

ANDRESSA DE ASSIS

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIODISPONIBILIDADE DE FERRO *IN VITRO* DE MELADOS DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE SORGO SACARINO
(*Sorghum bicolor* (L.) Moench)**

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

Orientadora: Hércia Stampini Duarte Martino

Coorientadoras: Bárbara Pereira da Silva
Izabela Maria M. de Carvalho
Valéria Aparecida Vieira Queiroz

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

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

T

A848c
2023 Assis, Andressa de, 1997-
Caracterização físico-química e biodisponibilidade de ferro
in vitro de melados de diferentes genótipos de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) / Andressa de Assis. – Viçosa,
MG, 2023.

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

Orientador: Hércia Stampini Duarte Martino.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Nutrição e Saúde, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.501>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Sorgo sacarino - Composição. 2. Xaropes. 3. Açúcar.
4. Adoçantes naturais. I. Martino, Hércia Stampini Duarte,
1972-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Nutrição e Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciência da
Nutrição. III. Título.

CDD 22. ed. 664.133


ANDRESSA DE ASSIS

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIODISPONIBILIDADE DE FERRO *IN VITRO* DE MELADOS DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE SORGO SACARINO
(*Sorghum bicolor* (L.) Moench)**


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

APROVADA: 20 de julho de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **ANDRESSA DE ASSIS**
Data: 28/08/2023 17:04:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Andressa de Assis
Autora

Documento assinado digitalmente
 **HERCIA STAMPINI DUARTE MARTINO**
Data: 29/08/2023 14:06:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Hércia Stampini Duarte Martino
Orientadora

Dedico esse trabalho aos meus pais, irmãs, namorado e amigos que me deram todo o apoio para chegar até aqui. Dedico, em especial, ao meu eterno Luck, que por curtos 5 anos, foi meu refúgio de paz, tornando minha vida mais leve e à minha sogra Edvânia e vó Joana, in memoriam, por me incentivar e torcer por todas minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e Nossa Senhora Aparecida pelo dom da vida e a benção de cada dia.

Agradeço, em especial, aos meus pais, Waltuir e Lúcia, que permitiram que eu escolhesse meu caminho, me apoiaram e me amaram incondicionalmente em cada etapa vivida, minha irmã Waléria por me incentivar e estar sempre presente e ao meu namorado, Luiz Eduardo, pelo companheirismo, paciência, incentivo e amor. Amo vocês! A toda minha família e amigos de Coimbra e da graduação que torceram e acreditaram em mim.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Nutrição e Saúde, ao Programa de Pós Graduação em Ciência da Nutrição, a todos os professores e técnicos por todas oportunidades e ensinamentos enriquecedores.

À orientadora e amiga Hércia Stampini Duarte Martino por ter me acolhido e acreditado em mim desde a graduação. Obrigada por ser um exemplo, pelos conselhos, por me orientar, dar apoio e suporte a cada detalhe. À minha coorientadora Bárbara pelas “aulas” de estatística, por me socorrer e sanar minhas dúvidas até mesmo nas férias. As demais coorientadoras, Isabela e Valéria, pela disponibilidade, sugestões e contribuições. Aos colaboradores, Renata e Rafael, por toda ajuda nas análises e materiais fornecidos.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição experimental por todas oportunidades e ensinamentos, apoio e companheirismo. À Embrapa pela confiança em meu trabalho, pelo fornecimento da matéria prima e pelo apoio financeiro. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de pesquisa.

A todos e todas, meu muito obrigada!

BIOGRAFIA

ANDRESSA DE ASSIS, filha de Waltuir de Assis e Lúcia Bárbara Vieira de Assis, nasceu na cidade de Visconde do Rio Branco, Minas Gerais, em 14 de maio de 1997.

Em março de 2016, ingressou no Curso de Nutrição da Universidade Federal de Viçosa, graduando-se Nutricionista em 19 de novembro de 2021.

Em fevereiro de 2017, ingressou na equipe do Laboratório de Nutrição Experimental (LNE/DNS), realizando três iniciações científicas, como bolsista dos programas PIBIC/FAPEMIG e CNPQ, em 2017/2018, 2018/2019 e 2021, e o Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) em 2020/2021, todos sob orientação da prof. Hércia Stampini Duarte Martino. Em 2019/2020, realizou uma iniciação científica em unidades de alimentação e nutrição escolares da cidade de Viçosa, sob orientação da prof. Ana Íris Mendes Coelho.

Em março de 2022, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição da Universidade Federal de Viçosa, na linha de Dietética e Qualidade de Alimentos, submetendo-se à defesa da dissertação em julho de 2023.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota” (Madre Teresa de Calcuta).

RESUMO

ASSIS, Andressa de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2023. **Caracterização físico-química e biodisponibilidade de ferro *in vitro* de melados de diferentes genótipos de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench).** Orientadora: Hércia Stampini Duarte Martino. Coorientadoras: Bárbara Pereira da Silva, Izabela Maria Montezano de Carvalho e Valéria Aparecida Vieira Queiroz.

O sorgo é um cereal com múltiplos benefícios à saúde humana, com propriedades antiproliferativas, antioxidantes, antimicrobiana e anti-inflamatória. Dentre os tipos de sorgo, têm-se o sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), cujo nome refere-se à alta concentração de açúcares solúveis contidos em seus caules. O melado de sorgo vem sendo consumido em alguns países, entretanto, são poucos os estudos que analisaram a composição físico-química desse produto e seus benefícios à saúde. Além disso, como existe uma grande diversidade de genótipos desse sorgo, as composições dos melados podem sofrer variações. Assim, o objetivo desse trabalho foi analisar a composição físico-química de melados de dez diferentes genótipos de sorgo sacarino (BR 501, BRS 511, CMSXS 5017, CMSXS 5035, CMSXS 5021, CMSXS 5039, CMSXS 5041, CMSXS 5022, CMSXS 5043 e CMSXS 5045), bem como do melado de cana-de-açúcar, e a biodisponibilidade de ferro *in vitro*. Foram realizadas as análises de composição centesimal, minerais, pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais, teor de açúcar total, redutores e não redutores, taninos condensados, ácido fítico, amido resistente, fenólicos totais e atividade antioxidante. Foi realizado ensaio em células Caco-2 para avaliar a biodisponibilidade de ferro dos melados mais promissores. Foi aplicada análise de variância *one-way* ANOVA, seguida pelo teste *post-hoc* de Dunnett para comparar os melados de sorgo com o de cana-de-açúcar e de Tuckey para comparação de médias entre os melados de sorgo. Os melados de sorgo apresentaram variação no conteúdo de proteína (0,28 - 2,90%), lipídeos (0,07 - 0,53%), fibra alimentar total (0,00 - 2,85%), carboidratos (90,16 - 93,29%), pH (4,67 - 4,95), acidez (0,3 - 0,45) e BRIX (38,2 - 58,5°). Destacou-se a maior concentração de cinzas (3,30 - 6,86%) e cálcio (397 - 966mg) nos melados de sorgo em relação à cana-de-açúcar (1,98% e 70 mg). Os melados de sorgo também apresentaram teores mais elevados de compostos fenólicos totais (19,3 - 48,4 mg GAE/g) em comparação com a cana-de-açúcar (8,8 mg GAE/g), como compostos fenólicos e atividade antioxidante. Os melados CMSXS 5022 e 5039 apresentaram maiores concentrações tanto de ferro (45,56 e 48,9 mg/100g, respectivamente) quanto de ferritina (6,33 e 6,82 ng/mg de proteína, respectivamente) em relação à cana-de-açúcar, em células Caco-2. Embora o melado CMSXS 5021 tenha uma

concentração de ferro (29,27 mg/100g) menor do que a cana-de-açúcar (35,23 mg/100g), a concentração de ferritina (5,05 ng/mg de proteína) em células Caco-2 foi igual à cana-de-açúcar (4,33 ng/mg de proteína). Assim, o melado de sorgo mostrou-se fonte biodisponível de ferro e de compostos bioativos, demonstrando ser um alimento promissor a ser utilizado na culinária brasileira.

Palavras-chave: Xarope. Açúcar. Composição centesimal. Mel de sorgo. Adoçante natural.

ABSTRACT

ASSIS, Andressa de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2023. **Physicochemical characterization and *in vitro* iron bioavailability of molasses from different genotypes of sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench).** Advisor: Hércia Stampini Duarte Martino. Co-advisors: Bárbara Pereira da Silva, Izabela Maria Montezano de Carvalho and Valéria Aparecida Vieira Queiroz.

Sorghum is a cereal with multiple benefits to human health, with antiproliferative, antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory properties. Among the types of sorghum, there is sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), whose name refers to the high concentration of soluble sugars contained in its stems. Sorghum molasses has been consumed in some countries, however, there are few studies that have analyzed the physical-chemical composition of this product and its health benefits. In addition, as there is a great diversity of sorghum genotypes, the composition of molasses can vary. Thus, the objective of this work was to analyze the physicochemical composition of molasses from ten different genotypes of sweet sorghum (BR 501, BRS 511, CMSXS 5017, CMSXS 5035, CMSXS 5021, CMSXS 5039, CMSXS 5041, CMSXS 5022, CMSXS 5043 and CMSXS 5045), as well as sugarcane molasses, and the *in vitro* iron bioavailability. Analyzes of centesimal composition, minerals, pH, titratable acidity, total soluble solids, total sugar content, reducing and non-reducing agents, condensed tannins, phytic acid, resistant starch, total phenolics and antioxidant activity were carried out. An assay was carried out in Caco-2 cells to evaluate the iron bioavailability of the most promising molasses. One-way ANOVA analysis of variance was applied, followed by Dunnett's post-hoc test to compare sorghum molasses with sugarcane and Tuckey's to compare means between sorghum molasses. Sorghum molasses showed variation in protein content (0.28 - 2.90%), lipids (0.07 - 0.53%), total dietary fiber (0.00 - 2.85%), carbohydrates (90.16 - 93.29%), pH (4.67 - 4.95), acidity (0.3 - 0.45) and BRIX (38.2 - 58.5°). The highest concentration of ash (3.30 - 6.86%) and calcium (397 - 966mg) in sorghum molasses compared to sugarcane (1.98% and 70 mg) stood out. Sorghum molasses also showed higher levels of total phenolic compounds (19.3 – 48.4 mg GAE/g) compared to sugarcane (8.8 mg GAE/g), such as phenolic compounds and activity antioxidant. CMSXS 5022 and 5039 molasses showed higher concentrations of both iron (45.56 and 48.9 mg/100g, respectively) and ferritin (6.33 and 6.82 ng/mg of protein, respectively) compared to cane sugar. of sugar, in Caco-2 cells. Although CMSXS 5021 molasses has a lower iron concentration (29.27 mg/100g) than sugar cane (35.23 mg/100g), the ferritin concentration (5.05 ng/mg of protein) in Caco-2 cells it was the same as

sugar cane (4.33 ng/mg of protein). Thus, sorghum molasses proved to be a bioavailable source of iron and bioactive compounds, proving to be a promising food to be used in Brazilian cuisine.

Keywords: Syrup. Sugar. Proximate composition. Sorghum honey. Natural sweetener.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de sorgo cultivados no Brasil. A: sorgo granífero; B: sorgo forrageiro; C: sorgo sacarino; D: sorgo biomassa; E: sorgo vassoura.	20
Figura 2. Produtos alimentícios à base de sorgo sacarino.	24
Figura 3. Delineamento experimental: fluxograma da caracterização físico-química dos melados e biodisponibilidade de ferro in vitro.	27

ARTIGO 1

Figure 1. Antioxidant activity and total phenolic compounds in sorghum and sugar cane molasses by different extracts.....	60
Figure 2. Iron concentration and its bioavailability in Caco-2 cells exposed to samples of sugar cane molasses and different genotypes of sweet sorghum, Brazil, 2022.....	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Caracterização físico-química do melado de sorgo sacarino IPA 467-4-2. 22

TABELA 2. Características típicas de matérias-primas de biocombustíveis. 23

ARTIGO 1

TABLE 1. Proximate composition of sugar cane molasses and different sweet sorghum genotypes, Brazil, 2022.....56

TABLE 2. Physicalchemical composition and bioactive compounds of sugar cane molasses and different genotypes of sweet sorghum, Brazil, 2022.....57

TABLE 3. Mineral composition of sugar cane molasses and different sweet sorghum genotypes, Brazil, 2022.....59

TABLE 4. Antioxidant activity and total phenolic composition of sugar cane molasses and different genotypes of sweet sorghum, extracted by methanol 50%: acetone 70%: water (40:40:20), Brazil, 2022.....61

Table 5. Comparative nutritional information about sorghum and cane molasses.....63

MATERIAL SUPPLEMENTAR

TABLE 1. Antioxidant activity (uMol Trolox/g sample) of sugarcane molasses and different genotypes of sweet sorghum, extracted by different solvents, Brazil, 2022.....72

TABLE 2. Total phenolic composition (mg GAE/g sample) of sugarcane molasses and different genotypes of sweet sorghum, extracted by different solvents, Brazil, 2022.....73

TABLE 3. Ferritin concentration in Caco-2 cells exposed to samples of sugarcane molasses and different genotypes of sweet sorghum, Brazil, 2022.....73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC - Association of Official Analytical Chemists
Ca – Cálcio
Cr – Cromo
Cu – Cobre
DNS – Departamento de Nutrição de Saúde
EC – Equivalente de catequina
EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUA – Estados Unidos da América
FAI - Fibra alimentar insolúvel
FAS - Fibra alimentar solúvel
FAT - Fibra alimentar total
Fe – Ferro
HCl – Ácido clorídrico
IOM – Instituto de Medicina
K – Potássio
Mg – Magnésio
Mn – Manganês
N – Nitrogênio
Na - Sódio
NaOH – Hidróxido de sódio
P – Fósforo
PUI - Período de Utilização Industrial
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada
S – Enxofre
TE – Trolox equivalente
UFV – Universidade Federal de Viçosa
Zn – Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Hipótese	18
1.2. Objetivos	18
1.2.1. Objetivo Geral	18
1.2.2. Objetivos Específicos	18
2. EMBASAMENTO TEÓRICO	18
2.1. Sorgo e sua utilização na alimentação humana	18
2.2. Sorgo Sacarino versus Cana-de-açúcar	22
2.3. Biodisponibilidade de ferro	24
3. METODOLOGIA	25
3.1. Matéria-prima do estudo	26
3.2. Delineamento experimental	26
3.3. Análise de composição físico-química	27
3.3.1. Umidade	27
3.3.2. Cinzas	27
3.3.3. Lipídios	28
3.3.4. Proteínas	28
3.3.5. Fibra alimentar	29
3.3.6. Carboidratos	30
3.3.7. Determinação do valor energético	31
3.3.8. Minerais	31
3.3.9. pH	32
3.3.10. Acidez total titulável	32
3.3.11. Sólidos solúveis totais	32
3.3.12. Açúcar total, açúcar redutor e açúcar não redutor	33
3.3.13. Taninos condensados	34

3.3.14.	Ácido fítico.....	35
3.3.15.	Amido resistente.....	35
3.3.16.	Atividade Antioxidante e compostos fenólicos totais.....	36
3.4.	Biodisponibilidade de ferro <i>in vitro</i>	37
3.5.	Rotulagem nutricional.....	38
3.6.	Análise estatística.....	38
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
5.	RESULTADOS.....	45
	ARTIGO 1: Sweet sorghum (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench) molasses: physicochemical characterization and <i>in vitro</i> bioavailability of different genotypes	45
	SUPPLEMENTARY MATERIAL	70
6.	CONCLUSÃO GERAL	72
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72

1. INTRODUÇÃO

O sorgo é a quinta cultura de cereal mais comum em todo o mundo, sendo seus grãos utilizados em produtos como biscoitos, pães, bolos, panquecas, cuscuz, bebidas alcoólicas e não alcoólicas (YOUSIF *et al.* 2012). É composto basicamente de amido lentamente digerível, proteínas de baixa digestibilidade e lipídios insaturados, além de ser rico em alguns minerais, dentre eles o ferro, zinco, cálcio, potássio, fósforo e magnésio (MARTINO *et al.*, 2012; PONTIERI *et al.*, 2014; PAIVA *et al.*, 2017). Além disso, a maioria das variedades de sorgo é rica em compostos fenólicos, especialmente taninos, que apresentam múltiplos benefícios à saúde humana, como propriedades antiproliferativas associadas à prevenção de certos tipos de câncer, atividades antioxidantes relacionadas à prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo, ação antimicrobiana e efeitos anti-inflamatórios, além de atuar de forma positiva no metabolismo da glicose (CARDOSO *et al.*, 2017; KARDEŞ *et al.*, 2021; ESPITIA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020).

Dentre os tipos de sorgo, têm-se o sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), uma gramínea adaptada a quase todos os climas temperados e tropicais, com cultura anual ou perene curta, propagada por sementes. O nome deriva da alta concentração de açúcares solúveis contidos em seus caules altos e suculentos. Na maturidade, o açúcar nos talos suculentos é predominantemente sacarose com níveis variáveis de glicose e frutose. Esses tipos de açúcares podem ser facilmente convertidos em etanol por levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), podendo o sorgo ser usado como matéria-prima para a produção de biocombustíveis. Também podem ser usados no preparo de bebidas destiladas (uísque, rum) e produtos alimentícios (adoçantes, xarope) (UCHIMIYA *et al.*, 2017; NAOURA *et al.*, 2020).

Assim como a cana-de-açúcar, o sorgo sacarino também contém fibra alimentar e seu suco contém cerca de 11,8% de açúcares, predominando a sacarose, glicose e frutose, que podem ser facilmente convertidos em etanol, mas os diferentes genótipos existentes de sorgo podem resultar em diferenças na composição físico-química (KIM; DAY, 2011; NAOURA *et al.*, 2020). As vantagens do cultivo de sorgo sacarino sobre a cana-de-açúcar incluem a redução da necessidade de água, ciclos de colheita mais curtos e custos reduzidos devido a menor necessidade de fertilizantes (MASSEY; REDDIVARI; VANAMALA, 2014).

Atualmente, a deficiência de ferro e a anemia carencial ferropriva, devido a sua elevada prevalência, repercussões sobre o crescimento e desenvolvimento, resistência

às infecções e associação com a mortalidade em menores de 2 anos, são consideradas um dos principais problemas de saúde pública, sendo a deficiência nutricional mais comum em todo o mundo (DE SANTIS *et al.*, 2019). Nesse sentido, apesar do principal destino do sorgo sacarino ser a produção de biocombustíveis, ele gera uma grande quantidade de biomassa, composta por caules, folhas e bainhas foliares que contém altos níveis de ferro e compostos bioativos, tendo sido usados por curandeiros na África e na Índia para tratar anemia, epilepsia, dor de estômago e câncer (AKANDE; OSENI; BIOBAKU, 2010; BRÖHAN; JERKOVIC; COLLIN, 2011; KAYODÉ *et al.*, 2011).

