



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MATHEUS DIAS DE CARVALHO

**PROTEÍNAS DO SORGO: EXTRAÇÃO E POTENCIAL APLICAÇÃO COMO
AGENTE EMULSIFICANTE**

Campinas
2022

MATHEUS DIAS DE CARVALHO

**PROTEÍNAS DO SORGO: EXTRAÇÃO E POTENCIAL APLICAÇÃO COMO
AGENTE EMULSIFICANTE**

**SORGHUM PROTEINS: EXTRACTION AND POTENTIAL USE AS EMULSIFYING
AGENT**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Dissertation presented to the School of Food Engineering of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Food Engineering.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Carla Kawazoe Sato.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Carolina Siqueira Franco Picone.

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO MATHEUS
DIAS DE CARVALHO, ORIENTADO PELA
PROF. DR.^a. ANA CARLA KAWAZOE SATO
E COORIENTADO PELA PROF. DR.^a.
CAROLINA SIQUEIRA FRANCO PICONE.

Campinas
2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Gardênia Garcia Benossi - CRB 8/8644

D543 Dias de Carvalho, Matheus, 1996-
Proteínas do sorgo : extração e potencial aplicação como agente emulsificante / Matheus Dias de Carvalho. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Ana Carla Kawazoe Sato.
Coorientador: Carolina Siqueira Franco Picone.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Plantas - Proteínas. 2. Extração alcalina. 3. Emulsão de óleo em água. I. Sato, Ana Carla Kawazoe, 1980--. II. Picone, Carolina Siqueira Franco, 1983--. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Sorghum proteins : extraction and potential use as emulsifying agent

Palavras-chave em inglês:

Plant proteins

Alkaline extraction

Oil-in-water emulsion

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Ana Carla Kawazoe Sato [Orientador]

Flávia Maria Netto

Renata Valeriano Tonon

Data de defesa: 11-03-2022

Programa de Pós-Graduação: Engenharia de Alimentos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-5221-6979>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1054933202172849>

Comissão Examinadora

Profª Drª Ana Carla Kawazoe Sato
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP

Profª Drª Flávia Maria Netto
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP

Drª Renata Valeriano Tonon
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Rio de Janeiro – RJ

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na secretaria do Programa da Unidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Elisabete, ao meu pai Edson, à minha família, ao Alan e aos meus amigos. Aos cientistas, docentes e funcionários da Universidade Estadual de Campinas. Ao laboratório de Engenharia de Processos e a Faculdade de Engenharia de Alimentos. A todos os professores que passaram e passam por minha trajetória acadêmica. Agradeço também aos meus colegas de trabalho pelo suporte, principalmente do grupo de pesquisa da Prof^a Ana Carla. Em especial, agradeço a minha orientadora e coorientadora. Agradeço também ao Carlos. Agradeço ainda a todos que foram luz para mim em diversos momentos e que de algum modo me guiaram durante a realização deste trabalho. Por fim, agradeço ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa concedida com número de processo 131537/2020-2.

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

RESUMO

O aumento no consumo de produtos à base de proteínas de origem vegetal desencadeou uma maior busca por fontes alternativas de proteínas. Diferentes matrizes vegetais vêm sendo melhor estudadas em termos de funcionalidades e propriedades nutricionais. O sorgo é um cereal pouco utilizado para a alimentação humana. Em geral, suas proteínas apresentam baixa solubilidade devido ao alto conteúdo de prolaminas e outros fatores, como taninos. Entretanto, as prolaminas do sorgo apresentam aplicações funcionais interessantes, como a estabilização de emulsões Pickering, devido a sua baixa solubilidade, e deve-se ainda considerar que há outras frações proteicas no grão, como albuminas, glutelinas e globulinas. Neste trabalho as proteínas do sorgo foram extraídas utilizando-se a extração alcalina, avaliando diferentes pHs (8, 9, 10, 11 e 12) e temperaturas (20 °C e 40 °C), em seguida, com base no melhor rendimento à 40 °C foram produzidos concentrados proteicos obtidos nas seguintes condições de extração: pH 8 - CPS 8 (condição branda), pH 10 - CPS 10 (condição moderada) e pH 12 - CPS 12 (condição extrema). Os concentrados foram avaliados em termos de composição centesimal, solubilidade e capacidade emulsificante. O maior rendimento proteico foi obtido em pH 12 a 40 °C (58,90 % $\pm$ 3,94). Os concentrados apresentaram composição centesimal parecidas, independente da condição de extração, entretanto o perfil de solubilidade apresentou um aumento drástico para o CPS 12. A capacidade emulsificante dos concentrados foi entre 282,5 g óleo/g de proteína e 400 g óleo/g de proteína, comparável à de concentrados proteicos de soja e grão de bico. Emulsões foram produzidas utilizando homogeneizador tipo Turrax em pH 7 para diferentes proporções de óleo:água (30:70, 50:50 e 70:30) e concentrações de proteína (0,5 %, 1 % e 2 %). As emulsões foram do tipo óleo-em-água e apresentaram distribuição de tamanho de gotas bimodal para as concentrações de 1 % e 2 % de proteína, enquanto que para 0,5 % foram polidispersas. O $D[4,3]$ das emulsões produzidas com os diferentes concentrados variou entre ~ 11 e $46 \mu\text{m}$, diminuindo com o aumento da concentração de proteína. As emulsões não apresentaram separação de fases durante o período avaliado de 7 dias, quando produzidas com 70 % de fase oleosa. A alta estabilidade das emulsões foi relacionada à presença de prolaminas que, por serem insolúveis em meio aquoso, podem estabilizar interfaces pelo mecanismo Pickering, junto com um mecanismo combinado, devido a presença de outras frações proteicas no concentrado. Por fim, a emulsão produzida com o CPS 12 apresentou comportamento Herschel-Bulkley com o parâmetro de comportamento (n) de 0,437, índice de consistência (k) $1,785 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ e tensão residual (σ_i) de 12,03 Pa; tal comportamento de escoamento possivelmente está relacionado a rede formada e a alta estabilidade da emulsão frente à separação de fases.

ABSTRACT

The increase in consumption of plant-based products has triggered a greater search for alternative sources of protein. Different plant matrices are being better studied in terms of functionalities and nutritional properties. Sorghum is a cereal crop still underutilized for human consumption, in general, its proteins have low solubility due to the high content of prolamins and other factors, such as tannins. However, sorghum prolamins have interesting functional applications, such as the stabilization of Pickering emulsions, due to its low solubility, and there are still other protein fractions in the grain, such as albumins, glutelins and globulins. In this work, sorghum proteins were extracted using alkaline extraction, evaluating different pH values (8, 9, 10, 11 e 12) and temperatures (20 °C and 40 °C), then, based on the best yield at 40 °C, protein concentrates were produced under the following extraction conditions: pH 8 - CPS 8 (mild condition), pH 10 - CPS 10 (moderate condition) and pH 12 - CPS 12 (extreme condition). The protein concentrates were evaluated in terms of proximate composition, solubility and emulsifying capacity. The highest protein yield was obtained in pH 12 at 40 °C (58.90 % $\pm$ 3.94). The concentrates showed similar proximate composition, regardless of the extraction condition, however the solubility profile showed a drastic increase for CPS 12. The emulsifying capacity of the concentrates was between 282.5 g oil/g of protein and 400 g of oil/g of protein, comparable to that of soy and chickpea protein concentrates. Emulsions were produced using a Turrax type homogenizer at pH 7 for different oil:water ratios (30:70, 50:50 and 70:30) and protein concentrations (0,5 %, 1 % e 2 %). The emulsions were oil-in-water type and presented a bimodal size distribution for 1 % and 2 % of protein concentrations, while for 0,5 % they were polydispersed. The D[4,3] of the emulsions produced with the different concentrates varied between $\sim$ 11 and 46 μ m, decreasing with increasing protein concentration. The emulsions did not show phase separation during the evaluated period of 7 days, when produced with 70 % of oil phase. The high stability of the emulsions can be attributed to the presence of prolamins, that because of their insolubility in aqueous media they can stabilize interfaces by the Pickering mechanism, along with a combined mechanism, due to the presence of other protein fractions in the concentrates. Finally, the emulsion produced with CPS 12 showed a Herschel-Bulkley behavior with flow behavior index (n) of 0.437, consistency coefficient (k) 1,785 Pa $\cdot$ sⁿ and yield stress (σ_i) of 12.03 Pa; this flow behavior is possibly related to the network formed and the high stability of the emulsion against phase separation.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	9
2.	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1.	Proteínas de origem vegetal	11
2.2.	Funcionalidades de proteínas vegetais	13
2.3.	Extração de proteínas	15
2.4.	Sorgo	16
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1.	Materiais.....	18
3.2.	Extração alcalina	18
3.4.	Caracterização do concentrado proteico.....	19
3.4.1.	Composição centesimal.....	19
3.4.2.	Solubilidade.....	20
3.4.3.	Potencial Zeta.....	20
3.4.4.	Capacidade emulsificante.....	20
3.5.	Aplicação do concentrado proteico obtido por extração alcalina em emulsões	21
3.5.1.	Preparo das emulsões	21
3.5.2.	Caracterização das emulsões produzidas	21
3.5.2.1.	Tamanho de gota e microscopia ótica.....	21
3.5.2.2.	Teste de diluição e microscopia de fluorescência.....	21
3.5.2.3.	Estabilidade.....	22
3.5.2.4.	Ensaio reológico.....	22
3.6.	Análise estatística.....	22
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1.	Extração.....	23
4.1.1.	Tamanho de partícula e composição centesimal da farinha	23
4.1.2.	Extração alcalina	25
4.1.3.	Composição centesimal.....	27
4.1.4.	Potencial zeta.....	29
4.2.	Caracterização dos concentrados proteicos	31
4.2.1.	Solubilidade.....	31
4.2.2.	Capacidade emulsificante.....	33
4.3.	Caracterização das emulsões produzidas	35
4.3.1.	Microscopia de fluorescência.....	35
4.3.2.	Estabilidade	36
4.3.3.	Tamanho de gotas e microscopia ótica.....	39
4.3.4.	Comportamento reológico.....	43
5.	CONCLUSÃO	45
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A demanda por alimentos de origem vegetal vem aumentando em consequência de novos hábitos de alimentação, aumento da população vegana, vegetariana e flexitariana e preocupações acerca do meio ambiente. Na última década, principalmente, verificou-se que a produção de alimentos de origem animal está relacionada a altos custos e impactos ambientais (TILMAN e CLARK, 2014; VAN DER GOOT *et al.*, 2016). Assim, a academia e indústria vem enfrentando o desafio de buscar e utilizar fontes vegetais para suprir demandas nutricionais e funcionais (BALANDRA´N-QUINTANA *et al.*, 2019).

Dentre as fontes de proteínas vegetais algumas já são bastante utilizadas industrialmente, como é o caso do trigo e soja, ou ainda possuem grande importância nutricional, como o feijão ou a ervilha (LAM *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2018). Entretanto, algumas fontes vegetais ainda são pouco exploradas, como é o caso do sorgo. Esse cereal é pouco utilizado para a alimentação humana em alguns países e o mercado vem diminuindo nesses países (STAMENKOVIC *et al.*, 2020). Suas proteínas apresentam baixa digestibilidade, devido principalmente ao alto conteúdo de prolaminas e taninos (DUODU, 2003; BUTLER *et al.*, 1984; TAYLOR *et al.*, 2007). As prolaminas do sorgo apresentam características únicas, como alta hidrofobicidade e baixa solubilidade em água, e por isso são consideradas potenciais biomateriais *food-grade* (SHAH *et al.*, 2021). Entretanto, apesar de suas proteínas serem majoritariamente prolaminas, o sorgo apresenta também albuminas, globulinas e glutelinas.

Para obtenção das proteínas vegetais são empregadas diversas técnicas de extração, a maior parte delas tem como fundamento a solubilização proteica e/ou a degradação da parede celular (KUMAR *et al.*, 2021). A extração alcalina é muito comum em alimentos para obtenção de proteínas e em geral está associada a bons rendimentos proteicos. O rendimento na extração alcalina pode ser influenciado pelo pH, temperatura e razão sólido-solvente, sendo que os dois primeiros podem também influenciar as propriedades das proteínas obtidas (CONTRERAS *et al.*, 2019). O meio alcalino além de solubilizar todas as frações proteicas também pode quebrar as pontes dissulfeto, presentes principalmente nas proteínas de cereais, e favorecer sua solubilização (CONTRERAS *et al.*, 2019).

Dentre as funcionalidades buscadas em proteínas vegetais está a de estabilizar interfaces (KIM *et al.*, 2020). As proteínas vegetais podem ser utilizadas para produzir emulsões óleo-em-água, principalmente por sua característica anfifílica (KIM *et al.*, 2020). Porém, devido à baixa solubilidade de algumas proteínas elas podem ser consideradas como partículas sólidas e estabilizar emulsões a partir do mecanismo Pickering (XIAO *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2018;

FENG *et al.*, 2021; NASRABADI *et al.*, 2019). Emulsões Pickering apresentam alta estabilidade a coalescência e amadurecimento de Ostwald (SARKAR e DICKINSON, 2020). Proteínas de cereais vem sendo utilizadas para esta finalidade, como as prolaminas do sorgo, trigo e milho (XIAO *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2018; FENG *et al.*, 2021; NASRABADI *et al.*, 2019).

