanins: 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. *Journal of Food Science*, 33, 72-77.

Francis, F. J. (1989). Food colorants: anthocyanins. *Critical Review of Food Science and Nutrition* (28), 273-314.

Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15(12), 8813–8826. <https://doi.org/10.3390/molecules15128813>

Girard, A. L., & Awika, J. M. (2018). Sorghum polyphenols and other bioactive components as functional and health promoting food ingredients. *Journal of Cereal Science*, 84(September), 112–124. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.10.009>

GOULA, A. M. et al. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 34, p. 821–830, 2017.

He, Bo et al. (2016). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chemistry*, 204, 70-76, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.094>.

Herrman, Dorothy A ; Brantsen, Julia F ; Ravisankar, Shreeya ; Lee, Kyung-Min ; Awika, Joseph M. Stability of 3-deoxyanthocyanin pigment structure relative to anthocyanins from grains under microwave assisted extraction. *Food chemistry*, 2020-12-15, Vol.333, p.127494-127494. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127494

Homayoonfal, M., Mousavi, S. M., Kiani, H., Askari, G., Khani, M., Rezazad Bari, M., & Alizadeh, M. (2018). The use of an innovative inverse numerical modeling method for the evaluation and parameter estimation of barberry anthocyanins ultrasound assisted extraction. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 133(August), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2018.09.011>

Hong, HT, Netzel, ME & O'Hare, T J. (2020). Optimisation of extraction procedure and development of LC–DAD–MS methodology for anthocyanin analysis in anthocyanin-pigmented corn kernels. *Food Chemistry*, 126515.

Kirca, A., Özkan, M., & Cemeroğlu, B. (2007). Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. *Food Chemistry*, 101(1), 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.019>

Kong, J. M. et al. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5), 923–933. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00438-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00438-2)

Kong, J. M. et al. (2008). Corrigendum to “Analysis and biological activities of anthocyanins” [*Phytochemistry* 64 (2003) 923-933] (DOI:10.1016/S0031-9422(03)00438-2). *Phytochemistry*, 69(9), 1939–1940. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.06.001>

Kuehni, R. G. (2012). *Color: and introduction to practice and principles*. 3ª edição. Canada: Third Edition. 275p.

Li, D. et al. (2017). Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(8), 1729–1741. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1030064>

Liaqid, A. et al. (2007). Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1140(1–2), 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.040>

Lopes, T. et al. (2007). Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. *Revista Brasileira de Agrociencia*, 13(3), 291–297. <https://doi.org/10.18539/cast.v13i3.1375>

Ma, Y. et al. (2009). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(1), 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2008.04.012>

Malacrida, C. R., & Da Motta, S. (2006). Antocianinas Em Suco De Uva: Composição E Estabilidade. *Boletim Do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 24(1), 59–82. <https://doi.org/10.5380/cep.v24i1.5294>

Mendonça, L. A. (2012) Desempenho do delineamento composto central em experimentos com alto coeficiente de variação. Dissertação apresentada à Univerdade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação, 68.

Moraes, É. A. (2011). Atividade antioxidante, qualidade proteica e potencial funcional de genótipos de sorgo disponíveis à alimentação humana. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação, 104.

Munekata, et al. (2020). Impact of ultrasound-assisted extraction and solvent composition on bioactive compounds and in vitro biological activities of thyme and rosemary. *Food Research International*, 134(February), 109242. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109242>

Ojwang, L. O., & Awika, J. M. (2010). Stability of apigeninidin and its methoxylated derivatives in the presence of sulfites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 9077–9082. <https://doi.org/10.1021/jf101687g>

Oliveira, I. R. N. de. (2011). Antocianinas extraídas de capim-gordura (*melinis minutiflora*): atividade antioxidante, microencapsulamento por atomização e estabilidade. 130.

Paiva, C. L., Queiroz, V. A. V., & Garcia, M. A. V. T. (2019). Características tecnológicas, sensoriais e químicas de massas secas sem glúten à base de farinhas de sorgo e milho. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22(0), 1–9. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.09518>

Paludo, M. C. (2013). Estudo da capacidade antioxidante (in vitro), quantificação das antocianinas e compostos fenólicos totais da jabuticaba *sabará myrciaria jabuticaba* (vell.) O. Berg e sua geleia. 2013. 107 f.

Pioneer, D., & Unidos, E. (2020). Sorgo granífero: práticas para implantação da cultura (</blog/185/sorgo-granifero-praticas-para-implantacao-da-cultura>), 1–11.