A produção de melado é um processo subvalorizado nas usinas de açúcar e envolve a moagem do caule e bainhas foliares, seguida de concentração do suco sob calor (DESEO *et al.*, 2020). O melado de cana-de-açúcar é conhecido e usado como um adoçante alternativo, demonstrando benefícios à saúde humana, dentre eles a redução da glicose plasmática e da resposta insulínica (ST-PIERRE *et al.*, 2014; WRIGHT; ELLIS; ILAG, 2014), regulando o metabolismo de carboidratos e protegendo contra distúrbios metabólicos como diabetes mellitus tipo 2 (JI *et al.*, 2019). Além disso, devido ao seu conteúdo de ferro (11,3 a 20 mg/100g) e seus intensificadores de absorção, como enxofre, frutose e cobre, esse alimento vem sendo utilizado como suplemento dietético para auxiliar na prevenção da anemia (JAIN; VENKATASUBRAMANIAN, 2017).

O sorgo sacarino possui alegações de propriedades antioxidantes e presença de compostos bioativos e vem sendo consumido na forma de melado em alguns países, como os Estados Unidos. Apesar de ainda não ter relatos do seu uso em nível industrial, acredita-se que o melado de sorgo tem potencial para ser um adoçante alternativo promissor com efeitos benéficos à saúde. Além disso, o Guia Alimentar da População Brasileira (BRASIL, 2014) recomenda o maior consumo de produtos *in natura* ou minimamente processados e, com base em seu processamento mínimo de moagem e concentração sob calor, sem adição de nenhuma substância ao produto, o melado de sorgo é considerado um produto minimamente processado. Entretanto, são poucos os estudos que analisaram a composição físico-química e a biodisponibilidade de ferro desse produto e de seus benefícios à saúde. Além disso, como existe uma grande diversidade de genótipos desse sorgo, as composições dos melados podem sofrer variações.

1.1. Hipótese

Os melados de sorgo sacarino apresentaram diferenças em sua composição físico-química entre os genótipos e em comparação ao melado de cana-de-açúcar, principalmente quanto ao teor de cinzas e composição de minerais, proporção de açúcar redutor e não redutor e compostos fenólicos totais. Apesar do sorgo apresentar alegações de ser fonte de taninos condensados e amido resistente, devido ao processamento utilizando altas temperaturas, acredita-se não encontrar esses compostos nos melados. Os melados de sorgo apresentaram boa biodisponibilidade de ferro *in vitro*, se equiparando ao melado de cana-de-açúcar.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo Geral

Analisar a composição físico-química e biodisponibilidade de ferro *in vitro* de melados obtidos a partir de caldos de diferentes genótipos de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench).

1.2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a composição química centesimal e o conteúdo de minerais de melados obtidos de caldos de dez genótipos de sorgo sacarino;
- Analisar o teor de açúcar total, os açúcares redutores e os açúcares não redutores, o pH, a acidez titulável e os sólidos solúveis totais nos melados;
- Quantificar o conteúdo de taninos condensados, ácido fítico, amido resistente, fenólicos totais e atividade antioxidante dos melados;
- Realizar a caracterização físico-química do melado de cana-de-açúcar para comparação com os diferentes melados de sorgo sacarino;
- Avaliar a biodisponibilidade *in vitro* de ferro de melados de sorgo e de cana-de-açúcar.

2. EMBASAMENTO TEÓRICO

2.1. Sorgo e sua utilização na alimentação humana

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) é uma cultura antiga, originária da África e parte da Ásia, introduzida no Brasil na década de 1950. Acreditando no potencial desse grão, em 1970, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) iniciou programas de

melhoramento genético dessa cultura. Atualmente, o sorgo é considerado um cereal integral (ANVISA, 2021) e está entre os cinco cereais mais produzido no mundo, ficando atrás apenas do trigo, arroz, milho e cevada (CARDOSO *et al.*, 2017; JARDIM *et al.*, 2020).

No Brasil, a produção de sorgo é ascendente e concentra-se, em ordem decrescente, nos estados : Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Bahia e São Paulo. De acordo com o acompanhamento da Safra brasileira, mesmo com a redução de produtividade devido à falta de chuvas, a produção de sorgo no Brasil atingiu 2,85 milhões de toneladas na safra 2021/2022, um aumento de 36,9% em relação à safra 2020/2021 (JARDIM *et al.*, 2020; CONAB, 2022).

Cinco tipos de sorgo são cultivados no Brasil: granífero, forrageiro, sacarino, biomassa e vassoura (Figura 1): , cujas características estão descritas a seguir, segundo RODRIGUES *et al.* (2015):

- O sorgo granífero tem o grão como produto principal de exploração. Os grãos ficam na panícula ou cacho e o resto da planta (restolho ou palhada) pode ser utilizada como feno, destinada ao pastejo direto, ou como cobertura morta do solo para o plantio direto. Esse sorgo é muito utilizado para produção de ração animal e na alimentação humana;
- O sorgo forrageiro possui boa produção de matéria seca e boa relação grãos-planta, sendo usado tanto para silagem quanto pastejo. Quando colhido junto, planta e grãos no estágio leitoso/pastoso, constitui a biomassa total da planta, promovendo assim um maior enriquecimento nutricional da forragem a ser utilizada;
- O sorgo sacarino possui caule doce e succulento (similar ao caule da cana-de-açúcar), com rendimento de caldo em torno de 50%. A panícula é geralmente aberta e possui poucos grãos que são usados para proliferação do cultivo. Esse sorgo é destinado, principalmente, à produção de agroenergia (produção de xarope e de etanol). Como resultado da produção de etanol, têm-se elevada produção de biomassa, que pode ser utilizado como forrageiro, na forma de corte e de silagem;
- O sorgo biomassa é utilizado para produção de energia, apresentando poder calorífico similar ao da cana, do eucalipto e do capim-elefante. Esse sorgo tem sido usado tanto em usinas termelétricas, como em indústrias que utilizam caldeiras, gerando energia para consumo próprio.
- O sorgo vassoura apresenta panícula na forma de vassoura, sendo utilizado principalmente na fabricação de vassouras e produtos artesanais.

É consolidado na literatura que os grãos de sorgo granífero apresentam valor nutricional agregado, com uma variedade de compostos bioativos de elevada capacidade antioxidante (compostos fenólicos, como as 3-deoxiantocianidinas e os taninos), concentração de proteína variando entre 8,6% e 11,6%, lipídios entre 1,2% e 3,1%, carboidratos entre 57,3% e 64,7% e fibra alimentar total entre 9,1% e 15,1% (MARTINO *et al.*, 2012). Devido à sua composição química, esse sorgo desempenha efeito modulador em processos relacionados a doenças crônicas não transmissíveis, como a obesidade, o diabetes, a dislipidemia, as doenças cardiovasculares, o câncer e a hipertensão (QUEIROZ *et al.*, 2015). Entretanto, apesar das pesquisas avançadas sobre o potencial do sorgo sacarino na produção de etanol, são poucos os estudos que avaliaram a composição de melado de sorgo sacarino e são inexistentes, até o momento, pesquisas sobre os seus benefícios para uso humano.

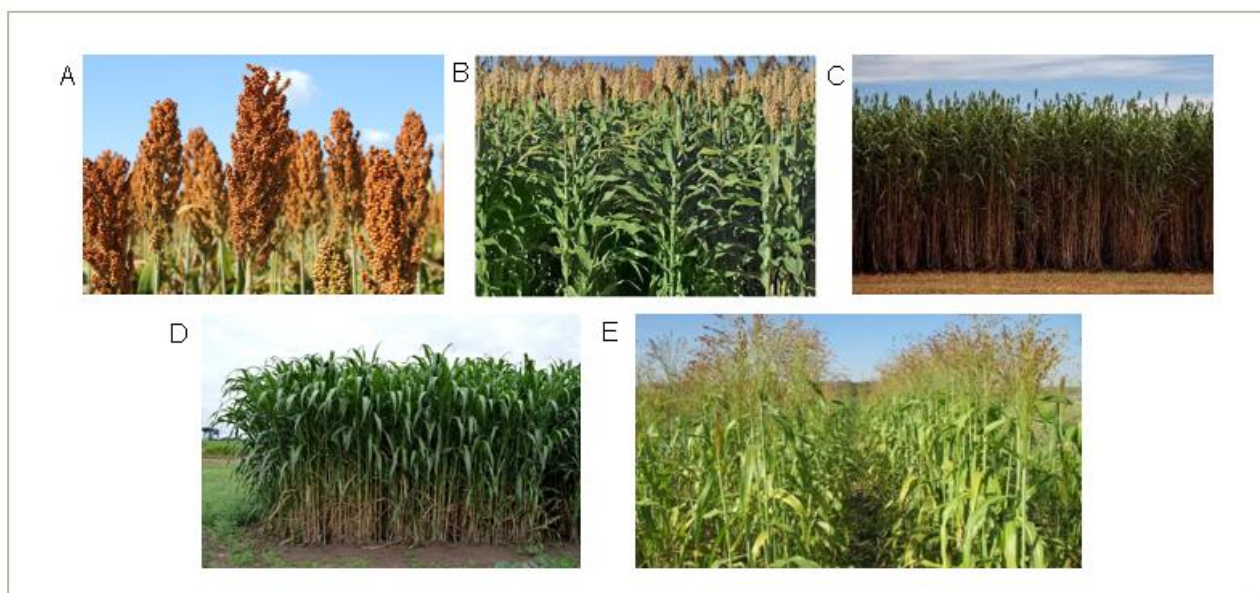


Figura 1. Tipos de sorgo cultivados no Brasil. A: sorgo granífero; B: sorgo forrageiro; C: sorgo sacarino; D: sorgo biomassa; E: sorgo vassoura.

Fonte: elaboração própria.

O sorgo sacarino é, em especial, um cultivar de alto porte, atingindo 3,0 m a 3,5 m de altura, num ciclo de 120 dias. Produz de 50 t/ha a 80 t/ha de massa verde, constituída principalmente por colmos (70% a 80%). Os seus colmos são suculentos, com alta produção de açúcares fermentáveis, que pode chegar a concentrações superiores a 160 g/L, dependendo das condições ambientais, época de colheita e da cultivar utilizada. Os açúcares presentes no caldo do sorgo sacarino são sacarose (8% a 13%), glicose (0,5% a 2,0%) e frutose (0,5% a 1,5%). A sacarose é um dissacarídeo formado por duas unidades de açúcar (glicose e frutose), considerado o

principal parâmetro de qualidade tecnológica para produção de açúcar e álcool (PARRELLA *et al.*, 2015).

Para obter melhor rendimento na produção de melado e etanol, o sorgo precisa ter uma boa estabilidade dos açúcares no caldo, que é garantido por valores maiores de período de utilização industrial (PUI - número de dias em que as cultivares de sorgo sacarino apresentam teores de açúcares redutores totais no caldo acima de 12,5% ou 125 g/L). O sorgo sacarino começa a acumular açúcares nos colmos após o florescimento, atingindo o pico de maturação entre 30 e 40 dias após esse período, em condições ambientais favoráveis, como quantidade adequadas de chuvas (PARRELLA *et al.*, 2015).

Ao analisar o melado de sorgo IPA 467-4-2, Silveira *et al.* (2011), observaram rendimento de 15%, sendo semelhante ao produzido pela cana-de-açúcar (20%). O teor de umidade (24,32%) estava dentro do permitido pela legislação brasileira vigente (25% para melados) (ANVISA, 1978). Os autores observaram elevado índice de cinzas, com 7,39%, quando comparado ao mel, que apresenta no máximo 0,6% e um alto conteúdo de ferro (1,22 mg de ferro/mL), ao comparar com o melado de cana que contém 0,064 mg de ferro/mL de acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimento (NEPA, 2011). Além disso, apresentou valor adequado de pH e acidez, 5,41 e 0,99, respectivamente. Entretanto apresentou baixo teor de sólidos solúveis totais ($^{\circ}\text{Brix}=17,17\%$) e baixo conteúdo de açúcares totais (22,92%), não atingindo a recomendação da Resolução 12/1978 da ANVISA em que o teor de açúcar totais deve ser de no mínimo de 50% (Tabela 1).

O principal desafio na produção do melado de sorgo é a aplicação de alta temperatura no processamento, podendo resultar em redução na quantidade de compostos fenólicos e outros compostos bioativos. No entanto, recentemente, Asikin *et al.* (2018) e Eggleston *et al.* (2021) relataram que xaropes de sorgo sacarino continham maiores conteúdos de compostos fenólicos totais e maior capacidade antioxidante comparado ao xarope de cana-de-açúcar e, dentre os compostos fenólicos presentes no xarope de sorgo houve predomínio dos ácidos fenólicos.

Ademais, o melado de sorgo sacarino é rico de alguns minerais, como ferro, cálcio, potássio, fósforo e magnésio. Entretanto, é esperado que variações genéticas, de solo e de climas possam influenciar na concentração de minerais. Comparando dois estudos que quantificaram os teores de minerais de alguns genótipos de sorgo cultivados nos Estados Unidos e Japão, observaram-se variações significativas para magnésio (58 a 184 mg/100g), potássio (1710 a

3929 mg/100g), cálcio (112 a 468 mg/100g), fósforo (9 a 149 mg/100g) e ferro (0.27 a 73 mg/100 g) (ASIKIN *et al.*, 2018; EGGLESTON *et al.*, 2022). Entretanto, não foi encontrado, até o momento, estudos analisando o conteúdo de minerais presentes nos cultivares de países tropicais, como o Brasil, bem como o aproveitamento desses minerais.

TABELA 1. Caracterização físico-química do melado de sorgo sacarino IPA 467-4-2.

Determinações	Concentrações
Umidade (%)	24,32±1,63
Matéria seca (%)	75,67±1,63
Cinzas (%)	7,39±0,06
Ferro (mg Fe/mL)	1,22
Matéria orgânica (%)	92,60±0,06
Sólidos solúveis totais (°Brix)	17,17±0,21
pH	5,41±0,02
Acidez total titulável (% ácido cítrico)	0,99±0,16
Açúcar total (g/ 100g de amostra)	22,92±0,37

Fonte: adaptado de Silveira *et al.* (2011).

2.2. Sorgo Sacarino *versus* Cana-de-açúcar

Há um interesse crescente em todo o mundo para o uso do sorgo sacarino como cultura substituta da cana-de-açúcar na produção de biocombustíveis (MASSEY; REDDIVARI; VANAMALA, 2014). O sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) vêm ganhando destaque como uma das matérias primas alternativas na produção de bioetanol, principalmente nas zonas tropicais e temperadas do mundo, apresentando alto desempenho agrônômico e rendimentos de caldo, açúcar e etanol (DISASA *et al.*, 2018). O sorgo sacarino se assemelha à cana-de-açúcar para a produção de etanol, uma vez que o armazenamento de açúcares se localiza nos colmos, além de fornecer quantidade de bagaço suficiente para a geração de vapor para a operação industrial (DISASA *et al.*, 2018).

As vantagens de utilização do sorgo sacarino sobre a cana-de-açúcar incluem a redução da necessidade de água, períodos de cultivo mais curtos e custos de cultivo reduzidos. O sorgo sacarino é bem adaptado às condições dos trópicos e regiões semiáridas, sendo mais tolerante ao estresse hídrico, potencializando sua produção de bioetanol em áreas com pouca

disponibilidade hídrica no período de entressafra da cana. A cultura do sorgo sacarino utiliza apenas 1/4 da quantidade de água que a cultura de cana-de-açúcar necessita (INGLE *et al.*, 2018).

O sorgo sacarino tem um ciclo de cultivo de 3,5 meses e pode ser cultivado duas vezes por ano, enquanto a cana-de-açúcar e de energia, só podem ser cultivadas uma vez ao ano, com ciclo de 10 a 12 meses e 10 a 15 meses, respectivamente. O sorgo sacarino tem menor rendimento de matéria-prima, conteúdo de sólidos solúveis totais e de fibra residual (bagaço) em relação a cana-de-açúcar. Entretanto, esses aspectos são compensados pelo menor tempo de cultivo e menor custo de produção, tanto de necessidade hídrica quanto de fertilizantes, esse último correspondendo a 1/3 da necessidade aplicada para a cana-de-açúcar (Tabela 2) (KIM; DAY, 2011).

TABELA 2. Características típicas de matérias-primas para biocombustíveis.

Propriedades	Cana-de-açúcar	Cana de energia	Sorgo sacarino
Ciclo da colheita (meses)	10–12	10-15	3,5
Número de ciclo/ano	Um	Um	Dois
Rendimento (t/ha/ano)	70	100	60
Brix (% de suco do colmo)	13–15	10–12	11–13
Fibra residual (% colmo)	13,5	26,7	13
Necessidade de fertilizante (N:P:K)	300:150:150	300:150:150	100:50:50
Necessidade hídrica (mm)	2000 – 2200	2000 - 2200	400 – 500

Fonte: adaptado de KIM; DAY (2011) e MOKARIYA; MALAM (2020).

Ademais, o sorgo sacarino produz grãos, que são utilizados tanto como sementes para cultivo, quanto para alimentação animal. Ele pode, ainda, ser usado na produção de xarope natural (melado), como adoçante natural em indústria de laticínios e confeitaria, em substituição ao mel ou açúcar em preparações culinárias diversas (Figura 2). Devido à alta concentração de açúcar, baixa atividade de água, propriedades antimicrobianas e antioxidantes, o melado de sorgo oferece efeito de preservação, inibindo o crescimento de microrganismos e aumentando a vida útil dos produtos alimentícios (MOKARIYA; MALAM, 2020).



Figura 2. Produtos alimentícios à base de sorgo sacarino.

Fonte: elaboração própria.

Na literatura, são poucos os estudos disponíveis que analisaram a composição nutricional dos melados de sorgo (SILVEIRA *et al.*, 2011; ASIKIN *et al.*, 2018; EGGLESTON *et al.*, 2021; EGGLESTON *et al.*, 2022) e são inexistentes estudos que avaliam a composição mineral e de compostos bioativos de melados de sorgo produzidos no Brasil, bem como a avaliação da biodisponibilidade de ferro desse produto e seus benefícios à saúde. Portanto, mais pesquisas são necessárias pois, apesar das evidências destacadas sobre os potenciais do melado de sorgo, ainda há muito a explorar sobre esse produto.