Por outro lado, para obtenção das prolaminas do sorgo são utilizadas técnicas de extração que envolvem solventes apolares. A obtenção das outras frações de proteínas de sorgo, que poderiam ser obtidas a partir da técnica convencional de extração alcalina ainda é pouco explorada. Além disso, as emulsões também podem ser estabilizadas por diferentes frações de proteínas a partir de mecanismos combinados (NTONE *et al.*, 2021; CHANG *et al.*, 2022; YANG e SAGIS, 2021).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi obter as proteínas do sorgo avaliando diferentes condições de extração alcalina buscando maior rendimento proteico, caracterizar os concentrados proteicos obtidos em termos de composição centesimal, potencial zeta, solubilidade e capacidade emulsificante e por fim avaliar a aplicação funcional dos concentrados em emulsões.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Proteínas de origem vegetal

As proteínas vegetais são componentes abundantes na natureza e possuem grande importância nutricional para a população, principalmente para aqueles indivíduos que por costumes, questões sociais ou de preferência optam por não consumirem proteínas de origem animal (MALEKZAD *et al.*, 2018). As proteínas de origem vegetal também apresentam baixo custo, são biodegradáveis e possuem propriedades tecnológicas interessantes para a indústria de alimentos (LOVEDAY, 2020; YILDIZ *et al.*, 2017). Diante do cenário atual as proteínas vegetais têm recebido grande atenção, principalmente por se apresentarem como substitutos de proteínas de origem animal em produtos alimentícios.

As proteínas são macromoléculas fundamentais para sistemas biológicos resultantes da condensação de aminoácidos, formadas a partir de ligações peptídicas. São 20 aminoácidos que podem se juntar para formar estruturas complexas que irão apresentar diferentes características e funções biológicas (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010). Dentre as funções biológicas desempenhadas pelas proteínas pode-se citar: estruturais, de transporte, biocatalisadoras, hormonais e de reserva (RIBEIRO e SERAVALLI, 2007), essa última é a função principal das proteínas nos grãos.

As diferentes características apresentadas pelas proteínas estão relacionadas com a sequência de aminoácidos que as compõem. Esses aminoácidos possuem diferentes propriedades físico-químicas que dependem da natureza química do radical (grupo R) (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010). São classificados como polares sem carga, apolares, carregados positivamente ou carregados negativamente (RIBEIRO e SERAVALLI, 2007). Além disso, por conta da presença dos grupos carboxílicos e amino, os aminoácidos são anfóteros podendo se comportar como ácido ou base dependendo do pH do meio (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

Além da estrutura primária, definida pela sequência de aminoácidos, as proteínas podem se organizar em estruturas secundárias como α -hélices e folhas- β que são estabilizadas por ligações de hidrogênio (ZHENG, 2014). Já as estruturas terciárias são estruturas mais complexas que se referem ao arranjo espacial da cadeia polipeptídica, essas estruturas são estabilizadas por diferentes tipos de interações químicas (ligações dissulfeto, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações dipolares, interações hidrofóbicas e de Van der Waals) (ZHENG, 2014; SGARBIERI, 1996). As proteínas podem ainda apresentar estruturas quaternárias. Em relação à sua estrutura, as proteínas são classificadas em globulares,

fibrilares ou flexíveis (SIM *et al.*, 2021). As proteínas vegetais, especificamente, são formadas principalmente de estruturas globulares e comumente se apresentam como oligômeros (SIM *et al.*, 2021).

Uma outra classificação convenientemente utilizada para as proteínas vegetais é com base em sua solubilidade. Essa classificação foi apresentada por Osborne em 1924, mas ainda possui grande importância tecnológica. Nesse aspecto, as proteínas vegetais são divididas em albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em soluções salinas), glutelinas (solúveis em soluções ácidas ou básicas diluídas) e prolaminas (solúveis em soluções hidroetanólicas) (OSBORNE, 1924; SIM *et al.*, 2021).

Nos cereais, como trigo e milho, as frações proteicas em maior quantidade são as glutelinas e prolaminas (TAN, NAWAZ & BUCKOW, 2021). Já nas leguminosas, como feijão e ervilha, as frações em maior quantidade são albuminas e globulinas (LOVEDAY, 2020; SIM *et al.*, 2021). As oleaginosas, sementes com alto conteúdo de lipídios, em geral possuem grandes quantidades de globulinas e albuminas, como canola, girassol, soja e as amêndoas que por vezes são classificadas como oleaginosas. As nozes também podem ser incluídas neste grupo, entretanto são mais ricas em glutelinas (TAN, NAWAZ & BUCKOW, 2021). Em termos de teores de proteína, as leguminosas e as oleaginosas apresentam uma maior concentração de proteína em comparação aos cereais (TAN, NAWAZ & BUCKOW, 2021). Já os pseudocereais, como amaranto e quinoa, contêm teores consideráveis de proteínas, normalmente prolaminas e glutelinas (SIM *et al.*, 2021).

Algumas proteínas vegetais já são bastante exploradas para diferentes finalidades. Por exemplo, o feijão e a ervilha, que normalmente são comercializados como grãos inteiros crus, apresentam grande importância nutricional e comercial mundialmente (LAM *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2018). Outras fontes como o trigo e soja também apresentam alto valor comercial, devido principalmente às suas proteínas, que desempenham funções tecnológicas bem definidas (*ex.*: panificação, análogos de carne e leite). Por outro lado, outras fontes proteicas vegetais estão emergindo comercialmente como alternativas às fontes de proteínas tradicionais para o desenvolvimento de novos produtos à base de vegetais (TAN, NAWAZ & BUCKOW, 2021).

Dentre as proteínas de fontes vegetais mais recentemente exploradas estão as proteínas de ervilha, arroz, milho, lentilha, grão de bico, chia, canola (CAN KARACA *et al.*, 2013; GALVES *et al.*, 2019; KARACA *et al.*, 2011). Entretanto, algumas fontes ainda são pouco estudadas em termos de funcionalidades como as proteínas de pseudocereais (amaranto, quinoa), cereais (aveia, centeio, sorgo), e ainda de folhas, cascas e sementes de frutas.

2.2. Funcionalidades de proteínas vegetais

As propriedades e funções tecnológicas das proteínas dependem da sua origem, variando o tamanho, conformação, carga, hidrofobicidade, perfil de aminoácidos, além de fatores externos que podem alterar sua estrutura (presença de sais, enzimas, temperatura, cisalhamento, pressão e outros) (STONE *et al.*, 2019). Essas características podem atribuir propriedades funcionais às proteínas, como solubilidade, retenção de água e óleo, formação de espuma, capacidade emulsificante e de formação de géis, funções fundamentais para a aplicação em produtos alimentícios (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

A solubilidade é uma propriedade funcional de grande importância e se refere à capacidade das proteínas de dissolver em um solvente (TAN, NAWAZ & BUCKOW, 2021). Fatores como temperatura, pH, tipo de solvente e força iônica do meio influenciam na solubilização (DAY, 2013). A interação entre os grupos hidrofílicos da proteína e o solvente aquoso (não orgânico) é um fator crítico para sua solubilização. Quando há predomínio de interações iônicas entre a proteína e o solvente a solubilidade é aumentada, por outro lado quando a repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína é enfraquecida, a solubilidade diminui (TAN, NAWAZ & BUCKOW, 2021).

Todavia, as proteínas são comumente solubilizadas utilizando bases ou ácidos, ajustando o pH para longe de seu ponto isoelétrico. Neste caso, as proteínas irão apresentar carga líquida positiva ($\text{pH} < \text{pI}$) ou carga líquida negativa ($\text{pH} > \text{pI}$) que podem interagir com os grupos iônicos dos solventes, facilitando a solubilização (TAN, NAWAZ & BUCKOW, 2021; DAY, 2013). No ponto isoelétrico, onde a carga líquida da proteína é zero, ela apresenta menor solubilidade.

As proteínas de leguminosas (grande parte albuminas e globulinas) solubilizam melhor em pH neutro quando comparadas a outras fontes vegetais, por outro lado as proteínas de cereais, compostas majoritariamente de glutelinas e prolaminas, apresentam baixa solubilidade em pH neutro devido ao baixo conteúdo de aminoácidos carregados (DAY, 2013; LOVEDAY, 2020). O uso de meios alcalinos, solventes orgânicos, temperatura, tratamentos químicos ou sais é frequente para aumentar a solubilidade dessas proteínas (MAJZOBI *et al.*, 2012; ZHAO, TIAN e CHEN, 2010; HOU *et al.*, 2017).

A solubilidade das proteínas é um fator fundamental para muitas propriedades funcionais, como na formação e estabilização de emulsões. As emulsões são sistemas compostos por duas ou mais fases imiscíveis, onde um líquido está disperso em forma de microgotas (fase dispersa) em outro (fase contínua) (TAN, NAWAZ & BUCKOW, 2021;

DAY, 2013). A natureza anfifílica das proteínas permite que elas adsorvam na interface água/óleo, diminuindo a tensão interfacial e estabilizando esses sistemas (KIM *et al.*, 2020).

Apesar de todas as proteínas possuírem natureza anfifílica elas apresentam diferentes propriedades emulsificantes porque podem assumir diferentes conformações (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010). A estabilidade/flexibilidade da cadeia polipeptídica, adaptabilidade a mudanças no meio e a distribuição de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na superfície da proteína são fatores chave (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010). Sendo assim, cada proteína vegetal pode apresentar diferente propriedade emulsificante, a depender da fonte e das condições às quais elas são submetidas.

O mecanismo de adsorção das proteínas na interface acontece em três estágios (KIM *et al.*, 2020). Primeiro a proteína é transportada para a interface, nessa etapa o padrão de distribuição de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos é fundamental para que a migração ocorra (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010). No segundo estágio, ocorre um certo desdobramento molecular e os sítios hidrofóbicos que estavam no centro da estrutura são expostos e adsorvidos na superfície do óleo (NISHINARI *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2020). Por fim, as proteínas adsorvidas produzem um filme viscoelástico ao redor das gotículas, que atribui estabilização estérica (dependendo da proteína) e eletrostática (dependendo das condições do solvente) às gotas (LAM & NICKERSON, 2013).

As proteínas de leguminosas são reconhecidas por terem boa capacidade emulsificante (GEERS *et al.*, 2017; LAM *et al.*, 2018; PENG *et al.* 2018; STONE *et al.*, 2015; MULTARI, STEWART e RUSSELL *et al.*, 2015; SHEVKANI *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2018). Já as proteínas de cereais normalmente apresentam menor capacidade emulsificante quando comparadas às proteínas de leguminosas (STONE *et al.*, 2019). Sua baixa solubilidade em água é frequentemente apontada como limitação para as aplicações em sistemas alimentícios (ZOU *et al.*, 2019). Entretanto, modificações físicas, químicas e enzimáticas têm sido utilizadas para melhorar suas funcionalidades, principalmente na etapa de extração (ZOU *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2020).

2.3. Extração de proteínas

A escolha do método de extração é uma das principais etapas para a utilização apropriada das proteínas vegetais (KUMAR *et al.*, 2021). Esse processo deve ser escolhido para cada matriz vegetal, e normalmente terá um impacto nas características do produto final, como concentração proteica, características físico-químicas e funcionalidades. As técnicas de extração mais convencionais são baseadas na solubilização das proteínas em meio aquoso, salino, alcalino ou utilizando outros solventes, enquanto que outras menos convencionais, normalmente envolvem a ruptura da parede celular, envolvem o uso de enzimas, micro-ondas, alta pressão, campo elétrico pulsado, sonicação, entre outras (KUMAR *et al.*, 2021).

A maior parte das proteínas de origem vegetal comercializadas é obtida pelo método de extração alcalina seguido de precipitação no ponto isoelétrico, por ser um método simples e barato (SIM *et al.*, 2021). A extração alcalina é um método úmido que envolve a ruptura do tecido vegetal e solubilização proteica. A alta alcalinidade do meio facilita a quebra das ligações de hidrogênio e a dissociação da estrutura proteica (CUI *et al.*, 2017). A solubilidade das proteínas também aumenta com o aumento do pH devido à ionização de aminoácidos ácidos ou neutros em altos valores de pH (KUMAR *et al.*, 2020). Em seguida, a proteína é precipitada no seu ponto isoelétrico para obtenção dos concentrados ou isolados (SIM *et al.*, 2021).

A extração alcalina é bastante utilizada para obtenção de proteínas de leguminosas, cereais, oleaginosas e outras matrizes vegetais. O meio alcalino também pode quebrar as pontes dissulfeto, presentes nas proteínas de cereais ricos em cisteína (CONTRERAS *et al.*, 2019; SARI *et al.*, 2015). Além disso, a extração alcalina pode provocar modificações na estrutura da proteína, como desdobramento parcial, alterações na estrutura secundária, perda ou substituição de alguns aminoácidos e hidrólise proteica (KUMAR *et al.*, 2020). Algumas alterações podem ser desejáveis ou não, dependendo da funcionalidade buscada, e a partir do controle dos parâmetros de extração, como tempo, temperatura, razão sólido-solvente e pH pode-se evitar alterações indesejáveis (KUMAR *et al.*, 2020). Por exemplo, aquecer até uma certa temperatura pode favorecer a solubilização, enquanto que o sobreaquecimento pode causar desnaturação proteica que pode ser indesejável (CUI *et al.*, 2017).