Queiroz, V.A.V. et al. (2014). Substituição de Metanol por Água na Extração de Antocianinas Totais de Glumas de Sorgo para Uso como Corante Alimentício. (51), 4–8.

Queiroz, V. A. V. et al. (2018). A low calorie and nutritive sorghum powdered drink mix: Influence of tannin on the sensorial and functional properties. *Journal of Cereal Science*, 79, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.10.001>

Queiroz, V. A. V. et al. (2009). Análise sensorial de um protótipo de barra de cereais elaborada com pipoca de sorgo. *Comunicado Técnico 164 - Embrapa*, 1–8.

Queiroz, Valéria A. V. et al. (2011). Como utilizar grãos de sorgo no preparo de produtos caseiros. *Comunicado Técnico 190 - Embrapa*, 1–6. Retrieved from <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/746473/1/comunicado190.pdf>

Ravanfar, R., Tamadon, A. M., & Niakousari, M. (2015). Optimization of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from red cabbage using Taguchi design method. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 8140–8147. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1880-6>

R. et al. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.

Ribas, P. M. (2003). Sorgo: introdução e importância econômica. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo Ministério Da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Documento (1518–4277), 1–14. Retrieved from <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/486642/1/Doc26.pdf>

Rocha, F. R. P., & Teixeira, L. S. G. (2004). Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. *Quimica Nova*, 27(5), 807–812. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422004000500021>

Rocha, J. de C. G. et al. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from jussara (*Euterpe edulis* M.) and blueberry (*vaccinium myrtillus*) fruits. *Food Science and Technology*, 38(1), 45–53. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.36316>

Rodriguez-Amaya, D. B. (2016). Natural food pigments and colorants. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 7). <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.08.004>

Rojas, M. L., Kubo M. T. K., Silva, M. E. C, Augusto P. E. D. (2021). Ultrasound processing of fruits and vegetables, structural modification and impact on nutrient and bioactive compounds: a review. *International Journal of Food Science & Technology* Volume 56, Issue 9 p. 4376-4395. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15113>

Schiozer, A. L., & Barata, L. E. S. (2007). Estabilidade de Corantes e Pigmentos de Origem Vegetal Stability of Natural Pigments and Dyes. *Revista Fitos*, 3, 6–24.

Singleton, V. L.; Rossi, J. A. J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.

Stefoska-Needham, A., Beck, E. J., Johnson, S. K., & Tapsell, L. C. (2015). Sorghum: An Underutilized Cereal Whole Grain with the Potential to Assist in the Prevention of Chronic Disease. *Food Reviews International*, 31(4), 401–437. <https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1022832>

Tedeschi, L. O. (2006). Assessment of the adequacy of mathematical models. *Agric. Syst.*, 89, pp. 225 - 247.

Teixeira, L. N., & Stringheta, P. C. (2008). Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Revista Ceres*, 55(4), 297–304.

Teixeira, Bárbara Avancini. (2018). Otimização da extração assistida por ultrassom de antocianinas e fenólicos totais de frutas vermelhas produzidas no Brasil. *Dissertação* (Universidade Federal de Viçosa). Viçosa, 59f.

Teófilo, R. F., & Ferreira, M. M. C. (2006). Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculo de planejamentos experimentais, um tutorial. *Quimica Nova*, 29(2), 338–350. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422006000200026>

Veggi, P. C. (2013). Obtenção de Compostos Fenólicos de Plantas Brasileiras via Tecnologia Supercrítica utilizando Cossolventes e Extração Assistida por Ultrassom. Unicamp, 190.

Vidal, A. M., Dias, D. O., Martins, E. S. M., Oliveira, R. S., Nascimento, R. M. S., & Correia, M. G. S. (2012). A ingestão de alimentos funcionais e sua contribuição para a diminuição da incidência de doenças. *Cadernos de Graduação - Ciências Biológicas e Da Saúde*, 1(15), 43–52.

Volp, A. C. P., Renhe, I. R. T., & Stringueta, P. C. (2009). Pigmentos naturais bioativos. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 20(1), 157–166.

Yang, L., Dykes, L., & Awika, J. M. (2014). Thermal stability of 3-deoxyanthocyanidin pigments. *FOOD CHEMISTRY*, 160, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.105>

Zhang, Q., & Wang, T. (2017). Effect of ultrasound irradiation on the evolution of color properties and major phenolic compounds in wine during storage. *Food Chemistry*, 234, 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.022>