2.3. Biodisponibilidade de ferro

A deficiência de ferro ocorre quando a ingestão desse mineral é insuficiente para atender às necessidades diárias do organismo e compensar as perdas fisiológicas ou patológicas do indivíduo e é a principal causa de anemia no mundo (CAPPELLINI; MUSALLAM; TAHER, 2020; GATTERMANN *et al.*, 2021; PASRICHA *et al.*, 2021). Nos últimos dados reportados pela Organização Mundial da Saúde, houve mais de 1,2 bilhão de casos de anemia por deficiência de ferro em 2016, sendo mais prevalentes em crianças até 5 anos de idade (41,7%), gestantes (40,1%) e mulheres na pré-menopausa (32,8%) (GHO, 2016).

Os sinais e sintomas da deficiência de ferro muitas vezes são ignorados. Os sintomas mais comuns que podem predizer anemia por deficiência de ferro são a fadiga, falta de apetite, palidez de pele e mucosas, menor disposição para o trabalho, dificuldade de aprendizagem nas crianças e apatia. O diagnóstico é feito por meio de exames laboratoriais, sendo os níveis baixos

de ferritina sérica considerados o padrão ouro para a identificação da deficiência de ferro, uma vez que avalia a depleção dos estoques deste mineral (CAMASCHELLA, 2019).

O ferro é utilizado por quase todos os organismos e é essencial no metabolismo de várias enzimas envolvidas nos processos biológicos, incluindo biossíntese de DNA, transporte de oxigênio e geração de energia celular (ROEMHILD *et al.*, 2021). A disponibilidade de ferro tem dois componentes interdependentes: a acessibilidade alimentos fonte desse mineral que atendem a ingestão diária recomendada (levando em consideração fatores socioeconômicos, geográficos e culturais) e a absorção efetiva (biodisponibilidade) desses nutrientes (KUMAR *et al.*, 2022).

A biodisponibilidade de ferro em alimentos é influenciada por alguns fatores, como: a forma do ferro (o ferro não heme, encontrado em fontes vegetais, geralmente, é menos absorvido do que o ferro heme) e a presença de inibidores e potenciadores dietéticos. Os inibidores incluem taninos, cálcio, zinco, polifenóis, ácido fítico e possivelmente fibras alimentares (CHIOCCHETTI *et al.*, 2018). Já a presença de ácido ascórbico e proteína têm um efeito positivo na absorção de ferro não-heme na dieta (PISKIN *et al.*, 2022).

Assim, a avaliação da biodisponibilidade de ferro em alimentos têm sido um fator importante para garantir a qualidade nutricional desse mineral. Estudos *in vivo* vêm sendo utilizados para avaliação do ferro biodisponível em alimentos, sendo comum modelo animal, como *Gallus Gallus* e *Wistar* (TAKO; BAR; GLAHN, 2016; DIAS *et al.*, 2018; DA SILVA *et al.*, 2019; CORRÊA *et al.*, 2020; DA SILVA; MARTINO; TAKO, 2021), entretanto, são limitados pelo custo, rendimento e pelas ressalvas inerentes à marcação isotópica do ferro alimentar. Uma alternativa desenvolvida por Glahn *et al.* (1998) foi o desenvolvimento do bioensaio em células Caco-2 (cultura de célula do epitélio intestinal humano) para a biodisponibilidade de ferro, realizando uma digestão gástrica e intestinal simulada e utilizando níveis absolutos de ferritina celular como marcador substituto para absorção de ferro (GLAHN, 2022).

3. METODOLOGIA

O trabalho foi realizado em parceria com a Embrapa Milho e Sorgo, localizado em Sete Lagoas - MG e conduzido no Laboratório de Nutrição Experimental, Departamento de Nutrição e Saúde (DNS/UFV), Viçosa – MG.

3.1. Matéria-prima do estudo

Foram utilizados dez genótipos distintos de sorgo sacarino para a produção dos melados, fornecidos pela Embrapa Milho e Sorgo, sendo eles: BR 501, BRS 511, CMSXS 5017, CMSXS 5035, CMSXS 5021, CMSXS 5039, CMSXS 5041, CMSXS 5022, CMSXS 5043 e CMSXS 5045. Esses genótipos de sorgos foram cultivados na cidade de Sete Lagoas, Minas Gerais, no período de novembro/2021 a abril/2022, quando atingiram o estado de maturação fisiológica do caule. Foi utilizada toda a parcela experimental do campo de produção, que correspondeu a uma fileira de cinco metros com aproximadamente 45 plantas de cada genótipo. Os caules das plantas foram triturados e moídos em engenho de cana-de-açúcar (Maqtron B-72, Brasil) rendendo aproximadamente 7 litros de suco. Esse suco foi então concentrado em panela de inox, a 200 °C, por 48 minutos, até atingir a temperatura de ebulição de 105 °C, obtendo a consistência de melado e foi armazenado em temperatura ambiente (25 °C) até o início das análises.

A cana-de-açúcar utilizada para produção do melado de cana foi cultivada em Coimbra, Minas Gerais, e colhida em julho/2022. Após a colheita, a cana foi raspada, moída em engenho manual e seu suco foi concentrado nas mesmas condições descritas anteriormente para o melado de sorgo.

3.2. Delineamento experimental

Foram realizadas as análises de composição química centesimal dos teores de umidade, proteínas, lipídios, cinzas, fibra alimentar e carboidratos, determinação de minerais, pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais, açúcar total (glicose, frutose e sacarose), taninos condensados, ácido fítico, amido resistente, atividade antioxidante e compostos fenólicos totais (Figura 3). Todas as avaliações foram executadas em triplicata. Também foi realizado um ensaio *in vitro* (cultura de células Caco-2) para a avaliação da biodisponibilidade de ferro dos genótipos com maior conteúdo de ferro e foi elaborado a rotulagem nutricional do genótipo mais promissor.

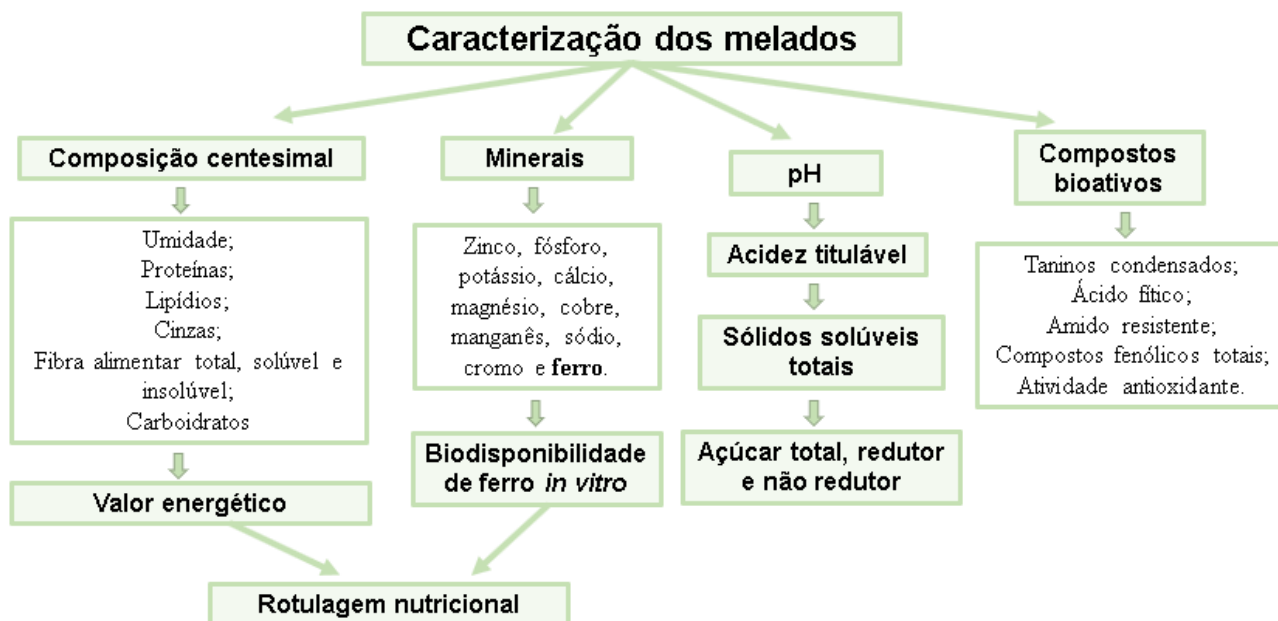


Figura 3. Delineamento experimental: fluxograma da caracterização físico-química dos melados e biodisponibilidade de ferro *in vitro*.

Fonte: elaboração própria.

3.3. Análise de composição físico-química

3.3.1. Umidade

O teor de umidade foi feito pelo método de secagem em estufa. Um total de 10 g de amostra foi colocado em placa de petri e alocado em estufa a 65 °C, por 72 horas até que atingisse peso constante. Após, a amostra foi novamente pesada, seguindo protocolo proposto pela AOAC (2019). O percentual de umidade foi calculado da seguinte forma:

$$\text{Teor de Sólidos (\%)} = \frac{\text{Peso 3} - \text{Peso 1}}{\text{Peso 2} - \text{Peso 1}} \times 100$$

$$\text{Teor de Umidade (\%)} = 100 - \text{Teor de Sólidos}$$

Onde,

Peso 1 = Placa de petri vazia (gramas);

Peso 2 = Placa de petri + peso da amostra (gramas);

Peso 3 = Peso da amostra seca (gramas).

3.3.2. Cinzas

O teor de cinzas foi determinado por meio da metodologia descrita pela AOAC (2019). Foram pesados 2,5 g da amostra, seguida da incineração em mufla, com temperatura entre 300 e 600 °C, durante 9 horas. Após a incineração, as cinzas foram armazenadas em um dessecador

até atingir temperatura ambiente, para posterior pesagem. A diferença de peso corresponde às cinzas da amostra. A percentagem (%) de cinzas totais foi calculada de acordo com a equação:

$$\text{Teor de Cinzas Totais (\%)} = \text{Peso 3} - \text{Peso 1} / \text{Peso 2} - \text{Peso 1} \times 100$$

Onde,

Peso 1 = Peso do cadinho vazio (gramas);

Peso 2 = Peso do cadinho + peso da amostra (gramas);

Peso 3 = Peso do cadinho com cinzas (gramas).

3.3.3. Lipídios

A extração de lipídios foi realizada em aparelho Soxhlet, com éter de petróleo como solvente. Os procedimentos de extração de lipídios seguiram o protocolo proposto pela AOAC (2019). Foram pesados 10 g da amostra seca em estufa, em papel de filtro, e transferidos para o aparelho extrator tipo Soxhlet. A extração ocorreu por 8 horas em chapa elétrica aquecida. Após, os balões com o resíduo extraído foram transferidos para uma estufa com circulação de ar à 105 °C por 24 horas. Após o resfriamento em dessecador até atingir temperatura ambiente, as amostras foram pesadas. Para a obtenção dos resultados empregou-se a equação:

$$\text{Teor de Lipídios (\%)} = \text{Peso 2} - \text{Peso 1} / A \times 100$$

Onde,

Peso 1 = Peso do balão seco (gramas);

Peso 2 = Peso do balão com resíduo seco (gramas);

A = Peso da amostra (gramas).

3.3.4. Proteínas

A análise de proteínas foi realizada pelo método de Micro Kjeldahl. Os procedimentos de extração de proteína seguiram o protocolo proposto pela AOAC (2019). Foi pesado 0,5 g da amostra, adicionado 3 mL de ácido sulfúrico e 1 g de mistura digestora. As amostras foram aquecidas em bloco digestor, seguido da destilação do extrato e recolhimento em erlenmeyer contendo 10 mL de ácido bórico.

Foi realizada uma titulometria de neutralização, onde:

número de miliequivalente do ácido = número de miliequivalente da base

Ou seja:

$$\begin{aligned} n^{\circ} \text{ de meq do HCl} &= n^{\circ} \text{ de meq do N} \\ \text{mL do ácido} \times \text{normalidade do ácido} &= \text{peso N (g)} / \text{meq do N} \end{aligned}$$

Assim,

$$\text{peso N (g)} = \text{mL do ácido} \times \text{normalidade do ácido} \times 0,014$$

A percentagem de proteína foi obtida pela multiplicação do teor de N encontrado na titulação pelo fator de 6,25.

3.3.5. Fibra alimentar

A determinação dos teores de fibra alimentar total (FAT), fibra alimentar insolúvel (FAI) e fibra alimentar solúvel (FAS) da amostra foi feita de acordo com o método enzimático gravimétrico (AOAC, 2019). As fibras alimentares totais (FAT) foram obtidas por meio da relação entre os valores de FAS e FAI considerando-se a base em que a amostra foi utilizada (úmida ou seca) e fazendo as devidas correções.

Para a determinação de fibras alimentares houve tratamento prévio das amostras utilizando a combinação de enzimas e soluções tampões em diferentes níveis de pH e temperaturas, para completa remoção do amido e parcial remoção da proteína. O kit enzimático que foi utilizado na análise contém três enzimas (alfa-amilase termoestável, protease e amiloglicosidase). As amostras digeridas foram submetidas à determinação de fibra alimentar insolúvel, seguida da fibra alimentar solúvel, ambas por meio de sistema de filtração à vácuo. Após, as amostras foram secas em estufa com circulação de ar à 105 °C por 8 horas, resfriadas em dessecador até atingir temperatura ambiente e pesadas. Desta etapa foram obtidos os valores utilizados para nas fórmulas para o cálculo de determinação do conteúdo das fibras alimentares.

O cálculo que foi utilizado para determinação da quantidade de fibra insolúvel da amostra é mostrado abaixo:

$$\text{FAI \%} = \text{RI} - \text{P} - \text{C} - \text{BI} / \text{m} \times 100$$

Onde,

RI = Média do resíduo insolúvel da amostra (mg)

P = Média de proteína do RI (mg)

C = Média de Cinzas do RI (mg)

m = Média do peso das amostras (mg)

BI = RI_B - P_B - C_B

RI_B = Média do resíduo insolúvel do branco (mg)

P_B = Média de proteína do RI_B (mg)

C_B = Média de cinzas do RI_B (mg)

O cálculo que foi utilizado para determinação da quantidade de fibra solúvel da amostra é mostrado abaixo:

$$\text{FAS \%} = \text{RS} - \text{P} - \text{C} - \text{BS} / \text{m} \times 100$$

Onde,

RI = Média do resíduo solúvel da amostra (mg)

P = Média de proteína do RS (mg)

C = Média de Cinzas do RS (mg)

m = Média do peso das amostras (mg)

BS = RS_B - P_B - C_B

RS_B = Média do resíduo solúvel do branco (mg)

P_B = Média de proteína do RS_B (mg)

C_B = Média de cinzas do RS_B (mg)

O cálculo que foi utilizado para determinação da quantidade de fibra alimentar total da amostra é mostrado abaixo:

$$\text{FAT \%} = \text{FAI} + \text{FAS}$$

3.3.6. Carboidratos

A quantidade de carboidratos foi calculada por diferença, em que todos os percentuais encontrados para proteínas, fibra alimentar, lipídios, umidade e cinzas foram somados e depois subtraídos de 100% (AOAC (2019)). A mesma foi obtida de acordo com a equação:

$$\text{Total de Carboidratos (\%)} = 100 - (\% \text{ de Umidade} + \% \text{ de Lipídios} + \% \text{ de Proteínas} + \% \text{ de Cinzas Totais} + \% \text{ de Fibras Alimentares})$$

3.3.7. Determinação do valor energético

Os valores energéticos dos melados foram calculados a partir dos teores de proteínas, lipídios e carboidratos, utilizando os coeficientes específicos que consideram o calor de combustão e a digestibilidade. O cálculo do valor energético foi obtido através dos princípios propostos por Merrill e Watt (1973), e foram calculados de acordo com o sistema Atwater: 4 - 9 - 4 kcal/g para os valores de proteínas, lipídios e carboidratos respectivamente. De acordo com a equação:

$$\text{Valor Calórico (\%)} = (A \times 4) + (B \times 9) + (C \times 4)$$

Onde,

A = Valor de Proteínas;

B = Valor de Lipídios;

C = Valor de Carboidratos.

3.3.8. Minerais

Em triplicata, foi determinada a concentração de ferro (Fe), zinco (Zn), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), cobre (Cu), manganês (Mn), sódio (Na) e cromo (Cr) nas amostras de melados. Todo material utilizado na análise foi previamente desmineralizado em solução de ácido nítrico 10%, por 24 horas, lavado em água deionizada (3 vezes) e seco em estufa de circulação de ar.

A digestão e a análise dos minerais foram realizadas de acordo com Gomes *et al.* (2011). Foram pesados 2 g de cada amostra em papel manteiga, em balança analítica (Gehaka, BG2000, Brasil), e transferidos para tubos de digestão. Em seguida, 10 mL de ácido nítrico à temperatura ambiente foram adicionados aos tubos e mantidos em bloco digestor, a 150 °C, por 16 horas. Quando necessário, 5 mL de ácido nítrico foram adicionados aos tubos.

Após a digestão, os tubos foram esfriados em temperatura ambiente e as amostras transferidas para balões volumétricos de 50 mL, sendo os tubos lavados com água deionizada e agitados em vórtex, por 3 vezes. Para análise, os extratos foram diluídos apropriadamente utilizando água deionizada.

Nas soluções que foram utilizadas para a determinação de cálcio e magnésio foram adicionados 5 mL de solução de cloreto de estrôncio hexahidratado, a fim de evitar a subestimação.

Os minerais foram determinados por espectrometria de emissão atômica em plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) (Perkin Elmer, Optima 8300), com fonte de plasma de argônio induzido, e com as seguintes condições: potência de 1300W, fluxo de ar refrigerante de 15 L/minuto, fluxo de ar auxiliar de 0,7 L/minuto, fluxo de ar carregador de 0,5 L/minuto, velocidade de introdução de amostra de 1,5 mL/minuto e uso de nebulizador Perkin Elmer. Os resultados foram expressos em miligrama por 100 gramas de amostra (mg/100g de amostra).

3.3.9. pH

A determinação do pH das amostras foi realizada utilizando pHmeter (Bel engineering, 966 Plus, China) previamente calibrado com soluções tampão de pH 4, 7 e 10. Nessa análise, foi realizada uma diluição 1:10 (melado: água destilada), de acordo com a metodologia proposta pela AOAC (2005).

3.3.10. Acidez total titulável

A acidez total titulável foi determinada de acordo com a AOAC (2016), com modificações. Foi realizada uma diluição 1:10 (melado: água destilada), adicionado 3 gotas da solução de fenolftaleína, e a titulação procedeu com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M na bureta, sob constante agitação, até a viragem da cor para coloração rósea. Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido cítrico.