2.4. Sorgo

O sorgo (*Sorghum bicolor* L.) é o quinto cereal mais cultivado no mundo (PEZZALI *et al.*, 2020). É um grão resistente a climas secos e quentes e por isso é uma importante fonte de nutrientes em partes da África, Ásia e em regiões com clima semiárido pelo mundo (KLOPFENSTEIN e HOSENEY, 1995; EL-BELTAGI *et al.*, 2012). Entretanto, a área de produção nesses continentes vem diminuindo rapidamente devido principalmente à falta de mercados bem estabelecidos (STAMENKOVIC *et al.*, 2020). Em países como Estados Unidos, Brasil, México e Argentina, o sorgo tem sido utilizado apenas para a alimentação animal (TAYLOR e TAYLOR, 2018) devido principalmente a preferências do consumidor.

Entretanto, apesar do sorgo ser pouco utilizado para a alimentação humana, em alguns continentes existem oportunidades para utilização dos seus grãos e farinhas em novos produtos alimentícios por ser um cereal sem glúten (BANU e APRODU, 2020; PEZZALI *et al.*, 2020). Ainda, devido aos recentes melhoramentos genéticos a biomassa do sorgo também começou a ser utilizada para produção bioenergética (OZANAN *et al.*, 2012; STAMENKOVIC *et al.*, 2020).

Em média, o grão inteiro de sorgo é constituído de 65 - 80 % de carboidratos, 3,5 - 18 % de proteínas, 1,5 - 6 % de lipídios, 1 - 4 % de cinzas e 8 - 12 % de umidade, a depender do genótipo (BALANDRA'N-QUINTANA *et al.*, 2019). Os grãos de sorgo também apresentam uma grande quantidade de compostos fenólicos que podem ser benéficos para a saúde, principalmente os flavonoides e ácidos fenólicos (QIU, 2020; STAMENKOVIC *et al.*, 2020). Por outro lado, os taninos, uma outra classe de polifenóis, estão associados à baixa digestibilidade das proteínas e também podem interferir na solubilidade (EMMAMBUX e TAYLOR, 2003; DUODU, 2003; ESPINOSA-RAMÍREZ e SERNA-SALDÍVAR, 2016).

As proteínas do sorgo podem ser classificadas com base na solubilidade como as dos demais cereais em prolaminas, glutelinas, albuminas e globulinas, sendo que as prolaminas representam aproximadamente 50-60 % das proteínas totais do grão (EMMAMBUX e TAYLOR, 2003). As prolaminas do sorgo são denominadas karifinas, e se encontram principalmente no endosperma amiláceo (HAMAKER e WALL, 1979). Seu peso molecular pode variar de 13 a 29 kDa.

As prolaminas do sorgo são ricas em ácido glutâmico e aminoácidos não polares (prolina, leucina e alanina), mas quase sempre ausentes de lisina (MESA-STONESTREET *et al.*, 2010; TAYLOR & BELTON, 2002). São similares às prolaminas do milho (zeínas) em relação a massa molecular, solubilidade e composição de aminoácidos (DEROSE *et al.*, 1989).

Ambas as proteínas podem ser utilizadas em filmes poliméricos (GILLGREN e STADING, 2008), que podem ser utilizados por exemplo para aumentar a vida de prateleira de alimentos.

No entanto, as prolaminas do sorgo tendem ainda a serem mais hidrofóbicas do que as prolaminas de outros cereais, inclusive as do milho (BELTON *et al.*, 2006). A alta hidrofobicidade das kafirinas e a capacidade de formar ligações dissulfeto são apontadas como características negativas para algumas propriedades funcionais das proteínas, como solubilidade (DUODU *et al.*, 2003), dificultando também sua obtenção a partir de técnicas convencionais (TAYLOR e TAYLOR, 2018; BELTON *et al.*, 2006).

Essas características parecem trazer uma diferenciação dessa proteína das demais já exploradas, principalmente em termos de funcionalidades. Tais especificidades, como baixa digestão por proteases, alta hidrofobicidade, mudanças na estrutura induzidas por solvente, solubilidade em solventes com baixo ponto de ebulição, têm reforçado o potencial uso dessas proteínas em sistemas de encapsulação de compostos bioativos, em filmes biodegradáveis e emulsões *Pickering* (XIAO, NIAN e HUANG, 2015; XIAO *et al.*, 2016).

A extração das proteínas do sorgo tem sido utilizada principalmente para estudar as kafirinas e entender suas ligações cruzadas (IOERGER *et al.*, 2020). Para isso, normalmente são empregados solventes e compostos tóxicos, como *tert*-butanol e β -mercaptoetanol (IOERGER *et al.*, 2020; PARK e BEAN, 2003). Por outro lado, outros trabalhos têm buscado a extração voltada para alimentos, e para isso utilizaram ácido acético ou etanol, com adição de agentes redutores, como metabissulfito de sódio que é potencialmente alergênico (MESA-STONESTREET *et al.*, 2010; TAYLOR *et al.*, 2005; PONTIERI *et al.*, 2019; ESPINOSA-RAMÍREZ e SERNA-SALDÍVAR, 2016). Já a extração alcalina, que já é comercialmente aplicada para obtenção de proteínas vegetais ainda é pouco utilizada para obtenção das proteínas do sorgo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

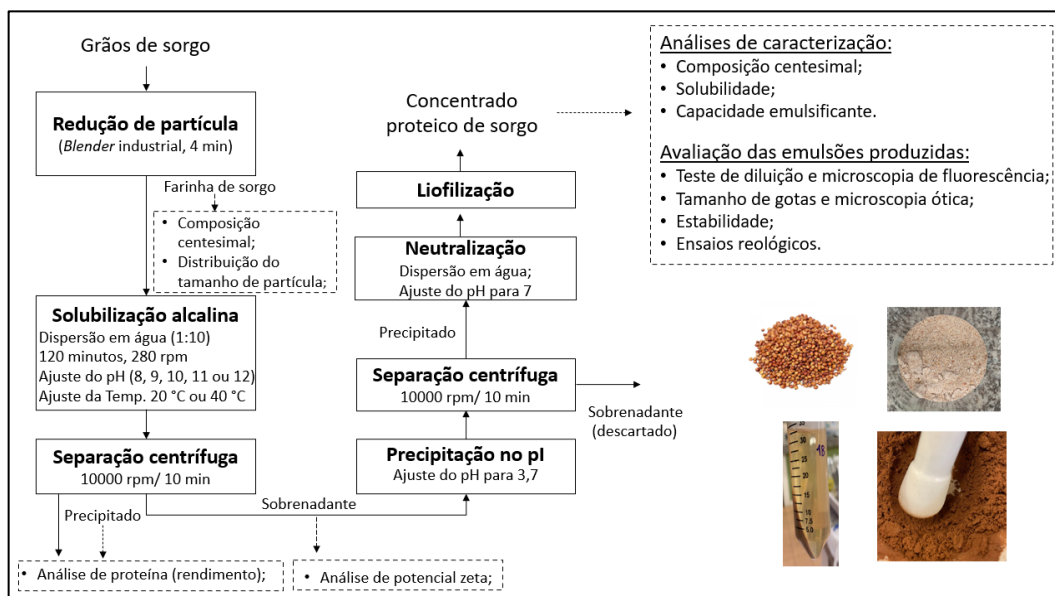
Grãos de sorgo granífero (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) de coloração avermelhada foram obtidos no comércio local de Montes Claros-MG. Os grãos foram limpos e triturados em um *blender* industrial de alta rotação (Marchesoni, Brasil) por 4 minutos para obtenção da farinha de sorgo. A farinha foi acondicionada em *freezer* até o momento de uso. O óleo de girassol (Salada, Brasil) foi obtido no comércio local. Todos os outros reagentes foram utilizados em grau analítico.

3.2. Extração alcalina

Após a produção da farinha o tamanho de partícula da farinha foi avaliado utilizando equipamento de medição por difração a *laser* Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido). Para a obtenção das proteínas do sorgo, a extração alcalina seguida de precipitação no ponto isoelétrico foi utilizada. Primeiramente, a etapa de solubilização das proteínas foi realizada avaliando diferentes condições de pH (9, 10, 11 e 12) na temperatura ambiente de 20 °C e à 40 °C (temperatura máxima antes que ocorresse a gelatinização da mistura). Para controlar a temperatura e a agitação magnética (280 rpm) os ensaios foram realizados em béquer encamisado devidamente vedado. O procedimento de extração foi realizado por 120 minutos utilizando uma proporção de 1:10 de sólido:solvente. Após a etapa de solubilização, o sobrenadante foi separado por centrifugação (10.000 g, 10 minutos, 4 °C) e posteriormente utilizado para precipitação das proteínas em seu ponto isoelétrico. Então, o sobrenadante da etapa de extração foi seco e avaliado quanto ao teor de proteínas pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2005) para determinação da quantidade de proteína solubilizada. Para o cálculo do rendimento de extração, foi utilizada a Equação I.

$$\text{Rendimento proteico (\%)} = \frac{\text{Massa de proteína solubilizada}}{\text{Massa de proteína na farinha}} \times 100 \text{ (Eq. I)}$$

Figura 1- Diagrama de processo para a extração das proteínas do sorgo.



3.3. Precipitação proteica

O ponto isoelétrico das proteínas solubilizadas foi determinado a partir da análise de potencial zeta (seção 3.4.3) para posterior precipitação proteica. Assim, o sobrenadante obtido na etapa de solubilização seguiu para a precipitação das proteínas no ponto isoelétrico. O precipitado foi obtido após centrifugação (10.000 g, 10 minutos, 4 °C), ressuspenso em pH 7 e liofilizado.

3.4. Caracterização do concentrado proteico

3.4.1. Composição centesimal

A composição centesimal do concentrado liofilizado e da farinha de sorgo foi avaliada pelos seguintes métodos: o teor de umidade foi determinado por secagem em estufa à 105 °C até peso constante (AOAC, 2005), o conteúdo de lipídios foi avaliado por Bligh e Dyer (1959) e o conteúdo proteico pela metodologia de Kjeldahl (AOAC, 2005), utilizando 5,67 como fator de conversão para as proteínas de sorgo (MARIOTTI *et al.*, 2008). Os carboidratos totais foram determinados pelo método de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1951) utilizando dextrose como padrão. O teor de cinzas foi obtido por incineração em mufla à 550 °C. E por fim o conteúdo de fibras foi calculado por diferença.

3.4.2. Solubilidade

A solubilidade das proteínas foi avaliada em diferentes valores de pH usando a metodologia desenvolvida por Morr *et al.* (1985). Resumidamente, dispersões contendo 1 % de proteína foram preparadas com água Milli-Q. Em seguida, o pH da solução foi ajustado com HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M para 2, 4, 7 e 9. A dispersão foi agitada em banho maria com agitação orbital Dubnoff durante 1 hora à 25 °C. Após o período de solubilização, a dispersão foi centrifugada a 10.000 g por 20 minutos à 4 °C. Finalmente, o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro Whatman No. 1 e o conteúdo de proteína do filtrado foi determinado por análise de Kjeldahl.

3.4.3. Potencial Zeta

O potencial zeta das proteínas obtidas foi avaliado em função do pH utilizando o equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Reino Unido). O ajuste do pH foi feito manualmente utilizando NaOH e HCl, 1 M, 0,1 M e 0,01 M. Para a análise, foram preparadas dispersões contendo 0,1 % (m/m) de proteína em água Milli-Q a 25°C. O potencial zeta foi então determinado pela mobilidade eletroforética, usando a equação de Henry e a aproximação de Smoluchnowski.

3.4.4. Capacidade emulsificante

A capacidade emulsificante das proteínas obtidas por extração alcalina nas diferentes condições foi avaliada a partir do preparo de uma série de emulsões com diferentes massas de óleo (2 a 9 g) e soluções de proteína à 1 % (m/m) em tubos de 50 mL. As amostras foram homogeneizadas por 5 minutos a 8.000 rpm em Ultra-Turrax (T10 Basic, IKA, Alemanha) e a condutividade da emulsão foi medida imediatamente após a preparação usando um medidor de condutividade digital de bancada (Modelo Orion 3Star, Thermo Fisher Scientific, Brasil). A capacidade emulsificante foi então determinada antes do ponto de inversão, quando a condutividade atingiu valor de 0 μ S (KARACA, LOW e NICKERSON, 2011).

3.5. Aplicação do concentrado proteico obtido por extração alcalina em emulsões

3.5.1. Preparo das emulsões

Para o preparo das emulsões foram preparadas dispersões proteicas em diferentes concentrações (0,5 %, 1 % e 2 %) e fração de óleo (30 %, 50 % e 70 %). Os concentrados proteicos foram primeiramente solubilizados em água Milli Q à 25 °C durante 1 hora. O pH das soluções foi mantido em 7. Em seguida, foi adicionado óleo de girassol (Salada, Brasil) e as soluções foram homogeneizadas em equipamento Ultra-Turrax (T10 Basic, IKA, Alemanha) a 20.500 rpm por 4 minutos. As emulsões foram caracterizadas pelo tamanho e estabilidade das gotas.