3.3.11. Sólidos solúveis totais

O teor de sólidos solúveis foi obtido utilizando refratômetro digital (Instrutherm, RDT-65, Brasil), com leitura direta, calibrado com água destilada mantida à temperatura de 20 °C, expressa em °Brix. Para análise do melado foi realizado uma diluição 1:5 (melado: água destilada). As gotas das amostras foram colocadas sobre o prisma do aparelho e foi feita a leitura, conforme a metodologia proposta pela AOAC (2005).

3.3.12. Açúcar total, açúcar redutor e açúcar não redutor

A determinação da concentração de açúcares foi obtida conforme método de Lane & Eynon, utilizando solução padrão de glicose e soluções de Fehling (AOAC, 1990). Foi realizado a padronização da junção das soluções de Fehling e calculado seu fator de correção (FC).

3.2.11.1. Determinação de Açúcares Redutores (em glicose)

Foi pesado 1 g de amostra e adicionado 2 mL de ferrocianeto de potássio a 15%, 2 mL de acetato de zinco a 30% e água destilada até completar volume de 250 mL. A solução foi deixada em repouso para a floculação e sedimentação do material, que foi filtrado e utilizado na titulação. Em balão volumétrico, foi adicionado 10 mL de solução padronizada de Fehling e 40 mL de água destilada, que foi aquecido até ebulição e gotejado a solução da amostra até o início do descoramento, usando azul de metileno a 1% como indicador.

O teor de açúcares redutores foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{Glicose (\%)} = \frac{\text{FC}/2 \times 250 \times 100}{V \times P}$$

Onde,

FC = fator de correção da solução de Fehling

V = volume da amostra gasta na titulação, em mL

P = peso da amostra em g

3.2.11.2. Determinação de Açúcares Totais

Foi pesado 1 g de amostra e adicionado 50 mL de água destilada e 2 mL de ácido clorídrico concentrado e levado ao banho-maria (60°C) por 60 minutos. Após esfriar, a solução foi neutralizada com hidróxido de sódio 50% e adicionado 2 mL de ferrocianeto de potássio a 15%, 2 mL de acetato de zinco a 30% e água destilada até completar volume de 250 mL. Foi deixado em repouso para a floculação e sedimentação do material, que foi filtrado e utilizado na titulação. Em balão, foi adicionado 10 mL de solução padronizada de Fehling e 40 mL de água destilada, que foi aquecido até ebulição e gotejado a solução da amostra até o início do descoramento, usando azul de metileno a 1% como indicador.

O teor de açúcares totais foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{Glicídios Totais \%} = \frac{\text{FC}/2 \times 250 \times 100}{\text{V} \times \text{P}}$$

Onde:

FC = título da solução de Fehling

V = volume da amostra gasta na titulação, em mL

P = peso da amostra em g

3.2.11.3. Determinação de Açúcares Não Redutores (sacarose)

O teor de açúcares não redutores foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{Sacarose (\%)} = (\text{Glicídios Totais} - \text{glicose}) \times 0,95$$

Onde,

0,95 = fator de conversão da sacarose.

3.2.11.3. Determinação de Açúcares Redutores (frutose)

O teor de frutose foi calculado por diferença, em que todos os percentuais encontrados para glicose e sacarose foram somados e depois subtraídos do percentual de glicídios totais. De acordo com a equação:

$$\text{Frutose (\%)} = \text{Glicídios totais} - (\text{glicose} + \text{sacarose})$$

3.3.13. Taninos condensados

Para preparação do extrato foram pesados 0,5 g de cada melado em tubos e foi realizado a suspensão em 25 mL de solução a 1% de HCl em metanol. Os tubos foram colocados em agitador automático durante 16 horas para a extração. Posteriormente a solução foi centrifugada por 10 minutos a 3000 g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e armazenado, sob refrigeração, até o momento das análises (AWIKA *et al.*, 2003).

Os taninos condensados foram analisados pelo método de reação vanilina/HCl, segundo Maxson Rooney (1972) e Price, Van Scoyoc, Butler (1978). Foi pipetado 1 mL do extrato, previamente preparado, em tubos de ensaio e adicionados 2,5 mL de solução de vanilina a 1% em metanol e 2,5 mL de solução de HCL a 8% em metanol. Os tubos foram mantidos em repouso por 20 minutos e as absorbâncias lidas a 500 nm em espectrofotômetro Multiskan™

GO (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA), contra o branco. O branco foi feito utilizando 1 mL do extrato e 5 mL de HCL a 4% em metanol. Uma curva analítica de catequina foi construída, onde o composto foi diluído em metanol. Alíquotas de 0 mL; 0,2 mL; 0,4 mL; 0,6 mL; 0,8 mL e 1 mL foram retiradas da solução concentrada e o volume ajustado para 1 mL em tubos, utilizando metanol. As reações dos padrões foram preparadas da mesma forma que as amostras, sendo as diferentes concentrações de catequina adicionadas por último devido ao tempo de estabilidade da reação que é de 20 minutos. Os resultados foram expressos em miligrama equivalente de catequina por quilograma de amostra (mg EC/Kg de amostra).

3.3.14. Ácido fítico

O conteúdo do ácido fítico foi determinado utilizando o kit K-PHYT Phytic Acid (Phytate) / Total Phosphorus (Megazyme, Wicklow, Irlanda), seguindo as instruções do fabricante com pequenas modificações. Resumidamente, 1 g de melado foi adicionado a 20 mL de HCl 0,66 M e misturados por agitação à temperatura ambiente por 16 horas; 1 mL do extrato resultante foi transferido para tubos de 1,5 mL e centrifugados a 13000 g por 10 minutos. Imediatamente, 0,5 mL do sobrenadante foram transferidos para tubos de 1,5 mL e neutralizados com 0,5 mL de NaOH (0,75 M). Posteriormente foi feita a desfosforilação enzimática, utilizando 1 tubo para fósforo livre e 1 tubo para fósforo total, com diluições utilizando a amostra neutralizada, obtida anteriormente, e os demais componentes do kit (enzimas). Após o tratamento enzimático, amostras de fósforo total e fosfato livre foram utilizadas para determinar colorimetricamente seu conteúdo de fósforo. Foi preparada uma curva padrão, plotada conforme indicado pelo fabricante, e a absorbância foi lida a 655 nm em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA). Os resultados foram expressos em grama por 100 gramas de amostra (g/100g de amostra).

3.3.15. Amido resistente

O conteúdo de amido resistente foi determinado por meio da digestão simulada com α -amilase pancreática e amiloglicosidase, extração dos componentes diferentes do amido resistente (exemplo: amido solubilizado) e leitura indireta da fração do conteúdo de amido resistente a 510 nm em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA), conforme os procedimentos descritos no kit enzimático da Megazyme® (AOAC, 2016). A planilha disponível na plataforma online do fornecedor do Kit

(www.megazyme.com) foi usada para o cálculo do conteúdo de amido resistente das amostras. Os resultados foram expressos em grama por 100 gramas de amostra (g/100g de amostra).

3.3.16. Atividade Antioxidante e compostos fenólicos totais

3.3.16.1. Preparo dos extratos

Em busca de melhor extração de compostos, foram preparados três extratos com diferentes solventes para as análises de atividade antioxidante e de compostos fenólicos totais. Cada tipo de extrato foi preparado em triplicata para cada melado.

Os solventes extratores utilizados no presente trabalho foram: 1) acetona 80%, 2) metanol 80% e 3) mistura de solventes contendo metanol 50%, acetona 70% e água, segundo metodologia descrita por Rufino *et al.* (2007). Para o preparo da mistura de solventes, foram adicionados 40 mL da solução de metanol 50%, 40 mL da solução de acetona 70% e o volume para 100 mL foi completado com água destilada.

Para preparação dos extratos foram pesados 0,5 g de cada melado em tubos e foi realizado a suspensão em 5 mL de solvente. Os tubos foram colocados em agitador automático durante 16 horas para a extração. Posteriormente, a solução foi centrifugada por 10 minutos a 3000 g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e armazenado, sob refrigeração, até o momento das análises.

3.3.16.2. Capacidade de sequestrar radicais (DPPH)

Foi realizado a análise descrita a seguir para cada extrato, seguindo a metodologia de Brand-Williams *et al.*, (1995), em triplicata.

Em um tubo protegido da luz, 100 μ L do extrato foi adicionado a 1,5 mL de solução metanólica DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) e agitada em vórtex (3000 g) por 30 segundos. A solução foi colocada em repouso por 30 minutos e em seguida absorvância foi lida em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientifics; Waltham, MA, EUA) a 517 nm. A curva analítica foi construída usando uma solução de trolox de 50 a 100 mMol/L. Os resultados foram expressos em μ mol de equivalente de trolox por grama de amostra (μ mol trolox/g de amostra).

3.3.16.3. *Análise de fenólicos totais*

Os compostos fenólicos totais de cada melado foram determinados utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (SINGLETON *et al.*, 1999), em triplicata.

Foi realizada a análise descrita a seguir para cada extrato.

500 µL de extrato foram adicionados a 500 µL de solução de Folin-Ciocalteu 20% e 500 µL de solução de carbonato de sódio 7,5%. Em seguida, a solução foi agitada em vórtex e deixada em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente (25°C). Após o tempo em repouso, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientifics; Waltham, MA, EUA) a 765 nm. A quantificação foi calculada conforme curva analítica obtida na leitura da absorbância de solução padrão com diferentes concentrações de ácido gálico. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg GAE/g).

3.4. **Biodisponibilidade de ferro *in vitro***

A biodisponibilidade do ferro (Fe) foi avaliada de acordo com um modelo estabelecido de cultura de células Caco-2/digestão *in vitro* (GLAHN *et al.*, 1998; GLAHN, 2022), no *Plant, Soil and Nutrition Laboratory, Cornell University*. Os melados obtidos a partir de três genótipos de sorgo de maior conteúdo de ferro foram escolhidos para esse estudo (CMSXS 5021, CMSXS 5022 e CMSXS 5039), sendo comparados ao melado de cana-de-açúcar.

Resumidamente, as amostras de melados de sorgo e de cana-de-açúcar foram submetidas à digestão gástrica e intestinal simulada, com pepsina e extrato de pancreatina-bile, em pH, tempo e temperatura ideais para cada enzima. Para cada melado, a digestão e análise foram realizadas em triplicata. 0,5 g de melado foi usado para cada repetição da digestão *in vitro*. A digestão intestinal foi realizada em insertos cilíndricos fechados no fundo por membrana semipermeável e colocados em poços contendo monocamadas de células Caco-2 banhadas em meio de cultura. A absorção de ferro pelas monocamadas de células Caco-2 foi avaliada medindo as concentrações de ferritina nas células. Seis réplicas de cada medição de biodisponibilidade de Fe foram realizadas. Uma alíquota de 1,5 mL da amostra digerida foi transferida para o poço superior, permitindo que o ferro solúvel passasse pela membrana durante o balanço (6 oscilações/minuto por 120 minutos). O poço superior foi então removido

e as células foram incubadas por 22 horas. As células foram colhidas adicionando uma alíquota de água deionizada e colocando-as num sonificador (Instrumentos Lab-Line, Melrose Park, IL). As concentrações de ferritina e proteína total foram determinadas em uma alíquota da suspensão de células coletadas com um ensaio imunorradiométrico (ensaio de ferritina FERIRON II, Laboratórios Ramco, Houston, TX) e um ensaio colorimétrico (ensaio Bio-Rad DC Protein, BioRad, Hercules, CA), respectivamente. As células Caco-2 sintetizam ferritina em resposta a aumentos na concentração intracelular de ferro. Portanto, usamos a razão ferritina/proteína total (expressa em ng ferritina/mg proteína) como um índice da captação celular de ferro (TAKO; BAR; GLAHN, 2016; GLAHN, 2022).

3.5. Rotulagem nutricional

Foi calculado o percentual de contribuição de uma porção do melado de sorgo sacarino mais promissor e do melado de cana-de-açúcar na ingestão diária recomendada de nutrientes para adultos saudáveis, de acordo com a RDC 429/2020 (BRASIL, 2020) e com o Instituto de medicina, IOM (1997).

3.6. Análise estatística

Todos os dados foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Foi aplicada análise de variância *one-way* ANOVA, seguida pelo teste *post-hoc* de Dunnett para comparar os melados de sorgo com o melado de cana-de-açúcar e *one-way* ANOVA, seguida pelo teste *post-hoc* de Tuckey para comparação de médias entre os melados de sorgo. O nível de significância estabelecido para todos os testes foi de 5%. Todas as análises foram realizadas no software *GraphPad Prism* (*GraphPad* Software, San Diego, CA), versão 9.0.2.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKANDE, I. S.; OSENI, A. A.; AND BIOBAKU, O. A. Effects of aqueous extract of *Sorghum bicolor* on hepatic, histological and haematological indices in rats. *Journal of Cell and Animal Biology*, v. 4, n. 9, p. 137–142, 2010.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução CNNPA nº. 12, 24/07/1978. Disponível em: www.anvisa.gov.br/legis/resol. Acesso em: 22 nov. 2022.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 493, de 15 de abril de 2021. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3390773/RDC_493_2021_.pdf/363fcc3c-27ea-4274-b4af-b74c4444d84e. Acessado em: 22 nov. 2022.

ASIKIN, Y. *et al.* Compositions, Taste Characteristics, Volatile Profiles, and Antioxidant Activities of Sweet Sorghum (*Sorghum Bicolor* L.) and Sugarcane (*Saccharum Officinarum* L.) Syrups. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2018, 12 (2), 884–891.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of Analysis of the AOAC International. 21st ed. Gaithersburg, Md. AOAC, 2019.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed.. Gaithersburg, Maryland, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis of AOAC international. 20th ed.. Arlington, Virginia, v. 1, 2016.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Total Sugars in Molasses as Invert Sugar Lane-Eynon Constant Volume Volumetric Method. Official method of analysis (AOAC 968.28), 15th edn. Association of Official Analytical Chemistry Arlington, Virginia, USA, 1990.

AWIKA, J. M. *et al.* Screening Methods to Measure Antioxidant Activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 23, p. 6657–6662, 6 nov. 2003.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie - LWT.*, v.28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia alimentar para a população brasileira. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC 429, de 08 de outubro de 2020. Dispõe sobre a rotulagem nutricional dos alimentos embalados. Publicada no Diário Oficial da União em: 09/10/2020 | Edição: 195 | Seção: 1 | Página: 106.

BRÖHAN, M.; JERKOVIC, V.; COLLIN, S. Potentiality of Red Sorghum for Producing Stilbenoid-Enriched Beers with High Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 8, p. 4088–4094, 27 abr. 2011.

CAMASCHELLA, C. Iron metabolism and its disorders: iron deficiency. *Blood Review Series*, v. 133, n. 1, p. 30-39, 2019.

CAPPELLINI, M. D.; MUSALLAM, K. M.; TAHER, A. T. Iron deficiency anaemia revisited. *Journal of Internal Medicine*, v. 287, n. 2, p. 153–170, 1 fev. 2020.

CARDOSO, L.M. *et al.*. Sorghum (*Sorghum bicolor* L.): Nutrients, bioactive compounds, and potential impact on human health, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017. 57:2, 372-390, DOI: 10.1080/10408398.2014.887057

CHIOCCHETTI, G.M. *et al.* In Vitro Iron Bioavailability of Brazilian Food-Based by Products. *Medicines (Basel)*. 2018 May 16;5(2):45.

CONAB-BRAZILIAN NATIONAL FOOD SUPPLY AGENCY [COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO]. Acompanhamento da Safra Brasileira. *Boletim da Safra 2021*, v. 9, n. Terceiro levantamento, p. 60, 2022.

CORRÊA, S.R. *et al.* Cultivars of biofortified cowpea and sweet potato: Bioavailability of iron and interaction with vitamin A in vivo and in vitro. *Journal of Food Science*. 2020 Mar;85(3):816-823.

DA SILVA, B. P. *et al.* Soluble Extracts from Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) Affect Brush Border Membrane Functionality, Morphology and Intestinal Bacterial Populations In Vivo (*Gallus gallus*). *Nutrients*, v. 11, p. 2457, 2019.

DA SILVA, B. P.; MARTINO, H. S. D. ; TAKO, E. . Plant origin prebiotics affect duodenal brush border membrane functionality and morphology, in vivo (*Gallus Gallus*). *Food & Function*, v. 12, p. 6157-6166, 2021.

DE SANTIS, G.C. Anemia: definição, epidemiologia, fisiopatologia, classificação e tratamento. *Medicina (Ribeirão Preto)*.v. 52, n. 3, p. 239-251, 2019.

DESEO, M. A. *et al.* Antioxidant activity and polyphenol composition of sugarcane molasses extract. *Food Chemistry*, v. 314, p. 126180, 1 jun. 2020.

DIAS, D.M. *et al.* Iron Biofortified Carioca Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) - Based Brazilian Diet Delivers More Absorbable Iron and Affects the Gut Microbiota In Vivo (*Gallus Gallus*). *Nutrients*. 2018, 10 (12).

DISASA, T. *et al.* Mapping of QTLs Associated with °Brix and Biomass-Related Traits in Sorghum Using SSR Markers. *Sugar Tech*, v. 20, n. 3, p. 275–285, 1 jun. 2018.

EGGLESTON, G. *et al.* Macronutrient and Mineral Contents in Sweet Sorghum Syrups Compared to Other Commercial Syrup Sweeteners. *Journal of Agricultural and Food Research*. 2022, 7, 100276.

EGGLESTON, G. *et al.* Phenolic Contents, Antioxidant Potential and Associated Colour in Sweet Sorghum Syrups Compared to Other Commercial Syrup Sweeteners. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2021, 101 (2), 613–623.

ESPITIA-HERNÁNDEZ, P. *et al.* Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) as a potential source of bioactive substances and their biological properties, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020. 62:8, 2269-2280, DOI: 10.1080/10408398.2020.1852389

GATTERMANN, N. *et al.* The Evaluation of Iron Deficiency and Iron Overload. *Deutsches Ärzteblatt International*, v. 118, n. 49, p. 847, 2021.

GHO. Repositório de dados do Global Health Observatory 2016. Disponível em: <http://apps.who.int/gho/data/node.home>. Acesso em 23 mar. 2023.

GLAHN, R.P. *et al.* Caco-2 Cell Ferritin Formation Predicts Nonradiolabeled Food Iron Availability in an in Vitro Digestion/Caco-2 Cell Culture Model. *Journal of Nutrition*. 1998, 128 (9), 1555–1561.

GLAHN, R.P. The Caco-2 Cell Bioassay for Measurement of Food Iron Bioavailability. *Journal of Visualized Experiments*. 2022, 2022 (182).

GOMES, J. C. *Análise de Alimentos*. Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, Brasil, p.126, 2011.

INGLE, A.U.; GAIKWAD, A.R.; SUVARNA G.; KUSALKAR, D.V. Sweet Sorghum: an emerging smart biofuel crop. *Advances in BioResearch*, 9(1): 21-26, 2018.

INSTITUTE OF MEDICINE. *Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride*. Washington (DC): National Academy Press; 1997.

JAIN, R.; VENKATASUBRAMANIAN, P. Sugarcane Molasses – A Potential Dietary Supplement in the Management of Iron Deficiency Anemia. *Journal of Dietary Supplements*, v. 14, n. 5, p. 589–598, 3 set. 2017.

JARDIM, A. M. DA R. F. *et al.* Potencial produtivo da cultura do Sorghum bicolor (L.) Moench no semiárido brasileiro: revisão. *Pubvet*, v. 14, n. 4, p. 1–12, abr. 2020.

Jl, J. *et al.* Antioxidant and Anti-Diabetic Functions of a Polyphenol-Rich Sugarcane Extract. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 38, n. 8, p. 670–680, 17 nov. 2019.

KARDEŞ, Y. M. *et al.* Biochemical composition of selected lines from sorghum (*Sorghum bicolor* L.) landraces. *Planta*, v. 254, n. 2, p. 26, 6 ago. 2021.

KAYODÉ, A. P. P. *et al.* Uncommonly High Levels of 3-Deoxyanthocyanidins and Antioxidant Capacity in the Leaf Sheaths of Dye Sorghum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 4, p. 1178–1184, 23 fev. 2011.

KIM, M.; DAY, D. F. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 38, n. 7, p. 803–807, 29 jul. 2011.

KUMAR, S.B. *et al.* Iron Deficiency Anemia: Efficacy and Limitations of Nutritional and Comprehensive Mitigation Strategies. *Nutrients*. 2022 Jul 20;14(14):2976.

MARTINEZ, O. D. M. *et al.* Dry heated sorghum BRS 305 hybrid flour as a source of resistant starch and tannins improves inflammation and oxidative stress in Wistar rats fed with a high-fat high-fructose diet. *Food & Function*, v. 12, n. 18, p. 8738–8746, 21 set. 2021.

MARTINEZ, O. D. M. *et al.* Sorghum flour BRS 305 hybrid has the potential to modulate the intestinal microbiota of rats fed with a high-fat high-fructose diet. *European journal of nutrition*, 1 out. 2022.

MARTINO, H. S. D. *et al.* Chemical characterization and size distribution of sorghum genotypes for human consumption. *Revista do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo*, v. 71, n. 2, p. 337-344, 2012.

MASSEY, A. R.; REDDIVARI, L.; VANAMALA, J. The Dermal Layer of Sweet Sorghum (*Sorghum bicolor*) Stalk, a Byproduct of Biofuel Production and Source of Unique 3-Deoxyanthocyanidins, Has More Antiproliferative and Proapoptotic Activity than the Pith in p53 Variants of HCT116 and Colon Cancer Stem C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 14, p. 3150–3159, 9 abr. 2014.

MAXSON, E. D. E ROONEY, L. M. Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. *Cereal Chemistry*, 1972.

MERRILL, A. L.; WATT, B. K.; *Energy Value of Foods: Basis and Derivation*, revised; U. S. Department of Agriculture; *Agriculture Handbook n.º 74*, 1973.

MOKARIYA, L.K.; MALAM, K.V. Sorgo doce: uma colheita inteligente e multifuncional. In: MOHNOT, P. (ed.). *Boletim Eletrônico de Agricultura e Meio Ambiente*. Mahisagar, Estado de Gujarat, Índia: *Agriculture & Environment*, 2020. V.1, Ed. 1, p. 61-68.

NAOURA, G. *et al.* Characterization of semi-arid Chadian sweet sorghum accessions as potential sources for sugar and ethanol production. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 14947, 11 dez. 2020.

NEPA. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO*. 4 ed. Campinas, SP: UNICAMP, 2011. 113 p. Disponível em: <https://www.nepa.unicamp.br/taco/tabela.php?ativo=tabela>. Acesso em: 11 ago. 2023.

PAIVA, C. L. *et al.* Mineral content of sorghum genotypes and the influence of water stress. *Food Chemistry*. 2017 Jan 1;214:400 - 405.

PARRELLA, R.A.C. *et al.* Sorgo bioenergia. In: PEREIRA FILHO, I. A.; RODRIGUES, J. A. S. (ed.). *Sorgo: o produtor pergunta, a Embrapa responde*. Brasília, DF: Embrapa, 2015. cap. 17, p. 281-291. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).

PASRICHA, S. R. *et al.* Iron deficiency. *The Lancet*, v. 397, n. 10270, p. 233–248, 16 jan. 2021.

PISKIN, E. *et al.* Iron Absorption: Factors, Limitations, and Improvement Methods. *ACS Omega*. 2022 Jun 10;7(24):20441-20456.

PONTIERI, P. *et al.* Mineral contents in grains of seven food-grade sorghum hybrids grown in a Mediterranean environment. *Australian Journal of Crop Science*, v. 8, n. 11, p. 1550-1559, 2014.

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

QUEIROZ, V.A.V. *et al.* O sorgo na alimentação humana. In: PEREIRA FILHO, I. A.; RODRIGUES, J. A. S. (ed.). *Sorgo: o produtor pergunta, a Embrapa responde*. Brasília, DF: Embrapa, 2015. cap. 15, p. 247-266. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).

RODRIGUES, J. A. S. *et al.* Manejo cultural. In: PEREIRA FILHO, I. A.; RODRIGUES, J. A. S. (ed.). *Sorgo: o produtor pergunta, a Embrapa responde*. Brasília, DF: Embrapa, 2015. cap. 8, p. 123-139. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).

ROEMHILD, K. *et al.* Iron metabolism: pathophysiology and pharmacology. *Trends in pharmacological sciences*, v. 42, n. 8, p. 640-656, 2021.

RUFINO, M. S. M.; *et al.* Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Fortaleza: EMBRAPA Agroindústria Tropical, 2007. (EMBRAPA Agroindústria Tropical, Comunicado Técnico 127).

SILVEIRA, D.C. DA *et al.* CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICO DO MELADO DE SORGO GRANÍFERO SACARINO [*Sorghum biolor* (L) Moench]. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 6, n. 1, pág. 216 - 219, 9 de junho de 2011.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMAUUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and Other oxidation substrates and antioxidantes by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 1999, 299, 152-178.

ST-PIERRE, P. *et al.* Comparative analysis of maple syrup to other natural sweeteners and evaluation of their metabolic responses in healthy rats. *Journal of Functional Foods*, v. 11, n. C, p. 460–471, nov. 2014.

TAKO, E.; BAR, H.; GLAHN, R. P. The Combined Application of the Caco-2 Cell Bioassay Coupled with In Vivo (*Gallus Gallus*) Feeding Trial Represents an Effective Approach to Predicting Fe Bioavailability in Humans. *Nutrients*. 2016, 8 (11).

UCHIMIYA, M. *et al.* Chemical Analysis of Fermentable Sugars and Secondary Products in 23 Sweet Sorghum Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 65, n. 35, p. 7629–7637, 6 set. 2017.

WRIGHT, A. G.; ELLIS, T. P.; ILAG, L. L. Filtered Molasses Concentrate from Sugar Cane: Natural Functional Ingredient Effective in Lowering the Glycaemic Index and Insulin Response of High Carbohydrate Foods. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 69, n. 4, p. 310–316, 6 dez. 2014.

YANG, L. *et al.* Sorghum phenolics demonstrate estrogenic action and induce apoptosis in nonmalignant colonocytes. *Nutrition and Cancer*, 64, 419–427, 2012.

YANG, L.; BROWNING, J.D.; & AWIKA, J.M. Sorghum 3-deoxyanthocyanidins possess strong phase II enzyme inducer activity and cancer cell growth inhibition properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1797–1804, 2009.

YOUSIF, A; NHEPERA, D; JOHNSON, S. Influence of sorghum flour addition on flat bread in vitro starch digestibility, antioxidant capacity and consumer acceptability. *Food Chemistry* (2012) 134:880–887

5. RESULTADOS

Original paper published at Journal of Cereal Science, Impact Factor: 4.075.

DOI: 10.1016/j.jcs.2023.103759

ARTIGO 1:

Sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) molasses: physicochemical characterization and *in vitro* bioavailability of different genotypes

Andressa de Assis ^a, Bárbara Pereira da Silva ^a, Renata Celi Lopes Toledo ^a, Rafael Augusto da Costa Parrella ^b, Raymond P. Glahn ^c, Izabela Maria Montezano de Carvalho ^a, Valéria Aparecida Vieira Queiroz ^b, Hercia Stampini Duarte Martino ^a

^a Nutrition and Health Department. Federal University of Viçosa, Av. Purdue, s/n, Campus Universitário, Viçosa, MG, 36.570-900, Brazil

^b Embrapa Milho e Sorgo, Rote MG 424, Km 65, Sete Lagoas, MG, 35701-970, Brazil

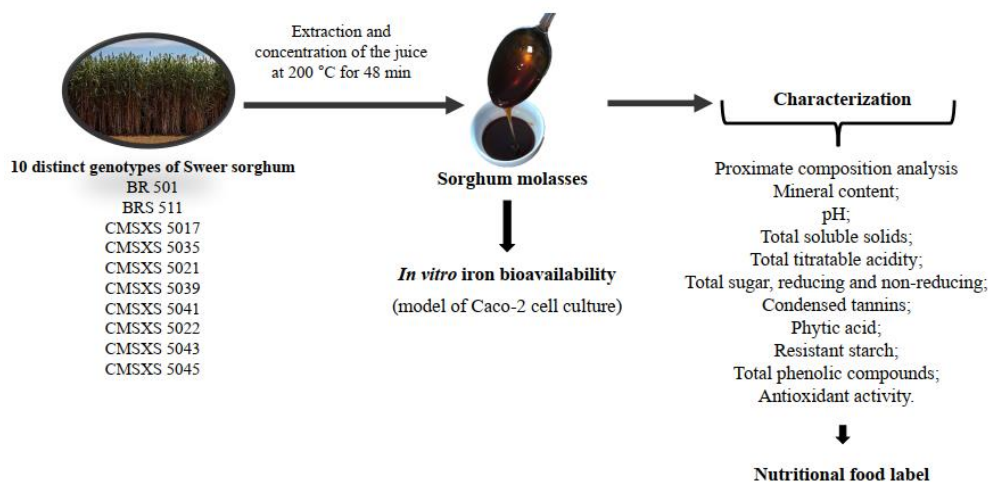
^c USDA-ARS, Robert W. Holley Center for Agriculture and Health, Cornell University, Ithaca, NY, 14850, USA

Abstract

The present study aimed to analyze the physicochemical composition, bioactive compound contents and iron bioavailability (*cell culture caco-2*) of sweet sorghum molasses of different genotypes and compare them to sugar cane molasses. Sorghum molasses presented proteins (0.28 - 2.90%), lipids (0.07 - 0.53%), total dietary fiber (0.00 - 2.85%), carbohydrates (90.16 - 93.29%), pH (4.67 - 4.95), acidity (0.3 - 0.45) and BRIX (38.2 - 58.5°). The sorghum molasses contained high ash concentration (3.30 - 6.86%) and calcium (397 - 966mg), compared to sugar cane (1.98% and 70 mg). Sorghum molasses presented higher levels of total phenolic compounds (19.3 - 48.4 mg GAE/g) compared to sugar cane (8.8 mg GAE/g). Ferritin concentration was higher in two sorghum molasses (6.3 - 6.8 ng/mg), compared to sugar cane (4.3 ng/mg). Thus, sorghum molasses proved to be a promising source of minerals and bioactive compounds and an excellent food to be used in human nutrition.

Keywords: sorghum syrup, proximate composition, sorghum honey, natural sweetener.

Graphical Abstract



1. INTRODUCTION

Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) is the fifth most common crop worldwide, which is used in products such as biscuits, breads, cakes, pancakes, couscous, alcoholic and non-alcoholic beverages (Frankowski et al., 2022). Among its cultivars, sweet sorghum, whose name derives from the high concentration of soluble sugars contained in its stems, has aroused the interest of the industry, as it can be used as a raw material for the production of biofuels, distilled beverages and food products (sweeteners, syrup) (Naoura et al., 2020).

Sweet sorghum resembles sugar cane (*Saccharum officinarum*) and has cultivation advantages, including reduced water requirements, shorter harvest cycles and reduced cultivation costs, due to less need for fertilizers (Massey et al., 2014). The chemical composition and nutritional value of sweet sorghum may vary according to climatic conditions and cultivation area. Studies have demonstrated that geographic location and climate can affect the concentration of nutrients in foods, especially phenolic compounds, minerals and bioactive compounds (Eggleston et al., 2022).

The excessive consumption of sugars is directly related to the high incidence of obesity and diabetes mellitus in the world, limiting its consumption by 10% of total energy intake (Valle et al., 2020). Although sweet sorghum molasses is a source of sugar, it is a natural sweetener

source of compounds that have potential health benefits, such as phytohormones, minerals and polyphenols. Studies with obese animals showed that natural sweeteners attenuated the development of insulin resistance and liver inflammation relative to refined sugar, suggesting that their consumption is a less harmful alternative than sucrose in the context of obesity (Valle et al., 2020).

Sweet sorghum molasses presented higher amounts of phenolic compounds and antioxidants compared to other commercialized syrups, predominantly phenolic acids (Eggleston et al., 2021). Among the minerals, sweet sorghum molasses produced in the United States of America (USA) and Japan are rich in magnesium (58 to 184 mg/100g), potassium (1710 to 3929 mg/100g), calcium (112 to 468 mg/100g), phosphorus (9 to 149 mg/100g) and iron (2 to 73 mg) (Asikin et al., 2018; Eggleston et al., 2022). The beneficial effects obtained by consuming sorghum molasses are still little known, but this food has the potential to be an alternative sweetener with promising beneficial effects on health. Furthermore, sorghum molasses is considered a minimally processed product, based on its minimal processing of grinding and concentration under heat.

There are few studies that have evaluated the chemical characterization and bioactive compounds of sweet sorghum, so far have shown that this product has the potential to be an excellent natural sweetener alternative, being rich in minerals and bioactive compounds with antioxidant activity (Asikin et al., 2018; De Fontes et al., 2011; Eggleston et al., 2022, 2021). Due to the increase in sweet sorghum production in some countries, such as Brazil, it is important to know about the physical-chemical characterization of molasses from sweet sorghum genotypes produced in tropical areas, especially in relation to mineral content. Further, sugarcane molasses is already used as a dietary supplement to aid in the treatment of anemia due to its high iron content (Asikin et al., 2018). It is expected that sweet sorghum molasses will present differences in their physicochemical composition, being rich in minerals and with

good in vitro iron bioavailability, matching sugarcane molasses. Thus, this study aimed to analyze the physical-chemical composition and the content of bioactive compounds of different genotypes of sweet sorghum molasses and to investigate the in vitro iron bioavailability, comparing it with sugar cane, a traditional source of sugar syrups.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Study raw material

Ten different genotypes of sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) were used to prepare molasses. The genotypes were provided by Embrapa Milho e Sorgo, namely: BR 501, BRS 511, CMSXS 5017, CMSXS 5035, CMSXS 5021, CMSXS 5039, CMSXS 5041, CMSXS 5022, CMSXS 5043 and CMSXS 5045, and cultivated in Sete Lagoas, Minas Gerais, Brazil, from November/2021 to April/2022, when they reached the state of physiological maturation of the stem. The entire experimental plot of the production field was used, which corresponded to a row of five meters with approximately 45 plants of each genotype. The stems of the plants were crushed and ground in a sugar cane mill (Maqtron B-72, Brazil) yielding approximately 7 liters of juice. The juice was concentrated in a stainless-steel pan, at 200 °C, for 48 min, until it reached a boiling temperature of 105 °C, obtaining the consistency of molasses. Then, it was stored at room temperature (25°C) in an amber bottle until the time of analysis.

The sugar cane (*Saccharum officinarum*) used to produce sugar cane molasses was scraped and ground in a manual mill (Botine B60, Brazil). Next, its juice was concentrated under the same conditions as sorghum molasses and stored at room temperature (25°C).

2.2. Proximate composition analysis

The moisture, lipids, ash and proteins were determined according to the Official Analytical Chemistry Association (AOAC, 2019). Total dietary fiber (FAT), insoluble dietary fiber (FAI) and soluble dietary fiber (FAS) were evaluated according to the enzymatic gravimetric method (AOAC, 2019), using a specific kit (Megazyme®). Carbohydrates were

calculated as the difference, using the following equation: [100 - (% moisture + % lipids + % proteins + % total dietary fiber + % ash)]. The energy value was obtained through the principles proposed by Merrill and Watt (1973), and calculated according to the Atwater system. The values of proteins, lipids and carbohydrates were 4, 9, and 4 kcal/g, respectively.

2.3. Determination of mineral content

The concentrations of iron (Fe), zinc (Zn), phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), copper (Cu), manganese (Mn), sodium (Na) and chromium (Cr) were determined, in triplicate. The minerals content was analyzed by acid digestion method with a nitric acid in a block digester. For calcium and magnesium, strontium chloride hexahydrate solution was added in order to avoid underestimation. Mineral content was analyzed by atomic emission spectrophotometry with argon inductively coupled plasma (model "OPTIMA 8300", Perkin Elmer brand) under the conditions of 1,300 W, cooling airflow of 15 L.min⁻¹, auxiliary air flow rate of 0.7 L.min⁻¹, carrier gas flow rate 0.5 L.min⁻¹, sample speed introduction of 1.5 mL.min⁻¹, observation height of 15 mm and use of a Meinhard nebulizer (Gomes; Oliveira, 2011).

2.4. Determination of pH, total soluble solids, total titratable acidity and quantification of total, reducing and non-reducing sugar

The pH and total soluble solids were determined according to the methodology proposed by the AOAC (AOAC, 2019), with samples diluted in the proportions of 1:10 and 1:5 (molasses: water), respectively, using a digital pHmeter (Bel engineering, 966 Plus, China) and refractometer (Instrutherm, RDT-65, Brazil), at 25 °C. The total titratable acidity was determined according to the AOAC (AOAC, 2019), with titration of the samples, diluted in the ratio of 1:10 (molasses: water), with sodium hydroxide 0.1 mol L⁻¹.

The determination of reducing sugars in glucose and total sugar was obtained by the Lane & Eynon method, using a standard 1% glucose solution and Fehling's solutions (AOAC,

1990). The sucrose content was calculated by the difference between total sugar and glucose, multiplied by the sucrose conversion factor (0.95), and the fructose content was calculated by the difference.