3.5.2. Caracterização das emulsões produzidas

3.5.2.1. Tamanho de gota e microscopia ótica

A distribuição do tamanho de gotas das emulsões foi obtida através de medidas utilizando difração à laser (Mastersizer 2000, Malvern Instrument, Reino Unido), com um acessório Hydro 2000 acoplado para dispersões úmidas. Todas as medidas das emulsões foram feitas dentro de um intervalo de obscuração de 11 a 15 %. A distribuição do tamanho das gotas foi avaliada para as diferentes emulsões variando a concentração de proteínas (0,5 %, 1 % e 2 % m/m). A morfologia das emulsões produzidas também foi determinada por microscopia ótica com aumento de 100x utilizando microscópio Carl Zeiss (modelo Axio Scope A1, Alemanha), a aquisição das imagens foi feita digitalmente utilizando o software Zen Lite (Carl Zeiss, Alemanha).

3.5.2.2. Teste de diluição e microscopia de fluorescência

Para verificar o tipo de emulsão formada (A/O ou O/A) foi realizado o teste de diluição e microscopia ótica de fluorescência, como descrito por Prista, Alves e Morgado (1996). Primeiramente a fase oleosa foi corada com Vermelho do Nilo, em seguida foi preparada uma emulsão (70/30) com 1 % de proteína, e então foi adicionado o mesmo volume de água. Para visualização das gotas foi utilizado microscópio Carl Zeiss com aumento de 100x (modelo Axio Scope A1, Alemanha), com filtro de fluorescência. A aquisição das imagens foi feita digitalmente utilizando o software Zen Lite (Carl Zeiss, Alemanha). As imagens foram obtidas utilizando laser de 552 e 636 nm para excitação e emissão do corante, respectivamente.

3.5.2.3. Estabilidade

Emulsões óleo em água (10 mL) foram preparadas conforme descrito previamente (seção 3.5.1.). As emulsões com diferentes frações de óleo (30 %, 50 % e 70%) e depois concentrações de proteína (0,5 %, 1 % e 2 %) foram preparadas em frascos de vidro com diâmetro interno de 23 mm e altura de 55 mm. A estabilidade das emulsões foi acompanhada observando a separação da fase creme após 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 1 dia e 7 dias em temperatura ambiente. O índice de cremação foi expresso como:

$$IC (\%) = \frac{H_i}{H_t} \times 100 \text{ (Equação II)}$$

Onde, H_i é a altura da fase creme separada e H_t é a altura total (KARACA, LOW e NICKERSON, 2011).

3.5.2.4. Ensaios reológicos

Para as análises reológicas foi utilizado reômetro Advanced Rheometer AR 2000 (TA Instruments, Estados Unidos). A viscosidade das emulsões frescas foi avaliada utilizando cisalhamento contínuo em um intervalo de tempo de 0 à 300 s⁻¹ à 25 °C, utilizando três rampas de escoamento, para eliminar a tixotropia. Para realização dos ensaios utilizou-se uma geometria do tipo placa-placa rugosa de 40 mm. A relação tensão de cisalhamento por taxa de deformação foi utilizada para ajustar o comportamento de escoamento do fluido ao modelo Herchel-Bulklev (Equação III).

$$\sigma = \sigma_i + K(\dot{\gamma})^n \text{ (Equação III)}$$

Onde,

σ é a tensão cisalhamento, $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento, σ_i é a tensão residual, k é o índice de consistência e n é o parâmetro de comportamento.

3.6. Análise estatística

Todos os ensaios de extração foram realizados em duplicatas e as análises em triplicatas ou duplicatas. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. A análise de variância (ANOVA) seguida do teste Tukey ($p < 0,05$) foram realizados para comparação estatística das médias utilizando o software livre SAS University.

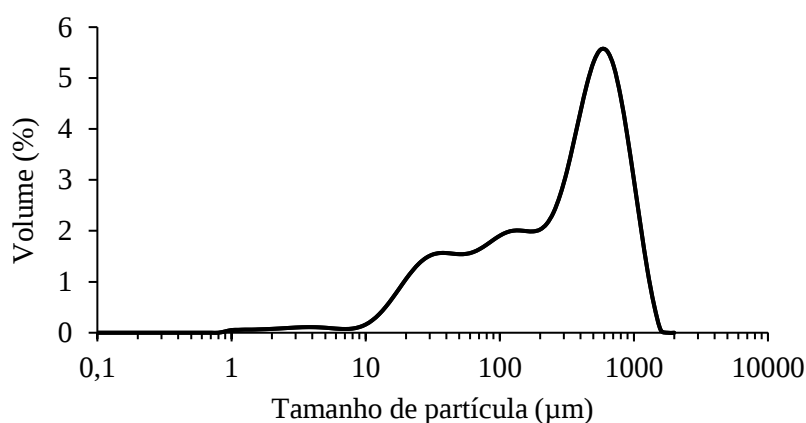
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração

4.1.1. Tamanho de partícula e composição centesimal da farinha

Para a extração alcalina foi utilizada a farinha de sorgo integral que foi obtida através da trituração dos grãos de sorgo. A distribuição do tamanho de partícula da farinha de sorgo integral está apresentada na Figura 1. A distribuição foi polidispersa, com diâmetros entre 0,89 μm e 1588 μm , e a moda foi de 563 μm . Observa-se também outros picos com mediana de 39 μm e 141 μm . Vishwanathan, Singh e Subramanian (2011) verificaram que foi possível recuperar 97 % de proteína de soja de frações com tamanho de partícula menores que 75 μm e apenas 41 % de frações maiores (355-710 μm). Isso pode indicar que frações menores apresentam maior teor de proteína e frações maiores são ricas em outros componentes, sendo assim, é esperando uma distribuição polidispersa dos grânulos de farinhas vegetais. Uma maior redução no tamanho de partícula, apesar de aumentar a superfície de contato e favorecer a transferência de massa, não necessariamente indicaria maior recuperação proteica, já que os maiores tamanhos estão associados a outros componentes como carboidratos.

Figura 1- Distribuição do diâmetro médio de partícula da farinha de sorgo integral utilizada para extração alcalina das proteínas.



Na Tabela 1 se encontram os resultados para a composição da farinha utilizada para extração proteica. Para as proteínas o valor encontrado foi de 9,20 %. O teor de carboidratos foi de 62,56 % e 12,46 % de fibras (obtido por diferença). Já para os lipídios o valor foi de 3,85 %, para umidade 10,85 % e por fim 0,98 % de cinzas. De acordo com Balandra'n-Quintana *et al.*, (2019), em média o grão de sorgo contém cerca de 3,5 a 18 % de proteína, 1,5 a 6 % de lipídios, de 65 a

80 % de carboidratos, 8 a 12 % de umidade e entre 1 e 4% de cinzas, a depender do genótipo. Pezzali *et al.*, (2020) encontrou os valores de $12,28 \% \pm 0,47$ para umidade, $8,22 \% \pm 0,16$ para proteína, $3,03 \% \pm 0,23$ de lipídios e $1,01 \% \pm 0,20$ para o conteúdo de cinzas na farinha de sorgo vermelho. Em relação ao conteúdo de amido, Banu e Aprodu (2020) reportam um valor de $69,63\% \pm 0,60$. Por fim, o conteúdo de fibras no sorgo que é relativo à celulose, arabinoxilas, β -glucanas, hemiceluloses, pectinas e pequenas quantidades de lignina, representam cerca de 6,5-12,2 % do grão, de acordo com Serna-Saldivar e Espinosa-Ramírez (2019). Deste modo, os valores encontrados estão dentro do esperado.

Tabela 1- Resultados para composição centesimal da farinha de sorgo integral. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ desvio padrão.

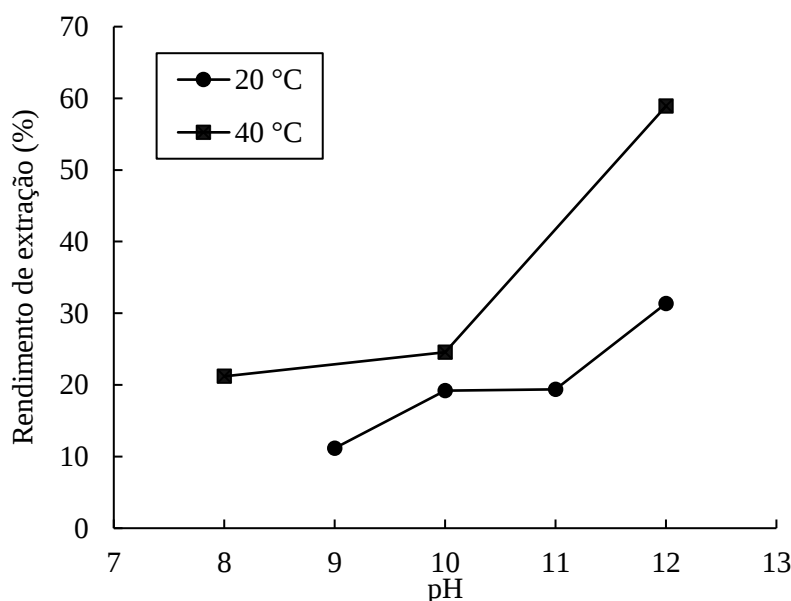
Proteína (%)	$9,20 \pm 0,01$
Lipídios (%)	$3,85 \pm 0,09$
Umidade (%)	$10,85 \pm 0,04$
Carboidratos (%)	$62,56 \pm 3,31$
Cinzas (%)	$0,98 \pm 0,19$
Fibras (%) *	12,46

*Obtido por diferença.

4.1.2. Extração alcalina

Os valores de rendimento proteico para a extração alcalina na temperatura de 20 °C podem ser visualizados na Figura 2. Em geral, foi possível aumentar o rendimento de extração com o aumento do pH, sendo que o maior valor foi obtido no pH 12, condição mais alcalina (Figura 2). Isso se deve, pois, com o aumento do pH, os aminoácidos neutros e ácidos são ionizados, aumentando a carga negativa total da proteína e favorecendo sua solubilização (KUMAR *et al.*, 2021). O meio alcalino também pode quebrar as ligações dissulfeto, que são bastante presentes em cereais, facilitando a solubilização das proteínas (SARI *et al.*, 2015; HAMADA, 1997). Além disso, a extração alcalina também favorece a degradação da parede celular, mecanismo ainda pouco elucidado, mas acredita-se que ocorra remoção parcial de ligninas e alteração da composição química e estrutural das hemiceluloses e consequentemente facilitando a liberação das proteínas (SARI *et al.*, 2015; PEROVIĆ *et al.*, 2020).

Figura 2- Rendimento proteico para extração alcalina das proteínas de sorgo em diferentes valores de pH a 20 °C e 40 °C.



O aumento do rendimento expressivo em pH 12 ($p < 0,05$) pode estar associado a maior degradação da parede celular que ocorre em valores de pH maiores (SARI *et al.*, 2015). Em valores de pH extremos também pode ocorrer alterações mais significativas na estrutura das proteínas, como a hidrólise de ligações peptídicas, destruição ou agregação de grupos sulfidril e desnaturação proteica (BERNARDI *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2020). Algumas modificações podem favorecer algumas propriedades funcionais, por exemplo, durante alterações de pH em meios fortemente alcalinos ou ácidos, pode ocorrer mudanças

conformacionais na estrutura da proteína que podem melhorar suas propriedades (SIM *et al.*, 2021).

O aumento do rendimento de extração com o pH é relatado em outros trabalhos que utilizaram a extração alcalina para obtenção de proteínas vegetais (GAO *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2010). Entretanto, é esperado que para cereais, geralmente valores de pH próximos ao neutro ou pouco alcalinos resultem em rendimentos ainda menores quando comparados com outras fontes, devido à alta presença de proteínas pouco solúveis. Para cereais com alto teor de prolaminas, como trigo, milho e cevada, as proteínas em geral só começam a solubilizar a partir do pH 11 (DELEU *et al.*, 2019). Wang *et al.* (2010) utilizou a extração alcalina para obter proteínas da cevada, e para pH 9 e 10, variando a temperatura para 23 °C, 40 °C e 60 °C conseguiram recuperar entre 9 e 27 % da proteína do grão. Sendo a cevada um cereal com menor quantidade de prolaminas que o sorgo.

A extração também foi avaliada na temperatura de 40 °C em pH 8, 10 e 12 (Figura 2). O rendimento de extração a 40 °C para o pH 8 foi de 21,19 % $\pm$ 2,02, e foi estatisticamente igual ao rendimento em pH 10 ($p > 0,05$), de 24,57 % $\pm$ 1,97. Já em pH 12 o rendimento foi de 58,90 % $\pm$ 3,94, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais valores de pH avaliados nesta temperatura. Esse valor também foi praticamente duas vezes maior que na temperatura de 20 °C (31,36 % $\pm$ 1,19). Normalmente o aumento de temperatura até 40 °C pode favorecer a solubilização proteica (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010). Além disso, o aumento da temperatura pode favorecer o processo de degradação celular, contribuindo para a difusão.

Trabalhos recentes mostram que a elevação da temperatura até ~100 °C pode aumentar consideravelmente o rendimento na extração de proteínas vegetais (temperaturas mais altas poderiam provocar hidrólise proteica excessiva) (KUMAR *et al.*, 2020). No presente trabalho, outras temperaturas acima de 40 °C também foram testadas, entretanto, a partir de 50 °C ocorreu um grande aumento da viscosidade que impediu a mistura, possivelmente devido à gelatinização do amido.

Diferente de outras técnicas de extração de proteínas, como na utilização de solventes polares, a extração alcalina pode favorecer a solubilização de todas as frações proteicas, apesar das prolaminas serem fortemente afetadas pela polaridade do meio. Considerando o rendimento de extração obtido de 58,90 % $\pm$ 3,94, e que na presença do meio alcalino há o favorecimento da solubilização principalmente de albuminas, globulinas e glutelinas, acredita-se que, além da solubilização dessas frações, que juntas representam aproximadamente 40 % das proteínas do grão, também foi possível solubilizar parte das prolaminas. Isso indica que os concentrados

proteicos obtidos devem apresentar diferentes frações de proteínas. Sendo assim, com base no melhor rendimento proteico obtido com o efeito da temperatura, foram produzidos concentrados proteicos a partir de três diferentes condições de extração, pH 8, 10 (condições branda e moderada) e 12 (condição extrema) à 40 °C para obtenção das proteínas e avaliação das propriedades funcionais dos concentrados.

4.1.3. Composição centesimal

Na Tabela 1 encontram-se os resultados para a composição dos concentrados proteicos obtidos. Os concentrados proteicos não apresentaram diferença significativa em relação ao conteúdo de lipídios e umidade ($p > 0,05$). Em relação ao teor de proteína, o concentrado obtido no pH 8 apresentou um valor menor quando comparado aos demais ($p < 0,05$), possivelmente associado a menor quantidade de proteína solubilizada durante a extração nessa condição. Apesar dos concentrados obtidos no pH 10 e 12 não apresentarem diferença estatística ($p > 0,05$) em relação ao conteúdo de proteína, em pH 12 o rendimento de extração foi quase 3 vezes maior.

O teor de proteína da farinha foi concentrado em cerca de quatro vezes para todas as condições avaliadas, diminuindo consideravelmente o teor de carboidratos e umidade. Para o teor de proteínas no concentrado, outros valores já foram reportados na literatura como 48 %, 60 % e 52 %, utilizando a extração alcalina (WU, 1978; PONTIERI *et al.*, 2019). A diferença entre os valores reportados pode ser tanto devido aos diferentes genótipos de sorgo existentes quanto às condições de processo.

O conteúdo de lipídios e cinzas obtido também corrobora com os valores reportados por Wu (1978). Pode-se dizer que o teor de lipídios também se concentrou, possivelmente devido a afinidade desses compostos às proteínas do sorgo, que possuem muitos grupos hidrofóbicos. Apesar da composição lipídica variar entre cultivares, o sorgo apresenta uma grande proporção de ácidos graxos insaturados (~74 %), dentre os quais, o linoleico é o principal; já entre os saturados o ácido palmítico é o principal (MAESTRI *et al.*, 1996). Outros trabalhos também observaram a concentração do teor de lipídios durante a produção de concentrados obtidos por extração alcalina, como para o concentrado proteico de farelo de trigo e de grão de bico (ALZUWAID *et al.*, 2020; GHRIBI *et al.*, 2015). Por fim, em relação ao conteúdo de cinzas, o aumento se deve pela remoção de grande parte dos carboidratos e compostos insolúveis, e possivelmente devido ao NaCl produzido durante os ajustes de pH.

Outros trabalhos que utilizaram a extração alcalina para extrair proteínas do sorgo obtiveram grau de pureza de proteína semelhante (WU, 1978; PONTIERI *et al.*, 2019), logo, provavelmente a pureza deve estar associada à complexa matriz vegetal do sorgo, onde as proteínas estão envoltas por diversos outros componentes. O conteúdo de fitatos, fibras e compostos fenólicos também podem ter afetado a pureza do concentrado proteico, pois esses componentes podem se ligar às proteínas (WANG *et al.*, 2010). Ademais, também pode ter ocorrido perdas durante o processo de extração.

Tabela 2- Composição proximal dos concentrados proteicos obtidos a partir de diferentes condições de pH (8, 10 e 12) a 40 °C. Os valores foram calculados como a média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística a 5 % de significância através do teste Tukey.

Concentrado proteico de Sorgo	pH 8	pH 10	pH 12
Proteína (%)	37,26 $\pm$ 0,08 ^b	41,92 $\pm$ 0,09 ^a	41,46 $\pm$ 0,08 ^a
Lipídios (%)	34,88 $\pm$ 0,85 ^a	33,23 $\pm$ 1,48 ^a	30,70 $\pm$ 0,08 ^a
Umidade (%)	4,96 $\pm$ 0,40 ^a	4,64 $\pm$ 0,49 ^a	5,40 $\pm$ 0,19 ^a
Cinzas (%)	4,32 $\pm$ 0,05 ^a	4,26 $\pm$ 0,00 ^a	3,62 $\pm$ 0,24 ^b
Carboidratos (%) *	18,58	15,95	18,82

*Obtido por diferença de 100%.

A presença de alguns componentes não-proteicos pode não interferir nas propriedades funcionais dos concentrados proteicos, como alguns polímeros e lipídios, enquanto que alguns polissacarídeos podem ainda melhorar algumas propriedades (SIM *et al.*, 2021; SRIDHARAN *et al.*, 2020). As proteínas podem interagir com os polissacarídeos através de interações covalentes ou eletrostáticas, essas interações podem resultar na melhoria de funcionalidades dos concentrados, pois em geral os polissacarídeos podem apresentar alta hidrofiliabilidade, alta capacidade de gelificação, além de levar ao aumento de viscosidade.

Um dos maiores desafios para obtenção das proteínas vegetais é a complexa matriz vegetal, pois as proteínas estão em corpos proteicos normalmente envoltas por outros componentes (NTONE *et al.*, 2021). A busca por processos de refinamento e purificação podem levar a não funcionalidade proteica ou até mesmo inviabilizar o uso comercial dos concentrados devido ao alto custo e impacto ambiental do processo (VAN DER GOOT *et al.*, 2016). Essas dificuldades poderiam levar a baixa utilização das proteínas vegetais. Deste modo, a utilização

de concentrados ou farinhas que apresentam funcionalidades tecnológicas desejáveis pode ser uma alternativa economicamente mais viável.

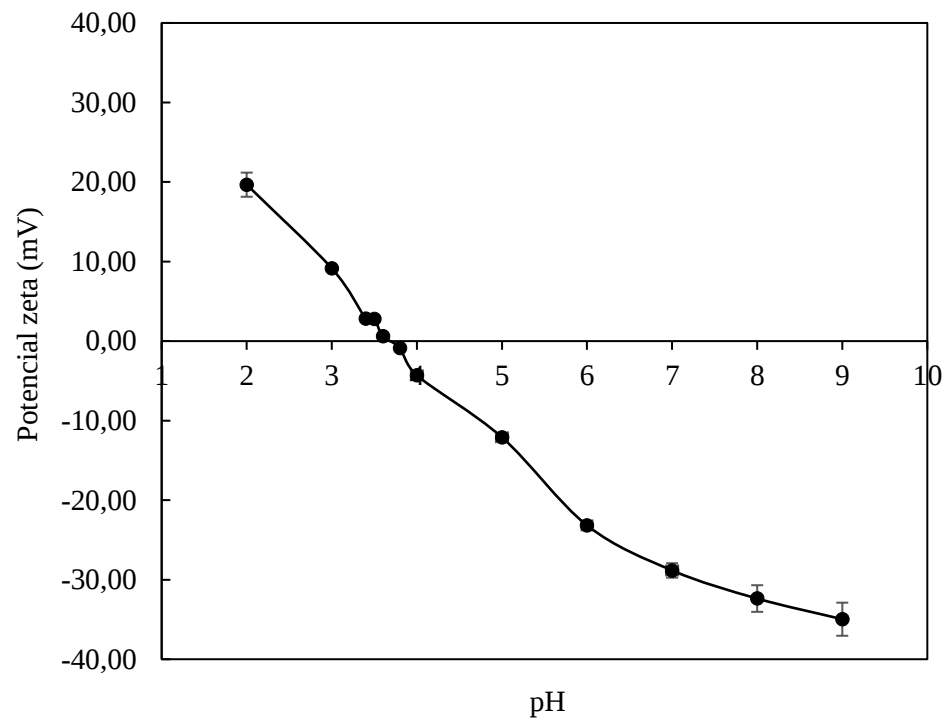
4.1.4. Potencial zeta

O potencial zeta das proteínas solubilizadas em função do pH pode ser visualizado na Figura 4. A carga superficial da proteína é uma medida de grande importância tecnológica, pois a partir dela é possível verificar o balanço das interações proteína-proteína ou proteína-solvente em diferentes condições (GALVES *et al.*, 2019). Quanto maior a carga positiva ou negativa da proteína, maior será a interação com o solvente, por conta da alta repulsão eletrostática entre as partículas, e quanto mais próxima a zero menor será a repulsão eletrostática, favorecendo as interações proteína-proteína (GALVES *et al.*, 2019; LONG e LABUTE, 2010).

O pH no qual a carga da proteína é nula é denominado de ponto isoelétrico (pI). Nessa condição as proteínas do concentrado apresentam menor solubilidade (SIM *et al.*, 2021). Neste caso, o pI das proteínas do sorgo estimado foi de 3,7. Isso pode indicar que há uma predominância de outras frações proteicas que não prolaminas, já que as prolaminas do sorgo apresentam pI de 5,9 (CSONKA *et al.*, 1926). Wu (1978) avaliou a solubilidade das proteínas do sorgo em diferentes valores de pH e as proteínas ficaram insolúveis entre o pH 3,5 e 5,8, o que corrobora com o valor encontrado. Ademais, na Figura 4 pode-se observar que em pH 2, por exemplo, o potencial zeta foi de +19,67 mV. Por outro lado, em pH 9, o potencial zeta foi de -34,97 mV. Dentro da faixa de pH avaliada neste trabalho, estas duas condições podem resultar em maior repulsão eletrostática entre as moléculas.

A partir do pH 8, a inclinação da curva de potencial zeta já diminui, indicando que a partir deste pH as proteínas já apresentam boa solubilidade, entretanto o que se verificou é que o rendimento de extração no pH 8 foi baixo (seção 4.1.2). Assim, acredita-se que o aumento do pH durante a etapa de solubilização pode também ser relacionado a uma maior degradação da parede celular, que somente pelo aumento da solubilidade com o aumento do pH.

Figura 4- Potencial zeta das proteínas do sorgo obtidas por extração alcalina em pH 12.



4.2. Caracterização dos concentrados proteicos

4.2.1. Solubilidade

A solubilidade é uma propriedade funcional importante para as diversas aplicações funcionais das proteínas em alimentos como formação de espuma, emulsão e gelificação (GAO *et al.*, 2020). O perfil de solubilidade das proteínas do sorgo para os concentrados obtidos em diferentes condições de pH pode ser observado na Figura 5. Perfis de solubilidade com esse comportamento, formato-U, normalmente são reportados para outras proteínas vegetais (ALZUWAID *et al.*, 2020; GHRIBI *et al.*, 2015).

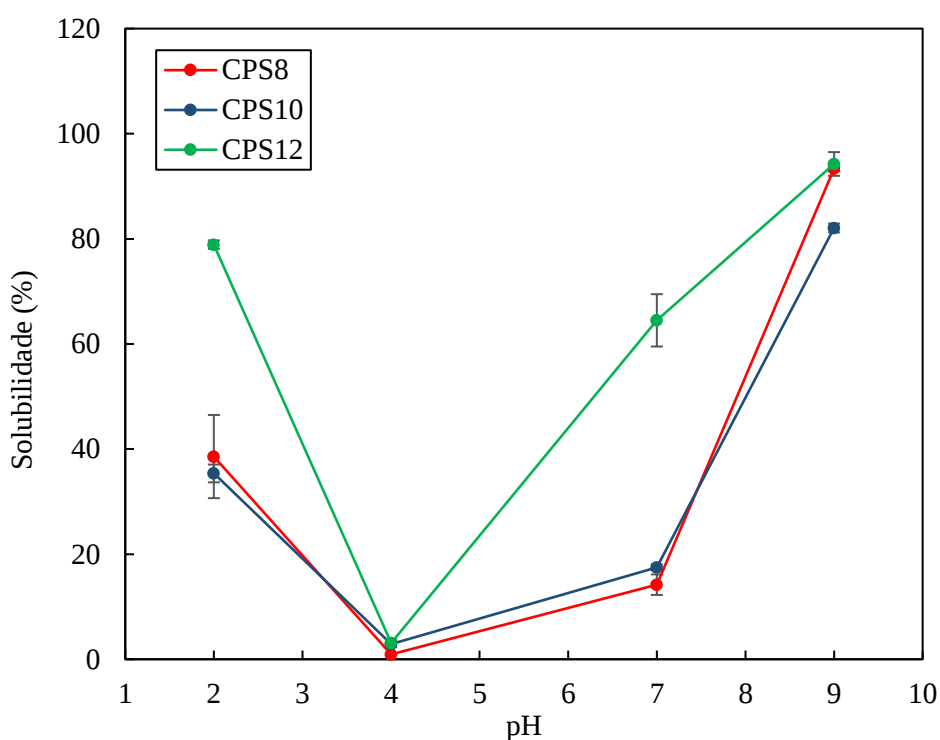
O pH de menor solubilidade para as proteínas do sorgo em todos os concentrados foi 4, que está de acordo com o resultado de potencial zeta (Figura 4), indicando baixa repulsão eletrostática nesta condição, o que leva a agregação e insolubilidade proteica. Grande parte das proteínas vegetais são insolúveis em pH entre 4 e 5 (ALZUWAID *et al.*, 2020; GALVES *et al.*, 2019; GERZHOVA *et al.*, 2015). Com o aumento do pH ocorre o aumento das cargas negativas da proteína, facilitando a interação proteína-solvente. Do mesmo modo, com a diminuição do pH ocorre um aumento da carga positiva, indicando também uma melhor interação entre a proteína e o solvente. Por isso, em geral, os concentrados proteicos apresentaram boa solubilidade em meios alcalinos e ácidos. A boa solubilidade em geral dessas proteínas também pode indicar a presença principalmente de albuminas, globulinas e glutelinas nos concentrados.