2.5. Determination of condensed tannins, phytic acid and resistant starch

Condensed tannins were analyzed using the vanillin/HCl reaction method (Price, 1978). The absorbance reading was held in spectrophotometer (MultiskanGo, Thermoscientific, USA) at 500 nm. The results were expressed as milligrams of catechin per kilogram of sample, according to the analytical curve of catechin. For standard curve, 200 mg of catechin were weighed in a volumetric flask (200 mL), and the volume was completed with methanol. Aliquots of 5, 10, 20, 25 and 50 mL were used for standard curve. The phytic acid and resistant starch content was determined using a commercial kit (Megazyme®), according to the manufacturer's recommendations. Phytic acid was determined colorimetrically (MultiskanGo, Thermoscientific, USA), at 500 nm. An analytical curve of phytic acid was prepared in concentrations of 10–100 $\mu\text{g/mL}$, to express the concentration of phytic acid in g/100g of the sample. Resistant starch was determined colorimetrically (MultiskanGo, Thermoscientific, USA), at 510 nm. Resistant starch concentration was expressed in g/100g of the sample.

2.6. Antioxidant activity and total phenolic compounds

2.6.1. Extracts preparation

The following solvents were used: 1) 80% acetone, 2) 80% methanol and 3) solvent mixture containing 50% methanol, acetone 70% and water (40:40:20) to extract the antioxidant activity and total phenolic compounds. Samples were added to the extracts (0.5g/5ml) and the suspension was automatically stirred (16 h, 25 °C) and centrifuged (3000 rpm/ 10 min) (NovaTecnica, model NT 815, Brazil). The supernatant was transferred to a new tube and stored in a freezer (-18 ± 1 °C) until the time of analysis.

2.6.2. Radical removal activity (DPPH)

In a test tube, protected from light, 100 μ L of the extracts obtained in the previous step were added to 1.5 mL of methanolic DPPH solution (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and stirred by vortex (3000 rpm), for 30 s. After 30 min of standing, the absorbance of the solution was read in a spectrophotometer (Thermo scientific, 606 Evolution, USA), at 517 nm. The analytical curve was constructed using a 50–100 μ mol/L trolox solution. The antiradical activity was expressed in a μ mol trolox equivalent/g of the sample (μ mol trolox/g) (Brand-Williams et al., 1995).

2.6.3. Determination of the content of total phenolic compounds

The total phenolic content was determined in the extracts, using the Folin-Ciocalteu method (Singleton et al., 1999). Aliquots of 0.5 mL of the extract were added to 0.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent (20%). After homogenization, 0.5 mL of sodium carbonate (7.5%) was added. The reaction mixture was homogenized by vortex (3000 rpm) and incubated at room temperature (30 min). The reading of absorbance was performed in spectrophotometer (Thermo scientific, Evolution 606, USA), at 765 nm. The analytical curve of gallic acid (0,005–0,10 mg/mL) was used to quantify the compounds. The results were expressed in mg of gallic acid equivalents/g of the sample (mg GAE/g).

2.7. Assessment of in vitro iron bioavailability

The iron (Fe) bioavailability was evaluated according to an established model of Caco-2 cell culture/*in vitro* digestion (Glahn, 2022). Three sorghum genotypes with high iron concentration were selected for the *in vitro* bioavailability study (CMSXS 5021, CMSXS 5022 and CMSXS 5039). The results were compared to the values of sugar cane molasses. Samples of sorghum and sugar cane molasses were submitted to simulated gastric and intestinal digestion. For each variety of molasses, digestion and analysis were carried out in triplicate. 0.5 g of molasses were used for each repetition of *in vitro* digestion (Glahn, 2022).

The protocols used in the analysis of ferritin and total protein content of Caco-2 cells were similar to those previously described (Glahn, 2022). All glassware used in sample preparation and analysis was washed with acid.

2.8. Nutritional food label

The sorghum molasses presenting the highest iron bioavailability were selected for labeling, compared to sugar cane molasses. The percentage contribution of a portion of these products to the recommended daily intake of nutrients for adults was calculated, according to the RDC 429/Brazil/2020 (BRASIL, 2020).

2.9. Statistical analysis

All data were subjected to the Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov normality tests. One-way ANOVA analysis of variance was applied, followed by Dunnett's post-hoc test to compare the different genotypes of sorghum molasses with sugar cane molasses. In addition, one-way ANOVA was used, followed by the Tuckey's post-hoc test to compare the means among sweet sorghum molasses. The significance level established for all tests was 5%. All analyses were performed using the GraphPad Prism software system (GraphPad Software, San Diego, CA), version 9.0.2.

3. RESULTS

Proximate composition

The proximate composition and total energy value of the evaluated samples are presented on a dry basis (table 1). Differences ($p < 0.05$) were observed among the molasses of sorghum genotypes and between the sorghum genotypes and sugar cane molasses, for all compounds analyzed. The genotypes of sorghum molasses presented a percentage of protein ranging from 0.28 to 2.90%; lipids from 0.07 to 0.62%; total dietary fiber from 0.00 to 2.85%; soluble dietary

fiber from 0.00 to 1.60%; insoluble dietary fiber from 0.00 to 1.71%; and carbohydrates from 90.16 to 93.29%.

The genotypes of sorghum molasses presented high concentration of ash (3.30 – 6.86%), compared to sugar cane. It is observed that, among the genotypes, the CMSXS 5017 and BRS 511 sorghum molasses contained lower ($p < 0.05$) ash content (3.61 and 3.73 %, respectively), higher ($p < 0.05$) protein content (2.90% and 2.68%, respectively) and higher ($p < 0.05$) caloric densities (387.91 and 385.61 Kcal/100g) (table 1).

Sorghum molasses did not differ ($p > 0.05$) from sugar cane molasses in terms of total acidity levels; however, sugar cane molasses presented the highest ($p < 0.05$) pH among the samples (5.79). These parameters did not differ ($p > 0.05$) among the sorghum genotypes evaluated. For total soluble solids, the value of sugar cane molasses (73.17 °BRIX) was lower ($p < 0.05$) than most sorghum samples (74.33 - 79.50 °BRIX), excepting BR 501 and CMSXS 5035 molasses (63.83 and 70.0 °BRIX, respectively). Sucrose is the most prevalent type of carbohydrate in all samples. However, due to its lower glucose content, sugar cane molasses obtained a higher ($p < 0.05$) sucrose (40.23%)/reducing sugar ratio (glucose and fructose, 8.67%) among the samples. Most genotypes of sorghum molasses differed ($p < 0.05$) in relation to total sugar (38.18 - 58.49%) and carbohydrate types (12.53 to 16.98% of glucose, 22.13 to 39.43% of sucrose and 1.16 to 2.08% of fructose) (Table 2).

Sorghum molasses presented higher ($p < 0.05$) concentrations of phytic acid compared to sugar cane molasses (0.01 g/100g), such as the genotypes BR 501 (0.04 g/100g), CMSXS 5021 (0.04g/100g), CMSXS 5045 (0.04g/100g), BRS 511 (0.05 g/100g) and CMSXS 5043 (0.07g/100g). The samples exhibited undetectable amounts of condensed tannins. In relation to resistant starch, two genotypes of sorghum molasses, CMSXS 5021 (0.43 g/100g) and CMSXS 5039 (0.34 g/100g), differed from sugar cane molasses (0.14g/100g), for their higher ($p < 0.05$) concentrations of this compound (Table 2).

Among the minerals, iron, zinc and calcium stand out in some genotypes of sorghum molasses. Molasses from CMSXS 5039 and CMSXS 5022 sorghum genotypes presented higher ($p<0.05$) concentrations of iron (48.69 and 45.56 mg/100g, respectively) compared to sugar cane molasses (35.23 mg/100g). Regarding zinc, BRS 511, CMSXS 5017, CMSXS 5021, CMSXS 5041 and CMSXS 5045 genotypes of sorghum molasses presented higher ($p<0.05$) content (1.14, 1.14, 1.27, 1.47 and 1.34 mg/100g, respectively) than sugar cane molasses (0.69 mg/100g). All sorghum molasses presented higher ($p<0.05$) concentrations of calcium (396.73 to 965.50 mg/100g), compared to sugar cane molasses (70.42 mg/100g). Further, the CMSXS 5021 genotype presented the highest ($p<0.05$) calcium content (965.5 mg/100g). Manganese was the only mineral present in greater amounts ($p<0.05$) in sugar cane molasses (149.90 mg/100g), compared to sorghum molasses (1.17 – 2.54 mg/100g) (Table 3).

TABLE 1. Proximate composition of sugar cane molasses and different sweet sorghum genotypes, Brazil, 2022.

	Moisture (%)	Protein (%)	Ash (%)	Lipid (%)	Total Fiber (%)	Soluble Fiber (%)	Insoluble Fiber (%)	Carbohydrate (%)	Caloric density (Kcal/100 g ⁻¹)
Sugar cane molasses	6.27 ± 0.43	2.03 ± 0.02	1.98 ± 0.02	0.06 ± 0.03	1.17 ± 0.14	1.17 ± 0.14	0.00 ± 0.00	94.76 ± 0.05	387.67 ± 0.11
Sorghum molasses BR 501	17.14 ± 0.84 * a	0.93 ± 0.02 * efg	3.30 ± 0.01 * g	0.22 ± 0.10 bcd	2.35 ± 0.81 * ab	0.64 ± 0.09 * bc	1.71 ± 0.90 * a	92.99 ± 0.36 * ac	379.54 ± 1.88 * bc
Sorghum molasses BRS 511	9.82 ± 0.21 * b	2.68 ± 0.37 ab	3.73 ± 0.07 * f	0.47 ± 0.04 *abc	0.45 ± 0.02 cd	0.21 ± 0.04 * de	0.24 ± 0.02 cd	92.68 ± 0.38 * ac	385.61 ± 0.29 a
Sorghum molasses CMSXS 5017	9.69 ± 0.67 * b	2.90 ± 0.50 * a	3.61 ± 0.06 * f	0.26 ± 0.06 abcd	0.00 ± 0.00 * d	0.00 ± 0.00 * e	0.00 ± 0.00 d	93.03 ± 0.30 * ab	387.91 ± 1.83 a
Sorghum molasses CMSXS 5035	4.04 ± 0.34 * de	2.20 ± 0.46 abcd	4.26 ± 0.03 * de	0.10 ± 0.04 cd	1.45 ± 0.25 bc	0.84 ± 0.06 * b	0.61 ± 0.19 abcd	91.99 ± 0.40 * c	377.63 ± 0.12 * cd
Sorghum molasses CMSXS 5021	10.15 ± 0.18 * b	1.99 ± 0.54 ade	6.86 ± 0.11 * a	0.53 ± 0.14 * ab	0.00 ± 0.00 * d	0.00 ± 0.00 * e	0.00 ± 0.00 d	90.62 ± 0.74 * d	375.24 ± 0.38 * de
Sorghum molasses CMSXS 5039	5.15 ± 0.71 d	0.28 ± 0.48 * g	5.06 ± 0.04 * c	0.07 ± 0.04 ^d	1.47 ± 0.09 bc	0.00 ± 0.00 * e	1.47 ± 0.09 * ab	93.13 ± 0.48 * ab	374.27 ± 0.21 * e
Sorghum molasses CMSXS 5041	2.79 ± 0.08 * e	1.02 ± 0.38 * efg	5.35 ± 0.08 * b	0.62 ± 0.38 * a	2.85 ± 0.08 * a	1.60 ± 0.15 * a	1.25 ± 0.07 * abc	90.16 ± 0.30 * d	370.31 ± 1.89 * f
Sorghum molasses CMSXS 5022	4.20 ± 0.36 * d	2.38 ± 0.92 acd	4.38 ± 0.02 * d	0.15 ± 0.01 bcd	1.05 ± 0.17 cd	0.29 ± 0.02 * d	0.75 ± 0.15 abcd	92.08 ± 0.08 * bc	379.06 ± 0.13 * bc
Sorghum molasses CMSXS 5043	7.2 ± 0.40 * c	1.63 ± 0.08 ed	4.12 ± 0.13 * e	0.13 ± 0.03 cd	0.84 ± 0.20 cd	0.47 ± 0.10 * cd	0.37 ± 0.10 bcd	93.28 ± 0.09 * a	380.77 ± 0.47 * b
Sorghum molasses CMSXS 5045	3.81 ± 0.35 * de	1.58 ± 0.01 ed	4.15 ± 0.13 * e	0.13 ± 0.06 cd	0.83 ± 0.23 cd	0.40 ± 0.05 * cd	0.45 ± 0.18 bcd	93.29 ± 0.17 * a	380.68 ± 0.33 * b

Values in dry matter, expressed as mean and standard deviation (referring to three replications). Different letters in the column indicate significant differences by the Tuckey's test at 5% probability and * indicates difference from sugar cane molasses by the Dunnett test ($p < 0.05$).

TABLE 2. Physicalchemical composition and bioactive compounds of sugar cane molasses and different genotypes of sweet sorghum, Brazil, 2022.

	pH	Total acidity	Total soluble solids	Total sugar (%)	Glucose (%)	Sucrose (%)	Fructose (%)	Phytic Acid (g/100g)	Condensed tannins (mg EC/Kg)	Resistant starch (g/100g)
Sugar cane molasses	5.79 ± 0,05	0.33 ± 0.06	73.17 ± 0.58	48.90 ± 1.12	6.55 ± 0.48	40.23 ± 1.08	2.12 ± 0.06	0.01 ± 0.00	Nd	0.14 ± 0.02
Sorghum molasses BR 501	4.80 ± 0.01 *a	0.40 ± 0.00 a	63.83 ± 0.29 *g	58.49 ± 1.55 *a	16.98 ± 0.60 *ab	39.43 ± 1.50 a	2.08 ± 0.08 a	0.04 ± 0.00 *bc	Nd	0.05 ± 0.01 d
Sorghum molasses BRS 511	4.95 ± 0.01 *a	0.30 ± 0.00 a	76.83 ± 0.29 *b	50.83 ± 2.17 cd	15.70 ± 0.20 *cd	33.38 ± 1.88 *b	1.76 ± 0.10 *b	0.05 ± 0.01 *b	Nd	0.08 ± 0.02 d
Sorghum molasses CMSXS 5017	4.95 ± 0.05 *a	0.30 ± 0.00 a	76.83 ± 0.29 *b	54.83 ± 0.45 *ab	16.32 ± 0.08 *bc	36.58 ± 0.24 *ab	1.93 ± 0.01 *ab	0.02 ± 0.00 de	Nd	0.13 ± 0.01 cd
Sorghum molasses CMSXS 5035	4.71 ± 0.13 *a	0.30 ± 0.14 a	70.00 ± 0.00 *f	53.46 ± 1.45 *bc	15.00 ± 0.43 *de	36.54 ± 1.12 *ab	1.92 ± 0.06 *ab	0.01 ± 0.00 c	Nd	0.16 ± 0.04 cd
Sorghum molasses CMSXS 5021	4.94 ± 0.02 *a	0.40 ± 0.00 a	74.33 ± 0.29 *e	41.21 ± 0.87 *f	16.57 ± 0.18 *ac	23.41 ± 0.78 *d	1.23 ± 0.04 *d	0.04 ± 0.01 *cd	Nd	0.43 ± 0.07 *a
Sorghum molasses CMSXS 5039	4.70 ± 0.15 *a	0.45 ± 0.07 a	76.00 ± 0.00 *c	46.70 ± 1.33 e	17.61 ± 0.57 *a	27.64 ± 0.83 *c	1.45 ± 0.04 *c	0.02 ± 0.00 de	Nd	0.34 ± 0.07 *ab
Sorghum molasses CMSXS 5041	4.77 ± 0.05 *a	0.40 ± 0.00 a	79.50 ± 0.50 *a	41.20 ± 1.62 *f	13.95 ± 0.39 *e	25.89 ± 1.71 *cd	1.36 ± 0.09 *cd	0.02 ± 0.00 de	Nd	0.12 ± 0.03 cd
Sorghum molasses CMSXS 5022	4.77 ± 0.07 *a	0.37 ± 0.07 a	76.00 ± 0.00 *c	41.55 ± 2.08 *f	14.76 ± 0.56 *de	25.45 ± 1.63 *cd	1.34 ± 0.09 *cd	0.01 ± 0.00 c	Nd	0.05 ± 0.01 d
Sorghum molasses CMSXS 5043	4.74 ± 0.08 *a	0.45 ± 0.07 a	75.33 ± 0.29 *cd	47.97 ± 1.86 de	12.53 ± 0.37 *f	33.67 ± 2.12 *b	1.77 ± 0.11 *b	0.07 ± 0.00 *a	Nd	0.25 ± 0.04 bc
Sorghum molasses CMSXS 5045	4.67 ± 0.01 *a	0.40 ± 0.00 a	75.00 ± 0.00 *de	38.18 ± 0.93 *f	14.88 ± 0.69 *de	22.13 ± 0.56 *d	1.16 ± 0.03 *d	0.04 ± 0.00 *bc	Nd	0.13 ± 0.04 cd

Values in dry matter, expressed as mean and standard deviation (referring to three replications). Different letters in the column indicate significant differences by the Tuckey's test at 5% probability and * indicates difference with sugar cane molasses by the Dunnett test (p<0.05). Nd: not detected.

The total phenol content and antioxidant activity of both sorghum molasses and sugarcane molasses were affected by the solvents used (Figure 1), with lower values for extracts with 80% acetone ($p < 0.05$). Sugarcane molasses showed better total phenolic compounds and antioxidant activity using the mixture (40:20:20 v/v; methanol:acetone:water) compared to 80% methanol. For sorghum molasses, most genotypes had no difference in antioxidant activity using 80% methanol and mixture solvents ($p > 0.05$), and to total phenolic compounds the mixture of solvents provided a more efficient extraction (Supplementary material: Tables 1 and 2).

All genotypes of sorghum molasses presented higher ($p < 0.05$) antioxidant activity and total phenolic contents in all extracts, compared to sugar cane (Supplementary material: Tables 1 and 2). Then, we presented the DPPH and total phenolic values, using mixture extraction in Table 4. It is observed that the CMSXS 5021 and 5039 genotypes of molasses presented higher ($p < 0.05$) DPPH contents (11.0 and 10.6 $\mu\text{Mol Trolox/g sample}$, respectively) and total phenolics (48.4 and 34.6 mg GAE/g sample , respectively), which is approximately twice the value found in sugar cane for antioxidant activity and 4 to 5 times more total phenolics.

TABLE 3. Mineral composition of sugar cane molasses and different sweet sorghum genotypes, Brazil, 2022.