Em pH 7, a solubilidade das proteínas foi de $14,19 \% \pm 1,96$ e $17,50 \% \pm 0,56$ para o concentrado proteico obtido em pH 8 (CPS 8) e para o concentrado proteico obtido em pH 10 (CPS 10), respectivamente, já para o concentrado proteico obtido em pH 12 (CPS 12) a solubilidade aumentou para $64,49 \pm 4,98 \%$. Em relação às proteínas obtidas em condições alcalinas branda (pH 8 - CPS 8) e moderada (pH 10 - CPS 10), a baixa solubilidade em pH 7 pode indicar que a natureza das proteínas, principalmente glutelinas e prolaminas, foi pouco modificada pelo processo de extração. Já a alta solubilidade das proteínas do CPS 12 pode estar relacionada à possível modificação na estrutura das proteínas provocada pelo processo de extração.

Uma possível modificação seria decorrente da alteração na estrutura terciária das proteínas devido aos ajustes de pH para valores extremos (pH 12). A alta repulsão entre as cadeias laterais nessas condições resultariam em um desdobramento parcial da estrutura terciária das proteínas e esse processo poderia melhorar a solubilidade das proteínas (KRISTINSSON e HULTIN, 2003). Nissen *et al.*, (2021), avaliaram as propriedades de proteínas de folha de alfafa submetidas a um processo de alteração de pH (pH-*shift*) e o ajuste

do pH para 11 resultou em uma melhor solubilidade. Foi possível aumentar a solubilidade de 50 % para 70-80 % em condições de pH neutro (pH 7) após o tratamento, além de melhorar outras propriedades funcionais, como a formação de espuma. Assim, um processo semelhante pode ter ocorrido e provocado o aumento expressivo da solubilidade em pH 7 do CPS 12. Entretanto, é necessária uma avaliação estrutural das proteínas dos concentrados proteicos obtidos nas diferentes condições avaliadas.

Figura 5- Perfil de solubilidade para os concentrados proteicos obtidos em diferentes condições de extração (pH 8, 10 e 12) obtidos na temperatura de 40 °C.



4.2.2. Capacidade emulsificante

A capacidade emulsificante (CE) é definida como a quantidade máxima de óleo que pode ser acrescentado à uma solução aquosa proteica sem que ocorra quebra ou inversão para uma emulsão água-em-óleo (A/O) (MCCLEMENTS, 2007; SHERMAN, 1995). A inversão de fases foi verificada a partir da redução drástica da condutividade elétrica quando a emulsão O/A inverteu para A/O.

A capacidade emulsificante para as proteínas obtidas em pH 12 (CPS 12) foi de 400 g óleo/g de proteína, já em pH 8 (CPS 8) e 10 (CPS 10) foram respectivamente 282,5 e 300 g óleo/g de proteína. O maior valor de capacidade emulsificante das proteínas obtidas em pH 12 pode estar relacionado à melhor solubilidade que elas apresentaram em pH 7 em relação aos demais concentrados (Figura 5). A solubilidade pode favorecer a taxa de difusão das proteínas na interface melhorando a capacidade emulsificante. Outros trabalhos também mostraram uma correlação positiva entre a solubilidade e a capacidade emulsificante (KARACA, LOW e NICKERSON, 2011).

Por outro lado, assim como a solubilidade foi alterada pela condição de extração, o balanço hidrofóbico entre os concentrados também pode ter sido modificado pelo processo de extração e resultado em uma melhor atividade interfacial. Alterações na estrutura da proteína devido a condição de pH também poderiam ser responsáveis pelos diferentes valores de CE encontrados. Zhang *et al.*, (2009) apontam que a flexibilidade molecular das proteínas globulares é um fator fundamental para as propriedades emulsificantes e pode ser alterada pelas condições de pH.

As diferenças conformacionais podem ainda estar relacionadas às diferentes frações solubilizadas, sendo assim, as diferentes frações proteicas que podem estar presentes em quantidades distintas nos concentrados também poderiam ser responsáveis pelos valores encontrados para a capacidade emulsificante. Sabe-se que as frações proteicas podem apresentar conformações estruturais específicas, podendo estabilizar interfaces por mecanismos distintos (YANG e SAGIS, 2021). Trabalhos na literatura mostram que frações específicas de uma mesma fonte vegetal podem apresentar diferentes propriedades emulsificantes (*ex*: globulinas e albuminas de canola) (YANG e SAGIS, 2021; KORNET *et al.*, 2022; HOUDE *et al.*, 2018).

Destaca-se ainda que há limitações para comparar dados de CE com outras fontes vegetais, pois diversas técnicas são encontradas para avaliar a capacidade emulsificante, assim como diferentes tipos de óleos são utilizados e processos de produção de emulsões. Entretanto,

a capacidade emulsificante de outras proteínas vegetais, em geral de leguminosas, são reportadas. Considerando tais limitações, para um concentrado proteico de grão de bico, o valor reportado na literatura foi de 413 ml de óleo/g de proteína, para um concentrado proteico de soja 399 ml de óleo/g de proteína e de ervilha 240 ml de óleo/g de proteína (TOWES e WANG, 2013).

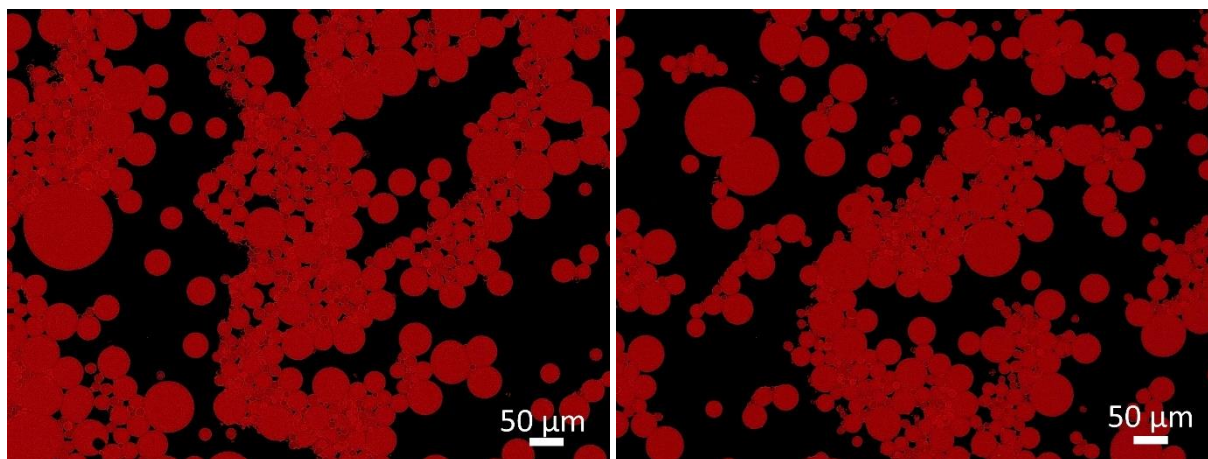
Assumindo a densidade do óleo de girassol à 25 °C como 0,92 g/mL, a CE do CPS 12 seria de 435 mL óleo/g de proteína, valor maior que o reportado para as proteínas de soja, grão de bico e ervilha. Ainda para os concentrados obtidos nas condições com menores valores de CE deste estudo, CPS 8 (307 mL óleo/g de proteína) e CPS 10 (326 mL óleo/g de proteína), os valores são maiores do que o reportado para a proteína de ervilha, frequentemente utilizada na produção de produtos análogos de carne encontrados comercialmente. Logo, os valores encontrados são interessantes para uma proteína de cereal, que em geral podem apresentar menor CE que leguminosas (ZHAO *et al.*, 2020).

4.3. Caracterização das emulsões produzidas

4.3.1. Microscopia de fluorescência

Após a produção de uma emulsão adicionou-se o mesmo volume de água e não foi observada a separação de fases o que foi um indício de que a emulsão produzida era O/A. Em seguida, como a fase lipídica da emulsão havia sido corada com Vermelho do Nilo, a emulsão foi visualizada a partir de microscopia ótica de fluorescência. Na Figura 7 é possível observar as gotas de óleo em vermelho, confirmando que a emulsão formada era óleo-em-água.

Figura 7- Microscopias de fluorescência das emulsões O/A com 70 % de fase oleosa. A fase óleo das emulsões é apresentada em vermelho. Aumento de 100x.



4.3.2. Estabilidade

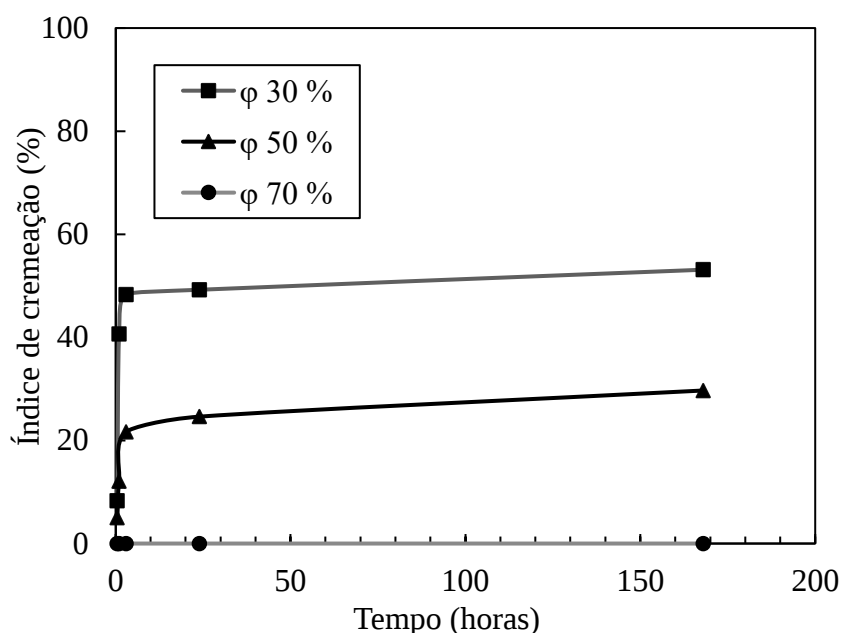
Um fator importante para o comportamento de uma emulsão é a concentração da fase dispersa. A estabilidade das emulsões produzidas a partir dos concentrados proteicos de sorgo foi primeiro avaliada em relação às diferentes proporções de fase oleosa:aquosa (30:70, 50:50 e 70:30), em seguida a condição de razão fase oleosa:aquosa da emulsão mais estável foi escolhida para a avaliação separação de fases em diferentes concentrações de proteína (0,5 %, 1% e 2 %) para os três concentrados proteicos (CPS 8, CPS 10 e CPS 12).

A estabilidade das emulsões foi avaliada a partir do índice de cremeação (IC %) e pode ser verificada na Figura 8, para as diferentes concentrações da fase oleosa (ϕ). Nas emulsões contendo 30 % de óleo, observou-se um aumento rápido do índice de cremeação principalmente na primeira hora, em seguida o índice continuou aumentando até todo período de armazenamento (7 dias), porém, a uma taxa bem menor (Figura 10). Para as emulsões contendo 50 % de óleo se observou o mesmo comportamento, porém os valores de IC % foram menores. Esse comportamento observado nas emulsões contendo 30 e 50 % de óleo pode ser explicado pois as gotas de óleo tendem a mover-se para cima, por conta do diferencial de densidade, até formar uma estrutura mais compacta na fase creme (LIU e TANG, 2013; MCCLEMENTS, 2005).

Para as emulsões produzidas com 70 % de óleo não foi observada separação de fases durante o período avaliado (7 dias). Nessa concentração de óleo houve um maior empacotamento das gotas (Figura 8) e possível estruturação, que impediu a movimentação da emulsão (sem escoamento quando os frascos foram invertidos). Em geral, emulsões com alta concentração de fase interna são denominadas de *HIPes*. Esse tipo de emulsão apresenta aparência semi-sólida e possui a habilidade de resistir a cremeação e sedimentação, devido a sua estrutura impedir a movimentação das gotas (GAO *et al.*, 2021).

Comparando diferentes concentrações de proteína nas emulsões (Figura 9), observa-se que, a variação de 0,5 para 2% de proteína não influenciou a estabilidade das emulsões com 70 % de fase oleosa, não sendo observada separação de fases no período avaliado (7 dias), evidenciando uma boa estabilidade dessas emulsões frente à cremeação.