	Fe (mg/100g)	Cu (mg/100g)	Zn (mg/100g)	Mn (mg/100g)	Mg (mg/100g)	Ca (mg/100g)	K (mg/100g)	P (mg/100g)	Na (mg/100g)	Cr (mg/100g)
Sugar cane molasses	35.23 ± 0.22	0.19 ± 0.01	0.69 ± 0.03	3.43 ± 0.05	149.90 ± 3.77	70.42 ± 0.00	1000.21 ± 2.26	88.55 ± 1.51	4.62 ± 0.62	Nd
Sorghum molasses BR 501	13.87 ± 0.12 ^{*f}	0.17 ± 0.01 ^{*dc}	0.55 ± 0.01 ^{*c}	1.37 ± 0.03 ^{*c}	165.94 ± 0.85 ^{*d}	442.92 ± 1.71 ^{*g}	1170.65 ± 5.12 ^{*a}	115.25 ± 0.85 ^{*b}	4.43 ± 0.70 ^f	Nd
Sorghum molasses BRS 511	23.26 ± 0.09 ^{*d}	0.18 ± 0.00 ^d	1.14 ± 0.04 ^{*c}	1.74 ± 0.01 ^{*b}	208.47 ± 1.57 ^{*b}	570.53 ± 0.78 ^{*d}	1128.23 ± 0.78 ^{*ab}	133.62 ± 0.78 ^{*a}	29.39 ± 0.78 ^{*b}	Nd
Sorghum molasses CMSXS 5017	23.53 ± 0.37 ^{*d}	0.18 ± 0.00 ^d	1.14 ± 0.06 ^{*c}	1.72 ± 0.03 ^{*b}	208.17 ± 0.00 ^{*b}	580.78 ± 5.48 ^{*d}	1113.94 ± 0.00 ^{*b}	132.32 ± 0.78 ^{*a}	35.43 ± 1.57 ^{*a}	Nd
Sorghum molasses CMSXS 5035	22.29 ± 0.16 ^{*dc}	0.13 ± 0.00 ^{*g}	0.49 ± 0.02 ^{*c}	1.37 ± 0.02 ^{*c}	127.66 ± 0.74 ^{*f}	416.84 ± 2.95 ^{*h}	1033.76 ± 8.84 ^c	64.61 ± 0.00 ^{*g}	5.73 ± 0.74 ^{cf}	Nd
Sorghum molasses CMSXS 5021	29.27 ± 0.39 ^{*c}	0.42 ± 0.02 ^{*a}	1.27 ± 0.08 ^{*bc}	2.51 ± 0.07 ^{*a}	286.03 ± 0.00 ^{*a}	965.50 ± 0.79 ^{*a}	1107.96 ± 10.23 ^{*b}	85.70 ± 1.57 ^c	10.02 ± 0.00 ^{*cd}	Nd
Sorghum molasses CMSXS 5039	48.69 ± 0.89 ^{*a}	0.25 ± 0.01 ^{*b}	0.74 ± 0.04 ^d	2.54 ± 0.09 ^{*a}	174.49 ± 3.73 ^{*c}	659.46 ± 8.20 ^{*c}	1032.16 ± 8.95 ^c	66.95 ± 0.75 ^{*g}	8.96 ± 0.75 ^{*cd}	Nd
Sorghum molasses CMSXS 5041	20.74 ± 0.02 ^{*c}	0.23 ± 0.01 ^{*c}	1.47 ± 0.04 ^{*a}	2.42 ± 0.06 ^{*a}	208.31 ± 2.18 ^{*b}	756.10 ± 4.36 ^{*b}	1028.19 ± 2.18 ^c	99.27 ± 0.73 ^{*d}	9.77 ± 0.73 ^{*cd}	Nd
Sorghum molasses CMSXS 5022	45.56 ± 0.84 ^{*b}	0.10 ± 0.01 ^{*h}	0.77 ± 0.02 ^d	1.36 ± 0.04 ^{*c}	138.31 ± 0.74 ^{*e}	518.27 ± 8.12 ^{*f}	980.69 ± 15.50 ^c	88.20 ± 0.74 ^c	7.31 ± 0.00 ^{*de}	Nd
Sorghum molasses CMSXS 5043	21.53 ± 0.91 ^{*c}	0.13 ± 0.01 ^{*fg}	0.59 ± 0.06 ^c	1.17 ± 0.05 ^{*d}	108.79 ± 3.83 ^{*g}	396.73 ± 9.95 ^{*h}	1028.36 ± 18.37 ^c	76.86 ± 3.06 ^{*f}	5.41 ± 1.53 ^{ef}	Nd
Sorghum molasses CMSXS 5045	21.25 ± 0.51 ^{*c}	0.15 ± 0.00 ^{*ef}	1.34 ± 0.04 ^{*b}	1.78 ± 0.02 ^{*b}	180.37 ± 0.74 ^{*c}	542.68 ± 0.00 ^{*c}	1027.65 ± 33.08 ^c	108.64 ± 0.74 ^{*c}	11.96 ± 0.74 ^{*c}	Nd

Values in dry matter, expressed as mean and standard deviation (referring to three replications). Different letters in the column indicate significant differences by the Tuckey's test at 5% probability and * indicates difference from sugar cane molasses by the Dunnett test (p<0.05). Fe: iron; Cu: copper; Zn: zinc; Mn: manganese; Mg: magnesium; Ca: calcium; K: potassium; P: phosphorus; Na: sodium; Cr: chromium; Nd: not detected.

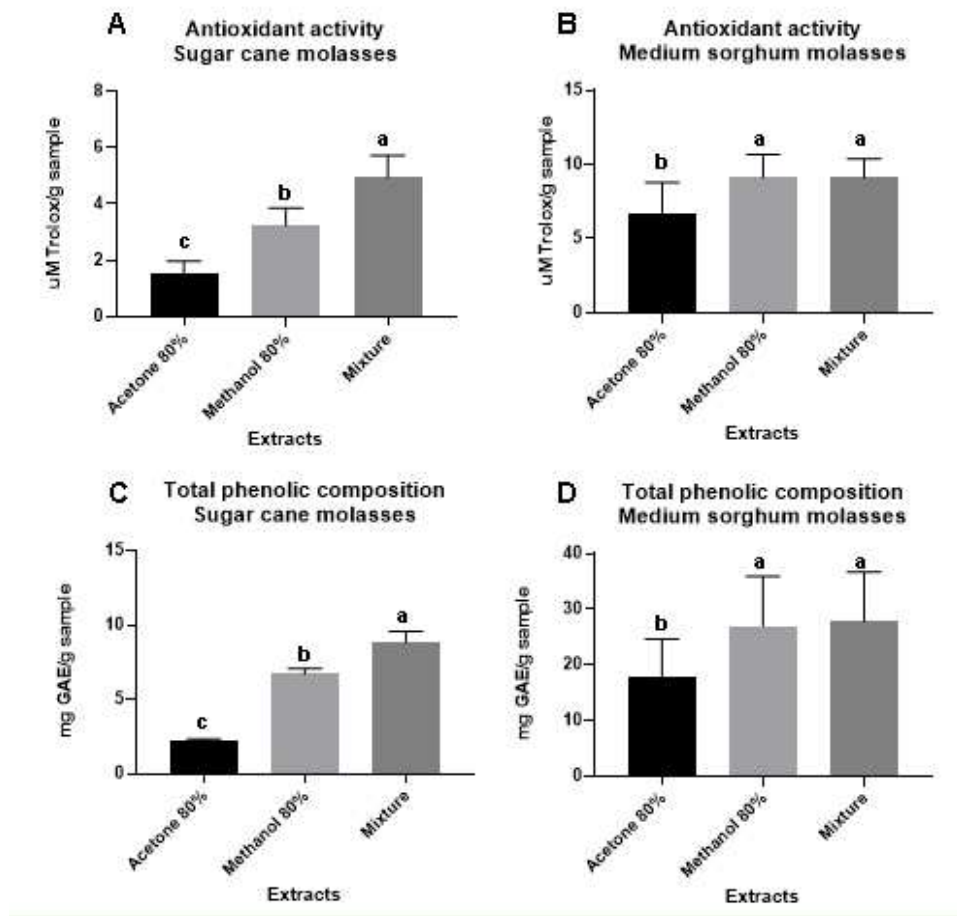


Figure 1. Antioxidant activity and total phenolic compounds in sorghum and sugar cane molasses by different extracts. Antioxidant activity in (A) sugar cane molasses and (B) the average of the 10 sorghum genotypes; total phenolic composition in (C) sugar cane molasses and (D) the average of the 10 sorghum genotypes. Mixture: methanol 50%: acetone 70%: water (40:40:20). Different letters in the column indicate significant differences between the extracts by the Tuckey's test, at 5% probability.

TABLE 4. Antioxidant activity and total phenolic composition of sugar cane molasses and different genotypes of sweet sorghum, extracted by methanol 50%: acetone 70%: water (40:40:20), Brazil, 2022.

	Antioxidant activity (uMol Trolox/g sample)	Total phenolic composition (mg GAE/g sample)
Sugar cane molasses	4.94 ± 0.78	8.84 ± 0.74
Sorghum molasses BR 501	8.13 ± 0.45 ^{*de}	19.62 ± 0.82 ^{*e}
Sorghum molasses BRS 511	9.91 ± 0.23 ^{*b}	29.27 ± 0.62 ^{*c}
Sorghum molasses CMSXS 5017	9.77 ± 0.35 ^{*b}	28.50 ± 0.91 ^{*c}
Sorghum molasses CMSXS 5035	8.84 ± 0.41 ^{*cd}	23.76 ± 0.26 ^{*d}
Sorghum molasses CMSXS 5021	11.03 ± 0.31 ^{*a}	48.38 ± 0.58 ^{*a}
Sorghum molasses CMSXS 5039	10.62 ± 0.19 ^{*ab}	34.64 ± 0.78 ^{*b}
Sorghum molasses CMSXS 5041	9.51 ± 0.48 ^{*bc}	28.80 ± 0.87 ^{*c}
Sorghum molasses CMSXS 5022	8.59 ± 0.32 ^{*d}	24.24 ± 0.58 ^{*d}
Sorghum molasses CMSXS 5043	7.42 ± 0.50 ^{*ef}	19.31 ± 0.43 ^{*e}
Sorghum molasses CMSXS 5045	7.08 ± 0.52 ^{*f}	19.92 ± 0.85 ^{*e}

Values in dry matter, expressed as mean and standard deviation (referring to three replications). Different letters in the column indicate significant differences between the extracts by the Tuckey's test, at 5% probability, and * indicates difference from sugar cane molasses by the Dunnett test.

***In vitro* iron bioavailability**

The sorghum molasses CMSXS 5021, CMSXS 5022 and CMSXS 5039, which presented higher ($p < 0.05$) iron contents, were selected for an *in vitro* iron bioavailability assay. Ferritin, the cellular Fe storage protein, was used as an indicator of the bioavailability of this mineral (Supplementary Material – Table 3). Even though CMSXS 5021 molasses presented lower ($p < 0.05$) iron concentration (29.27 mg/100g), compared to sugar cane (35.23 mg/100g), the ferritin concentration (5.05 ng/mg of protein) in the exposed Caco-2 cells was equal to that in sugar cane (4.33 ng/mg of protein). CMSXS 5022 and 5039 molasses exhibited higher ($p < 0.05$) concentrations of both iron (45,56 and 48.9 mg/100g, respectively) and ferritin (6.33

and 6.82 ng/mg of protein, respectively), compared to sugar cane. These results indicate higher ($p < 0.05$) amounts of bioavailable Fe in sorghum molasses (Figure 2).

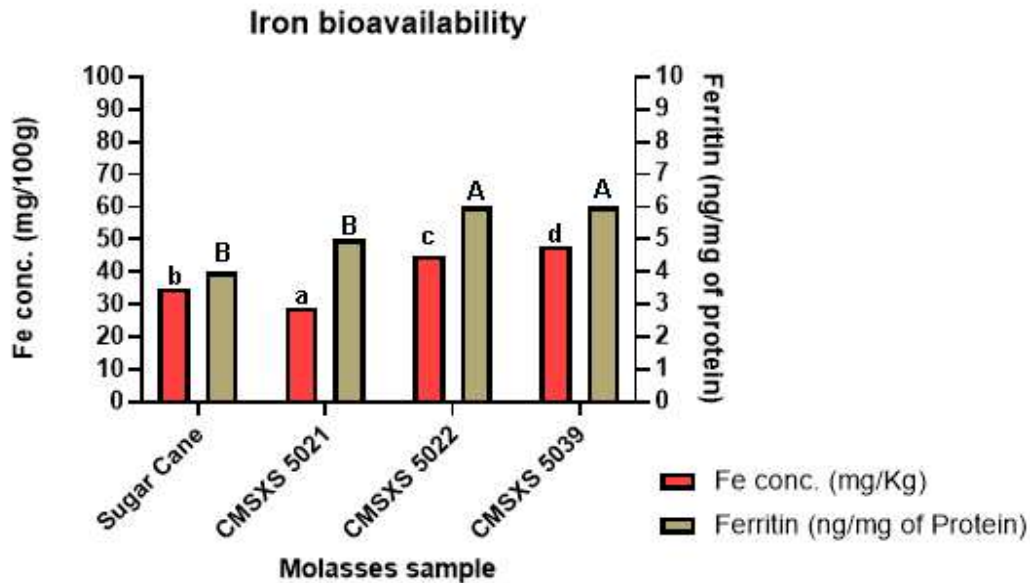


Figure 2. Iron concentration and its bioavailability in Caco-2 cells exposed to samples of sugar cane molasses and different genotypes of sweet sorghum, Brazil, 2022. Lowercase and uppercase letters refer to mean comparisons of Fe and ferritin concentrations, respectively, in all molasses. Bars with the same letters are not significantly different ($p > 0.05$), by Tuckey's test.

Nutritional food label

The sorghum molasses CMSXS 5039 were selected for nutritional food label due to their higher iron concentration and good ferritin uptake (Fig. 2; Table 5). The sorghum molasses presented lower levels of caloric density (374 Kcal/100g), carbohydrates (93.13%) and total sugar (46.70%), compared to sugar cane (388 Kcal/100g, 94.76% and 48.90%, respectively) and higher dietary fiber content (1.47% and 1.17%, respectively). In addition, 100g of sorghum molasses presented higher concentrations of iron (48.69 mg), calcium (659.46 mg), potassium (1032.16 mg) and magnesium (174.49 mg), compared to sugar cane (35.23, 70.42, 1000.21 and 149.90 mg/100g, respectively).

Table 5. Comparative nutritional information about sorghum and cane molasses.**Serving: 20g (1 tablespoon)**

	Sorghum molasses CMSXS 5039			Sugar cane molasses		
	100g	20g	%VD*	100g	20g	%VD*
Calorific value (Kcal)	374	75	4	388	78	4
Carbohydrates (g)	93	19	6	95	19	6
Total sugars (g)	47	9	3	49	10	3
Added sugars (g)	0	0	0	0	0	0
Protein (g)	0	0	0	2	0	0
Total fat (g)	0	0	0	0	0	0
Saturated fat (g)	0	0	0	0	0	0
Trans fats (g)	0	0	0	0	0	0
Dietary fibers (g)	1.5	0	0	1.2	0	0
Sodium (mg)	90	18	1	46	9	0
Iron (mg)	49	10	71	35	7	50
Calcium (mg)	659	132	13	-	-	-
Potassium (mg)	1032	206	6	1000	200	6
Magnesium (mg)	174	35	8	150	30	7
Manganese (mg)	2.5	0.5	17	3.4	0.7	23

*Percentage of Daily Values provided per serving. - Non-significant amount (VD <5%).
Daily reference values based on a 2000 Kcal or 8400 kJ diet.^{30,31}

4. DISCUSSION

The present study focused on the macronutrients, minerals, bioactive compounds and physical characterization in molasses from ten different genotypes of sweet sorghum and sugar cane. These compounds may be affected by cultivation location, soil conditions, temperature, humidity, light, growing conditions and the processing to prepare the molasses. Further, it is important to evaluate the uptake of nutrients, including iron bioavailability, whose concentration is high in some genotypes of sorghum molasses.

Few studies in the literature have addressed the characterization of sweet sorghum molasses. In our study, the proximate composition of sorghum molasses presented higher ash concentration (3.3-6.9%) relative to sugar cane molasses. A similar result was observed in sorghum molasses IPA 467-4-2, with high ash concentration of 7.39% (De Fontes et al., 2011). The sorghum

molasses CMSXS 5041 presented lower caloric density, due to their high concentration of ash and dietary fiber, especially soluble dietary fiber, among molasses (2.85%), which reduced the carbohydrate content and their caloric density. In addition, the molasses exhibited low concentration of resistant starch. This compound is found in grains, raw potatoes and green bananas and is sensitive to high temperature treatments, which could reduce its content in molasses (Liu et al., 2019).

Sugar cane molasses, commonly found with an alternative sweetener, presented higher concentration of carbohydrates and lower ash content, compared to sorghum molasses. The lower ash content reflected the low concentration of minerals in cane molasses. The value of protein, lipids and dietary fiber in cane molasses was similar to that observed by Wright *et al.* (2014), while the ash content was higher than that in our finding, with higher concentrations of sodium, calcium, manganese and potassium.

The use of sugar cane molasses as a dietary supplement to aid in the treatment of anemia is already known, due to their iron content (Jain and Venkatasubramanian, 2017). In our study, as well as in the De Fontes *et al.* (2011), iron demonstrated to be a promise mineral in sorghum molasses, since the molasses from two sorghum genotypes, CMSXS 5039 and CMSXS 5022, presented higher iron content (48.69 and 45.56 mg/100g, respectively), compared with sugar molasses. Thus, we can highlight the nutritional value of sorghum molasses to improve iron intake, specially for women at childbearing age, the elderly, children and adolescents in their growth phase (Means, 2020).

BRS 511, CMSXS 5017, 5021, 5041 and 5045 genotypes exhibited high zinc content, ranging from 1.14 at 1.47 mg/100g, and all sorghum molasses presented high calcium content, ranging from 396.73 at 965.50 mg/100g. Zinc plays an important role in the body, acting as an antioxidant mineral, with positive effects on the immune system. Calcium is essential for

maintaining bones, besides working as intracellular messenger and cofactor of extracellular enzymes and proteins (SHARP, 2005).

It is known that some components present in food can affect the bioavailability of calcium, iron and zinc, such as phytate and tannin, as well as the phytate/calcium, zinc/iron and phytate/zinc ratio (Piskin et al., 2022). In our study, tannins were not detected in molasses, but phytate exhibited great variation, since eight sorghum molasses presented high values relative to cane molasses, which required an *in vitro* or *in vivo* bioavailability study of these minerals, to evaluate mineral uptake. On the other hand, phytate is also considered an important antioxidant, which inhibits lipid peroxidation by accelerating the oxidation of Fe²⁺ to Fe³⁺, also reducing the levels of free iron ions in the cell environment, consequently catalyzing the formation of hydroxyl radicals. Thus, phytate can help relieving inflammation and neurodegenerative diseases (Asensio et al., 2023).