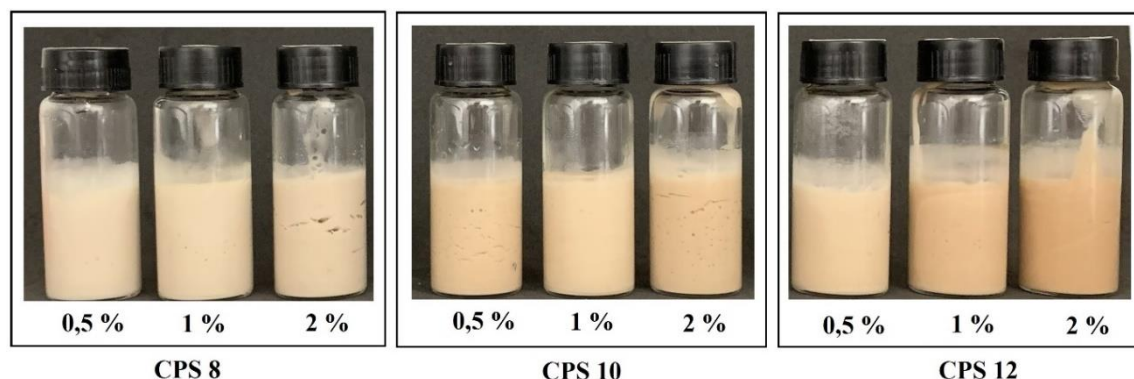
Figura 8- Índice de cremeação de emulsões (1 % de proteína) produzidas com o concentrado proteico obtido em pH 12 em diferentes períodos de armazenamento em função da concentração de óleo (ϕ).



Na Figura 9 pode-se verificar o aspecto visual das emulsões após o período de armazenamento (7 dias) em temperatura ambiente. As emulsões foram opacas e apresentaram coloração variando entre marfim e marrom-claro, a depender do concentrado proteico utilizado (CPS 8, CPS 10 ou CPS 12), bem como da concentração de proteína da fase aquosa. A cor mais próxima ao marrom-claro ocorreu para as emulsões produzidas com o CPS 12 e para maior concentração de proteína (2 %). Essa coloração pode estar associada à presença de taninos nos concentrados. Sabe-se que estes compostos se ligam através de ligações forte de hidrogênio às prolaminas do sorgo, em regiões ricas em prolina (EMMAMBUX e TAYLOR, 2003). Assim, uma vez que o CPS 12 apresentou maior rendimento, este deve conter maior quantidade de prolaminas que nas demais condições e, portanto, maior quantidade de taninos seriam encontrados no concentrado obtido nesta condição.

Poucos trabalhos utilizaram proteínas do sorgo para estabilizar emulsões. Entretanto, Xiao *et al.* (2016) quando produziram emulsões apenas com prolaminas do sorgo, isoladas com *tert*-butanol, também verificaram que para emulsões com 2 % de proteína e 70 % de fase oleosa não ocorreu separação de fases (7 dias). E ainda que para menores concentrações de óleo houve cremeação, porém a fase emulsionada mostrou resistência a coalescência, indicando boa estabilidade das gotas. Em seu trabalho, a estabilização das emulsões foi atribuída ao mecanismo de estabilização *Pickering*, devido a insolubilidade das prolaminas.

Figura 9- Avaliação da estabilidade de emulsões óleo-em-água 70/30 produzidas com diferentes concentrados proteicos de sorgo. Emulsões após 7 dias de armazenamento em temperatura ambiente.



Partículas insolúveis podem promover grande estabilidade para interfaces apresentando alta resistência a coalescência e ao amadurecimento de Ostwald (SHI *et al.*, 2020; DICKINSON, 2010). Sendo assim, a alta estabilidade das emulsões pode estar relacionada às frações insolúveis (Seção 4.2.1), relacionadas principalmente à presença de prolaminas nos concentrados. Entretanto acredita-se que outras frações proteicas como albuminas, globulinas e glutelinas do sorgo também foram solubilizadas durante a extração alcalina (PONTIERI *et al.*, 2019). Sendo assim, a presença de frações proteicas distintas pode ter contribuído para a estabilização da emulsão a partir de um mecanismo combinado e isso permitiu alcançar a estabilidade com uma concentração menor de proteínas.

Frações proteicas com diferentes características, como massa molecular, solubilidade e hidrofobicidade, podem ter resultado em um mecanismo de estabilização de interface combinado (YANG e SAGIS, 2021). Proteínas menores podem se deslocar para a interface mais facilmente, se difundindo mais rapidamente, promovendo uma “barreira física” ao redor das gotas de óleo, como albuminas e prolaminas. Já proteínas maiores também poderiam integrar a interface, (*ex*: globulinas ou glutelinas) interagindo de forma mais fraca na interface (NTONE *et al.*, 2021).

Esse mecanismo foi descrito em outros trabalhos (NTONE *et al.*, 2021; KORNET *et al.*, 2022). Ntone e colaboradores (2021), observaram que as albuminas e globulinas de canola produziram efeitos sinérgicos na produção de emulsões. Enquanto as albuminas deslocaram para a interface óleo/água, as globulinas formaram uma segunda camada. Os autores apontam que as albuminas foram suficientes para a formação de uma camada estável à coalescência. Entretanto, a segunda camada formada de globulinas pareceu aumentar a estabilidade à floculação.

4.3.3. Tamanho de gotas e microscopia óptica

O tamanho de partícula é uma característica importante e pode interferir na textura, estabilidade, atributos sensoriais e de qualidade das emulsões (MCCLEMENTS, 2005). O tamanho das gotas também é relacionado com a estabilidade de uma emulsão. Em geral, tamanhos menores indicam maior estabilidade. Para a avaliação das diferentes concentrações de proteína (0,5, 1 e 2 %), fixou-se a concentração de óleo em 70 %, pois estas apresentaram melhor estabilidade quando comparadas às outras emulsões.

As emulsões produzidas a partir dos concentrados CPS 8, CPS 10 e CPS 12 apresentaram distribuição de gotas bimodal (Figura 7) para 1 % e 2 % de proteína. Já para a concentração de 0,5 % observou-se 3 picos para todos os concentrados. A partir da Tabela 3 também pode-se verificar que o diâmetro médio volumétrico das gotas das emulsões ($D [4,3]$) diminuiu conforme se aumentou a concentração de proteínas. Essa constatação também pode ser verificada através das microscopias óticas (Figura 8). Outros trabalhos também fizeram essa mesma observação para emulsões estabilizadas por outras proteínas vegetais, como de soja, batata, canola e mesmo de sorgo (LIU e TANG, 2013; GUO e MU, 2011; XIAO *et al.*, 2016; TANG e GHOSH, 2021). A diminuição do tamanho das gotas a partir do aumento da concentração de proteínas ocorre pois com uma maior quantidade de proteínas se estabiliza uma maior área superficial (LIU e TANG, 2013).

Tabela 3- Diâmetro médio volumétrico $D[4,3]$ e Span para as emulsões produzidas com diferentes concentrações de proteína (CPS 8, CPS 10 e CPS 12).

Conc. Proteína	pH 8		pH 10		pH 12	
	$D [4,3] \mu\text{m}$	Span	$D [4,3] \mu\text{m}$	Span	$D [4,3] \mu\text{m}$	Span
0,5 %	$42,43 \pm 0,14$	1,310	$46,62 \pm 0,11$	1,223	$43,79 \pm 0,36$	1,235
1 %	$21,95 \pm 0,07$	1,432	$30,77 \pm 0,48$	1,030	$30,53 \pm 0,04$	1,254
2 %	$11,22 \pm 0,01$	1,581	$19,95 \pm 0,01$	1,525	$24,31 \pm 0,06$	1,212

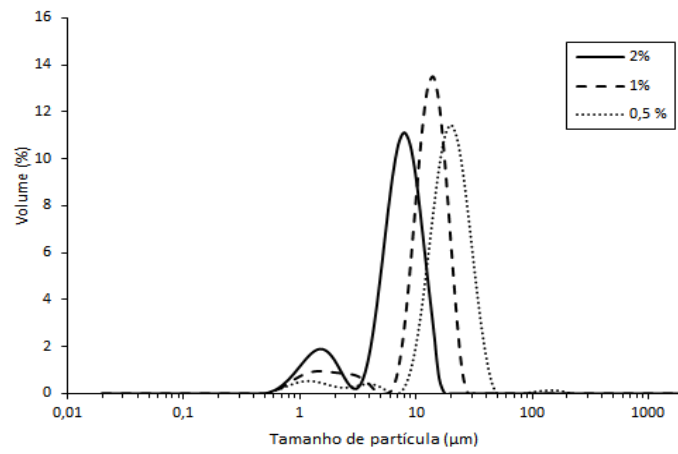
Enquanto o diâmetro médio volumétrico das partículas $D [4,3]$ variou entre ~11 e 46 μm , diminuindo com o aumento da concentração de proteína, a polidispersidade (Span) tendeu a apresentar menores valores para as emulsões produzidas com o concentrado proteico obtido em pH mais alcalino (Tabela 3). De modo geral, a moda diminuiu com o aumento da concentração de proteínas, o que também levou ao aumento do pico observado entre 1 e 10 μm (Figura 7). Esse pico pode ser relativo a compostos não-proteicos, como carboidratos e lipídios.

Também, nota-se que o tamanho das gotas das emulsões produzidas com o concentrado obtido em pH 8 tende a ser menor que às demais condições (Figura 8), isso pode indicar que outros componentes ajudaram a estabilizar a emulsão. Esses compostos podem estar mais presentes nas emulsões formadas principalmente com o CPS 8 que apresentou menor pureza em relação ao teor de proteínas.

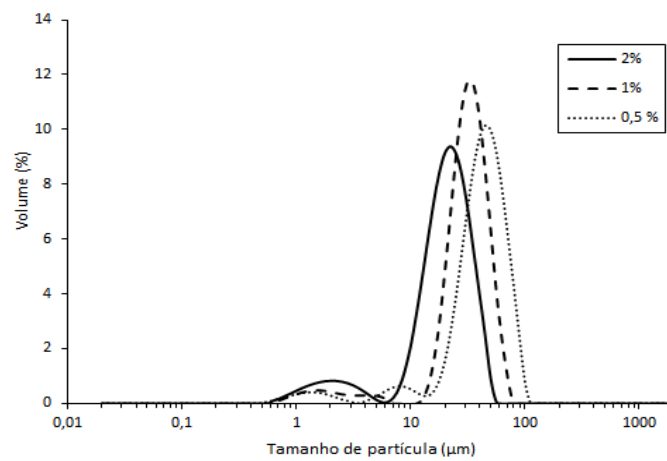
Liu *et al.* (2018) observaram um comportamento bimodal para a distribuição de tamanho de partículas de emulsões HIPE (75 % de óleo) estabilizadas por proteínas do trigo (gliadina e glutenina). Os autores também reportam que a diminuição do tamanho de gotas foi possível com o aumento da concentração de proteína. Os valores de D [4,3] variaram entre 2,54 μm para 3 % de proteína e 4,85 μm para 1 % de proteína. As gliadinas, são prolaminas e, quando insolúveis, podem estabilizar interfaces por Pickering, já as gluteninas, apesar de apresentarem baixa atividade interfacial, quando combinadas com as gliadinas apresentaram efeito sinérgico, formando uma melhor proteção ao redor da gota de óleo (LIU *et al.*, 2018).

O tamanho de partículas (entre ~11 e 46 μm) também pode corroborar com o fato de que a estabilização das emulsões não ocorreu apenas por partículas sólidas, já que foi menor do que o tamanho médio reportado para emulsões Pickering estabilizadas com kafirinas (entre 30 e 130 μm) (XIAO *et al.*, 2016). Entretanto, destaca-se que apesar dos trabalhos citados utilizarem homogeneizador do tipo rotor estator para o preparo das emulsões, o tempo de preparo, óleo utilizado, condições do ambiente e recipientes podem ter influenciado no tamanho de partícula das emulsões.

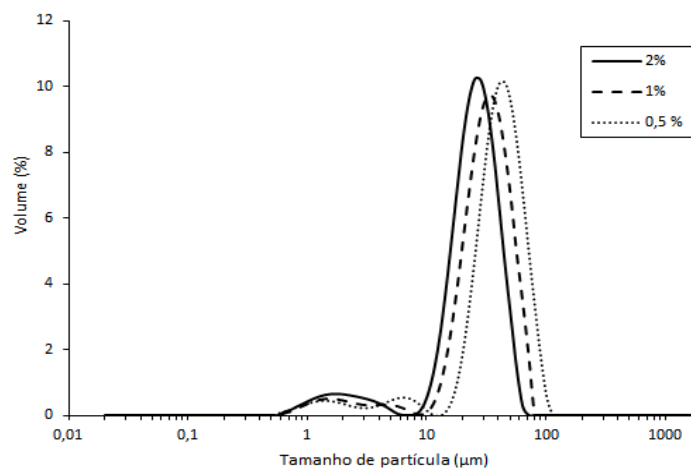
Figura 7- Distribuição do tamanho de partícula de emulsões produzidas com diferentes concentrações de proteína (2 %, 1 % e 0,5 %). (a) CPS 8, (b) CPS 10 e (c) CPS 12.