Regarding physical composition, sorghum molasses demonstrated good acidity, with an average pH of 4.8, which depends on the origin of the plant, and is generally higher than 4.5 to 10,0 for molasses (De Fontes et al., 2011). The total soluble solids of sugar cane molasses range from 65 to 7° BRIX (CARVALHO, 2007). In our study, the sorghum molasses ranged from 63.8 to 79.5 ° BRIX, and most of them are higher than allowed by legislation, with the percentage of total sugar ranging from 38.2 to 58.5, which can increase shelf life by limiting microbial growth. The higher the °Brix of molasses, the longer their shelf life (CARVALHO, 2007). On the other hand, sugar cane molasses presented ° BRIX within the range, with low percentage of total sugar (48.9%), since the legislation requires a minimum of 50% (BRASIL, 1978). The sucrose: reducing sugar ratio was lower in sorghum molasses, compared to sugar cane. This proportion of sugars in sweet sorghum makes it possible to produce molasses, but not refined sugar, due to the insufficient amount of sucrose (Kim and Day, 2011).

The contents of total phenolic compounds and antioxidant activity in sorghum molasses were higher, compared to sugar cane molasses. It has been reported that polyphenol content is significantly correlated with the honey/molasses color, indicating that the darker color increased the content of phenolic compounds, thus improving antioxidant activity (Dzugan et al., 2018). The high temperature applied during the broth concentration increases the formation of compound with antioxidant activity by non -enzymatic darkening reactions (Mesias et al., 2020). Thus, the CMSXS 5021 and CMSXS 5039 sorghum molasses with darker color presented higher antioxidant response and higher content of total phenolic compounds. The same result was found in commercial syrups, such as sweeteners produced in the United States (Eggleston et al., 2021). These compounds prevent oxidative stress and have bactericidal, anti-inflammatory, anti-allergic, anti-coagulant and anticancer effects (Dzugan et al., 2018; Mesias et al., 2020).

Three genotypes of sorghum molasses (CMSXS 5021, 5022 and 5039) with high concentrations of iron and bioactive compounds were selected for iron bioavailability assessment. The *in vitro* test with Caco-2 cells determined iron bioavailability by measuring the concentration of cellular ferritin, which is the form of storage of this mineral (Glahn, 2022). The CMSXS 5022 and 5039 sorghum genotypes presented higher iron content among the molasses, which indicates higher ferritin production and, consequently, good iron bioavailability. However, the CMSXS 5021 genotype, despite having lower iron content than sugar cane, presented the same ferritin concentration as the others, which reveals better iron uptake.

Since it does not have endophytase, phytate cannot be decomposed by the human body. Thus, minerals chelated in phytate, such as iron, may have their bioavailability affected when the food has a high phytate concentration. However, this was not observed in our *in vitro* study, since the sorghum molasses genotype 5021, which contains a higher phytate content, presented

iron bioavailability equal to sugarcane molasses. The high temperature, 95° for one hour can reduce the myoinositol hexa- and penta-phosphate content and increase the myoinositol tetra and triphosphate content, which can favor the iron availability and to increase antioxidant activity, as observed in sorghum molasses from genotype 5021 (Pujol et al., 2023).

To nutritional value label the CMSXS 5039 sorghum molasses was selected due to their better nutritional value. It demonstrated lower caloric density, carbohydrate content and total sugars and higher total dietary fiber, sodium, iron, calcium, potassium and magnesium content, compared to sugar cane molasse. Among the mineral content, iron and calcium supplied 71 and 13%, respectively, of the micronutrient requirement in a 20 g size serving of sorghum molasses.

5. CONCLUSION

The present study was the first to analyze different genotypes of sweet sorghum molasses from a tropical region. Natural sweeteners, such as sorghum molasses, are high in sugar and should be consumed with moderation, however they are rich in minerals and polyphenols that can improve metabolic health by replacing refined sugars. Sorghum molasses are a natural sweetener with good physical property, which do not require the addition of additives or preservatives by the industry to maintain shelf life. They are a source of minerals, such as iron, calcium, sodium, potassium, magnesium and manganese and bioactive compounds with antioxidant effect. Among sorghum genotypes, the CMSXS 5021 and 5039 molasses stand out for their high level of total phenolic compounds, antioxidant activity and satisfactory bioavailability of iron.

FUNDING

This work was supported by the National Counsel for Technological and Scientific Development (CNPq, Brazil), Foundation for Research Support of Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil), and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil).

NOTES

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Embrapa Milho e Sorgo for providing the molasses. The authors also thank Prof. Raymond P. Glahn for helpful assistance with the *in vitro* experiments.

REFERENCES

- AOAC, 2019. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 21st ed. Gaithersburg, Md.
- AOAC, 1990. Total Sugars in Molasses as Invert Sugar Lane-Eynon Constant Volume Volumetric Method. Official method of analysis (AOAC 968.28), 15th edn. Association of Official Analytical Chemistry Arlington, Virginia, USA.
- Asensio, G., Martín-del-Campo, M., Ramírez, R.A., Rojo, L., Vázquez-Lasa, B., 2023. New Insights into the In Vitro Antioxidant Routes and Osteogenic Properties of Sr/Zn Phytate Compounds. *Pharmaceutics* 15, 339.
- Asikin, Y., Wada, K., Imai, Y., Kawamoto, Y., Mizu, M., Mutsuura, M., Takahashi, M., 2018. Compositions, taste characteristics, volatile profiles, and antioxidant activities of sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L.) and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) syrups. *J. Food Meas. Charact.* 12, 884–891.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Leb. Technol.* 28, 25–30.
- Brasil, 1978. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução CNNPA nº 12, de 30 de março de 1978. Dispõe sobre normas técnicas especiais relativas a alimentos (e bebidas) em todo o território brasileiro. Brasília, DF: ANVISA.
- Brasil, 2020. Resolução da diretoria colegiada - RDC no 429, de 8 de outubro de 2020 (Publicada no DOU no 195, de 9 de outubro de 2020). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA, Brasília, DF.
- Carvalho, R.F. de, 2007. Beneficiamento dos derivados da cana de açúcar (melado e açúcar mascavo). Dossiê Técnico. Rede de Tecnologia da Bahia, 21 p.
- De Fontes, Marcelo M.; Silva, Braulio A.; Dantas, José Pires; Silveira, Daniel Casimiro Da; Cavalcanti, M.T., 2011. Caracterização físico-químico do melado de sorgo granífero sacarino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Rev. Verde Agroecol. e Desenvol. Sustentável* 6, 216–219. <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/659> (accessed 4 July 2023).
- Dzugan, M., Tomczyk, M., Sowa, P., Grabek-Lejko, D., 2018. Antioxidant Activity as Biomarker of Honey Variety. *Mol. A J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* 23.

- Eggleston, G., Boue, S., Bett-Garber, K., Verret, C., Triplett, A., Bechtel, P., 2021. Phenolic contents, antioxidant potential and associated colour in sweet sorghum syrups compared to other commercial syrup sweeteners. *J. Sci. Food Agric.* 101, 613–623.
- Eggleston, G., Triplett, A., Bett-Garber, K., Boue, S., Bechtel, P., 2022. Macronutrient and mineral contents in sweet sorghum syrups compared to other commercial syrup sweeteners. *J. Agric. Food Res.* 7, 100276.
- Frankowski, J., Przybylska-Balcerek, A., Stuper-Szablewska, K., 2022. Concentration of Pro-Health Compound of Sorghum Grain-Based Foods. *Foods* 11.
- Glahn, R.P., 2022. The Caco-2 Cell Bioassay for Measurement of Food Iron Bioavailability. *J. Vis. Exp.* 2022.
- Gomes, J. C.; Oliveira, G. F., 2011. *Análises Físico-Químicas de Alimentos*. 1ªed. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.
- Jain, R., Venkatasubramanian, P., 2017. Sugarcane Molasses – A Potential Dietary Supplement in the Management of Iron Deficiency Anemia. *J. Diet. Suppl.* 14, 589–598.
- Kim, M., Day, D.F., 2011. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 803–807.
- Liu, K., Hao, Y., Chen, Y., Gao, Q., 2019. Effects of dry heat treatment on the structure and physicochemical properties of waxy potato starch. *Int. J. Biol. Macromol.* 132, 1044–1050.
- Massey, A.R., Reddivari, L., Vanamala, J., 2014. The Dermal Layer of Sweet Sorghum (*Sorghum bicolor*) Stalk, a Byproduct of Biofuel Production and Source of Unique 3-Deoxyanthocyanidins, Has More Antiproliferative and Proapoptotic Activity than the Pith in p53 Variants of HCT116 and Colon Cancer Stem C. *J. Agric. Food Chem.* 62, 3150–3159.
- Means, R.T., 2020. Iron Deficiency and Iron Deficiency Anemia: Implications and Impact in Pregnancy, Fetal Development, and Early Childhood Parameters. *Nutrients* 12.
- Merrill, A.L. and Watt, B.K., 1973. *Energy Value of Foods: Basis and Derivation*. Agriculture Handbook No. 74, ARS United States Department of Agriculture, Washington DC.
- Mesias, M., Delgado-Andrade, C., Gómez-Narváez, F., Contreras-Calderón, J., Morales, F.J., 2020. Formation of Acrylamide and Other Heat-Induced Compounds during Panela Production. *Foods* 9.
- Naoura, G., Emendack, Y., Baloua, N., vom Brocke, K., Hassan, M.A., Sawadogo, N., Doyam Nodjasse, A., Djindji, R., Trouche, G., Echevarria Laza, H., 2020. Characterization of semi-arid Chadian sweet sorghum accessions as potential sources for sugar and ethanol production. *Sci. Rep.* 10, 14947.
- Piskin, E., Cianciosi, D., Gulec, S., Tomas, M., Capanoglu, E., 2022. Iron Absorption: Factors, Limitations, and Improvement Methods. *ACS omega* 7, 20441–20456.
- Price et al., 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric Food Chem.*

Pujol, A., Sanchis, P., Grases, F., Masmiqel, L., 2023. Phytate Intake, Health and Disease: “Let Thy Food Be Thy Medicine and Medicine Be Thy Food.” *Antioxidants* (Basel, Switzerland) 12.

Sharp P., 2005. Minerals and trace elements. In: Geissler C, Powers H, eds. *Human nutrition and dietetics*, 11 ed. London: Churchill Livingstone, 241–244.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152–178.

Valle, M., St-Pierre, P., Pilon, G., Marette, A., 2020. Differential Effects of Chronic Ingestion of Refined Sugars versus Natural Sweeteners on Insulin Resistance and Hepatic Steatosis in a Rat Model of Diet-Induced Obesity. *Nutrients* 12, 1–14.

Wright, A.G., Ellis, T.P., Ilag, L.L., 2014. Filtered Molasses Concentrate from Sugar Cane: Natural Functional Ingredient Effective in Lowering the Glycaemic Index and Insulin Response of High Carbohydrate Foods. *Plant Foods Hum. Nutr.* 69, 310–316.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

TABLE 1. Antioxidant activity ($\mu\text{Mol Trolox/g sample}$) of sugarcane molasses and different genotypes of sweet sorghum, extracted by different solvents, Brazil, 2022.

	Acetone 80%	Methanol 80%	Methanol 50%: acetone 70%: water (40:40:20)
Sugar cane molasses	1.51 ± 0.46^c	3.24 ± 0.61^b	4.94 ± 0.78^a
Sorghum molasses BR 501	$5.38 \pm 0.92^{*b}$	$7.57 \pm 0.50^{*a}$	$8.13 \pm 0.45^{*a}$
Sorghum molasses BRS 511	$5.58 \pm 0.29^{*b}$	$9.88 \pm 0.30^{*a}$	$9.91 \pm 0.23^{*a}$
Sorghum molasses CMSXS 5017	$4.93 \pm 0.29^{*c}$	$9.00 \pm 0.22^{*b}$	$9.77 \pm 0.35^{*a}$
Sorghum molasses CMSXS 5035	$5.50 \pm 0.30^{*b}$	$8.77 \pm 0.08^{*a}$	$8.84 \pm 0.41^{*a}$
Sorghum molasses CMSXS 5021	$10.87 \pm 0.47^{*a}$	$11.20 \pm 0.12^{*a}$	$11.03 \pm 0.31^{*a}$
Sorghum molasses CMSXS 5039	$9.41 \pm 0.44^{*b}$	$10.77 \pm 0.14^{*a}$	$10.62 \pm 0.19^{*a}$
Sorghum molasses CMSXS 5041	$7.27 \pm 0.25^{*b}$	$9.74 \pm 0.15^{*a}$	$9.51 \pm 0.48^{*a}$
Sorghum molasses CMSXS 5022	$7.84 \pm 0.31^{*c}$	$10.70 \pm 0.19^{*a}$	$8.59 \pm 0.32^{*b}$
Sorghum molasses CMSXS 5043	$4.76 \pm 0.25^{*c}$	$6.71 \pm 0.27^{*b}$	$7.42 \pm 0.50^{*a}$
Sorghum molasses CMSXS 5045	$5.03 \pm 0.44^{*b}$	$7.11 \pm 0.35^{*a}$	$7.08 \pm 0.52^{*a}$

Values in dry matter, expressed as mean and standard deviation (referring to three replications). Different letters in the line indicate significant differences between the extracts by the Tuckey's test at 5% probability and * indicates difference with sugarcane molasses by the Dunnett test

TABLE 2. Total phenolic composition (mg GAE/g sample) of sugarcane molasses and different genotypes of sweet sorghum, extracted by different solvents, Brazil, 2022.

	Acetone 80%	Methanol 80%	Methanol 50%: acetone 70%: water (40:40:20)
Sugar cane molasses	2.24 ± 0.11 ^c	6.72 ± 0.35 ^b	8.84 ± 0.74 ^a
Sorghum molasses BR 501	11.79 ± 0.81 ^{*c}	18.00 ± 0.40 ^{*b}	19.62 ± 0.82 ^{*a}
Sorghum molasses BRS 511	15.06 ± 0.35 ^{*c}	26.65 ± 0.62 ^{*b}	29.27 ± 0.62 ^{*a}
Sorghum molasses CMSXS 5017	14.25 ± 0.37 ^{*c}	24.91 ± 0.74 ^{*b}	28.50 ± 0.91 ^{*a}
Sorghum molasses CMSXS 5035	14.73 ± 0.21 ^{*c}	23.11 ± 0.24 ^{*b}	23.76 ± 0.26 ^{*a}
Sorghum molasses CMSXS 5021	32.36 ± 0.68 ^{*b}	48.08 ± 0.73 ^{*a}	48.38 ± 0.58 ^{*a}
Sorghum molasses CMSXS 5039	27.65 ± 0.79 ^{*b}	33.73 ± 0.89 ^{*a}	34.64 ± 0.78 ^{*a}
Sorghum molasses CMSXS 5041	18.95 ± 0.32 ^{*b}	28.08 ± 0.36 ^{*a}	28.80 ± 0.87 ^{*a}
Sorghum molasses CMSXS 5022	19.39 ± 0.53 ^{*c}	30.84 ± 0.29 ^{*b}	24.24 ± 0.58 ^{*a}
Sorghum molasses CMSXS 5043	11.69 ± 0.41 ^{*b}	18.86 ± 0.26 ^{*a}	19.31 ± 0.43 ^{*a}
Sorghum molasses CMSXS 5045	12.75 ± 0.72 ^{*c}	18.62 ± 0.52 ^{*b}	19.92 ± 0.85 ^{*a}

Values in dry matter, expressed as mean and standard deviation (referring to three replications). Different letters in the line indicate significant differences between the extracts by the Tuckey's test at 5% probability and * indicates difference with sugarcane molasses by the Dunnett test

TABLE 3. Ferritin concentration in Caco-2 cells exposed to samples of sugarcane molasses and different genotypes of sweet sorghum, Brazil, 2022.

	Ferritin (ng/mg of Protein)
Sugar cane molasses	4.33 ± 0.42
Sorghum molasses CMSXS 5021	5.05 ± 0.43 ^b
Sorghum molasses CMSXS 5022	6.33 ± 0.54 ^{*a}
Sorghum molasses CMSXS 5039	6.82 ± 0.50 ^{*a}

Cells were exposed to MEM only (minimum essential media) without addition of digested food and Fe (n = 3). All samples were run in the same experiment. Values expressed as mean and standard deviation. Different letters in the column indicate significant differences by the Tuckey's test at 5% probability and * indicates difference with sugarcane molasses by the Dunnett test.

6. CONCLUSÃO GERAL

Os melados de sorgo sacarino são compostos principalmente de carboidratos (com predominância de sacarose, seguida de glicose e frutose) seguido por proteína, fibra alimentar total e lipídios. Apresentam boa propriedade física, com pH médio de 4,8, acidez variando de 0,3 a 0,45 e teor de sólidos solúveis totais de 63,83 a 79,50 ° BRIX, que auxiliam na vida de prateleira do produto, dispensando a adição de aditivos e conservantes pela indústria. Além disso, apresentam alta concentração de cinzas, sendo fonte dos minerais ferro, cálcio, sódio, potássio, magnésio e manganês, além de compostos bioativos com efeito antioxidante. Em comparação ao melado de cana-de-açúcar, os melados de sorgo apresentam melhor perfil de minerais (potássio > cálcio > magnésio > fósforo > ferro > sódio > manganês > zinco > cobre) e maiores teores de fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH). Os melados de alguns genótipos de sorgo também apresentaram maiores conteúdos de ácido fítico e amido resistente em comparação a cana.

Ademais, os melados de sorgo apresentam melhor biodisponibilidade de ferro em comparação ao de cana-de-açúcar, visto que mesmo tendo teor menor de ferro, o genótipo CMSXS 5021 se equiparou a cana no teor de ferritina após bioensaio em células Caco-2. Os melados CMSXS 5022 e 5039 apresentam maiores teores de ferro e de ferritina. Dentre os genótipos de sorgo, os melados CMSXS 5021 e 5039 se destacam em relação aos elevados teores de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, amido resistente e teor de ferro com boa biodisponibilidade.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, realizamos a caracterização nutricional completa dos melados de diferentes genótipos e realizamos um bioensaio *in vitro* para avaliar a biodisponibilidade de ferro dos genótipos de maior conteúdo de ferro. Entretanto, mais estudos são necessários afim de explorar melhor as propriedades desse produto. Sugere-se a realização de estudo *in vivo* para completar os resultados de biodisponibilidade de ferro. Além disso, sugere-se a realização de uma análise sensorial do produto, bem como a realização de um estudo agudo com humanos para avaliação do índice glicêmico e efeito na saciedade.