(a)

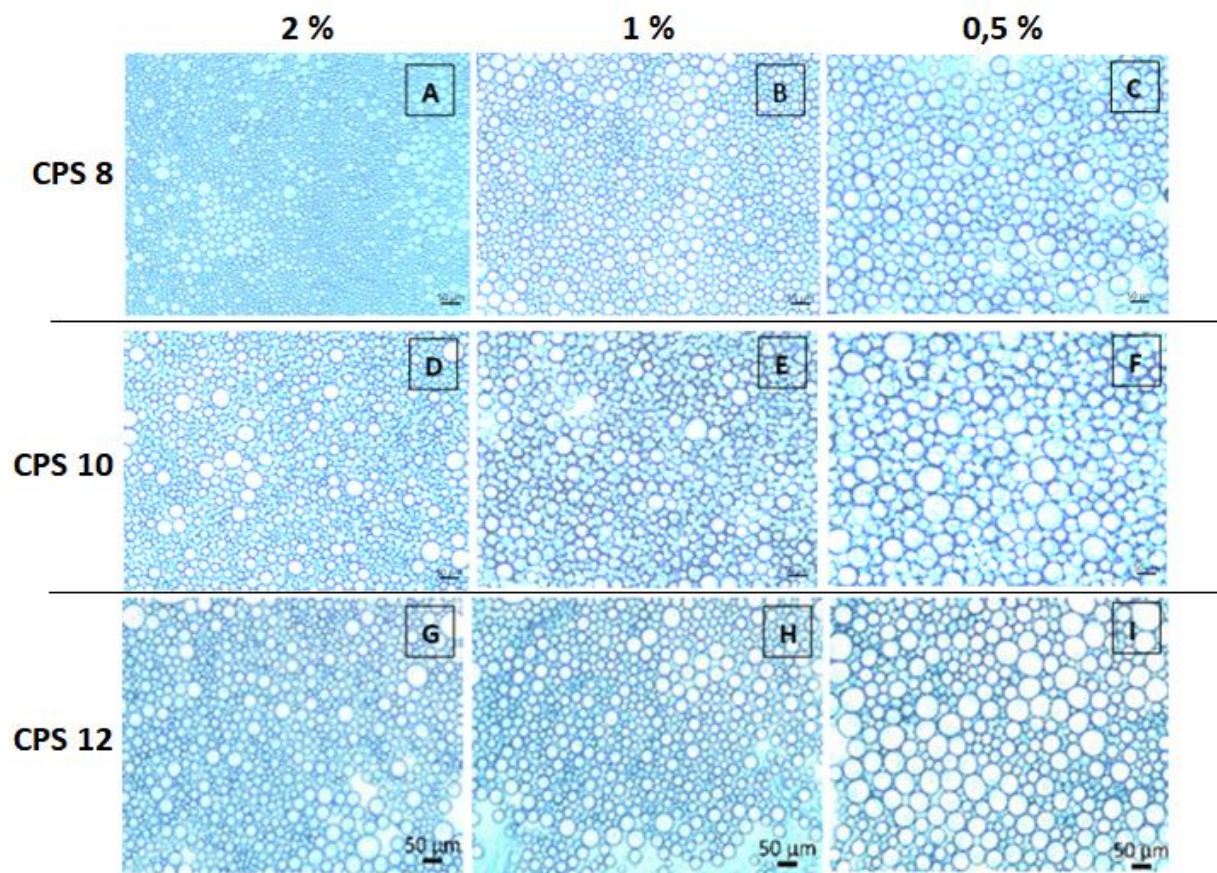


(b)



(c)

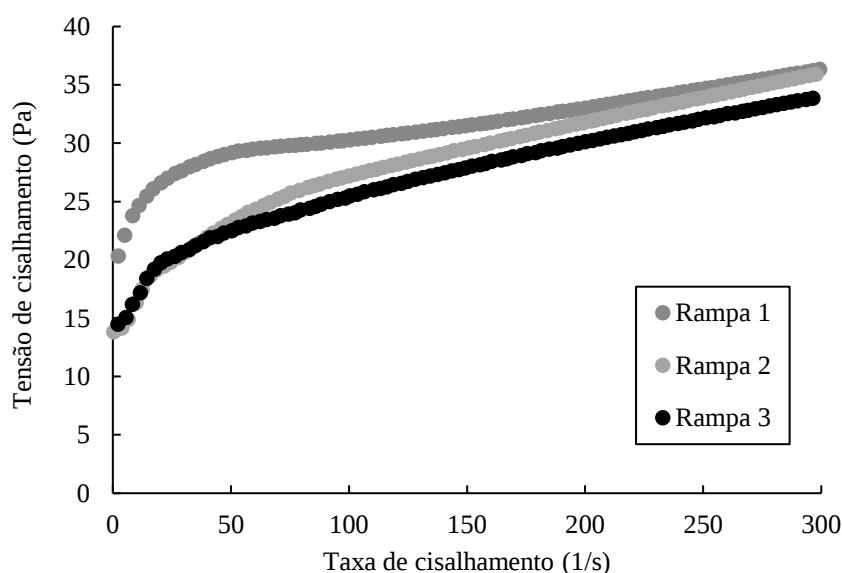
Figura 8- Microscopias óticas de emulsões produzidas utilizando diferentes concentrações de proteína e concentrados proteicos de sorgo. As barras de escala equivalem à 50 μm .



4.3.4. Comportamento reológico

Na Figura 9 é possível verificar o comportamento reológico da emulsão com 70 % (m/m) de fase oleosa e 1% de proteína, produzida com o concentrado proteico CPS 12. Observou-se que há tixotropia no fluido, pois houve uma variação da tensão de cisalhamento com o tempo para uma mesma taxa de deformação. Então, a terceira curva foi utilizada para ajuste do modelo (Tabela 4). Assim, o fluido pode ser classificado como Herschel-Bulkley. Esse tipo de fluido apresenta decréscimo da viscosidade com a taxa de cisalhamento, como os do tipo lei da potência, entretanto com tensão residual. Esse comportamento pode ser verificado também pelo índice de comportamento (n) (Tabela 3), que foi de 0,437 e de consistência (k) 1,785 Pa.sⁿ.

Figura 9 - Curvas de escoamento para a emulsão produzida com concentrado proteico de sorgo CPS 12 (1 % de proteína).



O comportamento pseudoplástico é bastante característico de emulsões, uma vez que, com o cisalhamento, as gotas de óleo tendem a se alinhar e “achatar”, favorecendo o escoamento (STEFFE, 1999). Já a tensão residual representa uma tensão finita para que o fluido comece a escoar; abaixo desse valor o fluido apresenta comportamento de sólido, armazenando energia para pequenas tensões (STEFFE, 1999). Esse comportamento de resistência a uma tensão inicial também é característico de emulsões HIPEs estabilizadas por proteínas vegetais (WANG *et al.*, 2020; GAO *et al.*, 2021; XIAO *et al.*, 2016). Acredita-se que a presença da tensão residual na emulsão deste trabalho seja relacionada à rede formada pela proteína e carboidratos presentes

na emulsão produzida com o concentrado proteico, que contribuíram para a estabilização das gotas ao longo do tempo de armazenamento.

Tabela 3- Parâmetros reológicos ajustados para o modelo Herschel-Bulkley para emulsões 70/30 (O/A) estabilizadas com o concentrado proteico de sorgo obtido em pH 12.

Tensão inicial (σ_0)	12,03 Pa
Índice de consistência (k)	1,785 Pa.s ⁿ
Parâmetro de comportamento (n)	0,437
R^2	0,995

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho as proteínas do sorgo foram obtidas com um maior rendimento de extração na condição de pH 12 e 40 °C (58,90 % das proteínas do grão). Os concentrados proteicos obtidos em pH 8, 10 e 12 (CPS 8, CPS 10 e CPS 12) à 40 °C apresentaram composição centesimal semelhantes. A solubilidade do CPS 12 apresentou diferença em relação aos demais concentrados, possivelmente por conta de possíveis modificações na estrutura terciária das proteínas induzidas pelo processo de extração. O concentrado proteico de sorgo obtido no pH 12 apresentou capacidade emulsificante de 400 g óleo/g de proteína. As emulsões produzidas com o CPS 8, 10 e 12 (70 % de fase oleosa) não apresentaram separação de fases durante o período de armazenamento avaliado, devido a estrutura formada que impediu a movimentação das gotas. Acredita-se que estabilidade das emulsões frente à cremeação se deve principalmente à presença de prolaminas no concentrado, além das diferentes frações proteicas que podem estabilizar interface por mecanismos combinados, entretanto esse mecanismo deve ser ainda melhor avaliado. Por fim, a emulsão produzida com o CPS 12 apresentou comportamento Herschel-Bulkley; a presença de tensão residual verificada na emulsão pode estar relacionada à rede formada pela proteína e carboidratos presentes na emulsão e à alta concentração de fase oleosa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHARUME, F. *et al.* Modification of plant proteins for improved functionality: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 1, p. 198–224, 2021.
- ALZUWAID, N. T. *et al.* Nutritional and functional properties of durum wheat bran protein concentrate. **Cereal Chemistry**, v. 97, n. 2, p. 304–315, 2020.
- ARKAR, A.; DICKINSON, E. Sustainable food-grade Pickering emulsions stabilized by plant-based particles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 49, p. 69–81, 2020.
- BALANDRA´N-QUINTANA, R. N. *et al.* Plant Based Proteins. *In*: GALANAKIS, C. **Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications**. 1. ed. USA: Academic Press, 2019. cap. 4, p. 97-130.
- BANU, I.; APRODU, I. Assessing the Performance of Different Grains in Gluten-Free Bread Applications. **Applied Sciences**, v. 10, n. 24, p. 8772, 2020.
- BEAN, S. R. *et al.* Interaction Between Sorghum Protein Extraction and Precipitation Conditions on Yield, Purity, and Composition of Purified Protein Fractions. **Cereal Chemistry Journal**, v. 83, n. 1, p. 99–107, 2006.
- BELTON, P. S. *et al.* Kafirin structure and functionality. **Journal of Cereal Science**, v. 44, n. 3, p. 272–286, 2006.
- BERNARDI, S. *et al.* Obtaining concentrated rice bran protein by alkaline extraction and stirring - Optimization of conditions. **International Food Research Journal**, v. 25, n. 3, p. 1133–1139, 2018.
- BUTLER, L. G. *et al.* Interaction of proteins with sorghum tannin: mechanism, specificity and significance. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 61, s. n., p. 916–920, 1984.
- CABRA, V. *et al.* Effect of alkaline deamidation on the structure, surface hydrophobicity, and emulsifying properties of the α -zein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55(2), 439–445, 2007.
- CAN KARACA, A.; LOW, N.; NICKERSON, M. Encapsulation of flaxseed oil using a benchtop spray dryer for legume protein-maltodextrin microcapsule preparation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 21, p. 5148–5155, 2013.
- CAN KARACA, A.; NICKERSON, M. T.; LOW, N. H. Lentil and Chickpea Protein-Stabilized Emulsions: Optimization of Emulsion Formulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 24, p. 13203–13211, 2011b.
- CHANG, L. *et al.* Plant proteins from green pea and chickpea: Extraction, fractionation, structural characterization and functional properties. **Food Hydrocolloids**, v. 123, n. S., p. 107-165, 2022.

CONTRERAS, M. *et al.* Protein extraction from agri-food residues for integration in biorefinery: Potential techniques and current status. **Bioresource Technology**, v. 280, s.n, p. 459–477, 2019.

CUI, Q. *et al.* Optimization of Protein Extraction and Decoloration Conditions for Tea Residues. **Horticultural Plant Journal**, v. 3, n. 4, p. 172–176, 2017.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, Q. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

DAY, L. Proteins from land plants – Potential resources for human nutrition and food security. **Trends in Food Science & Technology**, v. 32, n. 1, p. 25–42, 2013.

DE MESA-STONESTREET, N.; ALAVI, S.; BEAN, S. Sorghum Proteins: The Concentration, Isolation, Modification, and Food Applications of Kafirins. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 5, s.p, 2010.

DELEU, L. J. *et al.* The impact of alkaline conditions on storage proteins of cereals and pseudo-cereals. **Current Opinion in Food Science**, v. 25, p. 98–103, 2019.

DEROSE, R. T. *et al.* Characterization of the kafirin gene family from sorghum reveals extensive homology with zein from maize. **Plant Mol. Biol.** 1989, v. 12, s. n., p. 245–256, 1989.

DICKINSON, E.; GOLDING, M. Rheology of sodium caseinate stabilized oil-in-water emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 191, n. 1, p. 166–176, 1997.

DUODU, K. G. *et al.* Factors affecting sorghum protein digestibility. **Journal of Cereal Science**, v. 38, s. n., p. 117–131, 2003.

EL-BELTAGI, H. S.; ABD EL-SALAM, S. M.; OMRAN, A. A. Effect of Soaking, Cooking, Germination and Fermentation Processing on Proximate Analysis and Mineral Content of Three White Sorghum Varieties (*Sorghum bicolor* L. Moench). **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 40, n. 2, p. 92, 2012.

EMMAMBUX, N.; TAYLOR, J. Sorghum kafirin interaction with various phenolic compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 5, p. 402–407, 2003.

ESPINOSA-RAMÍREZ, J.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Functionality and characterization of kafirin-rich protein extracts from different whole and decorticated sorghum genotypes. **Journal of Cereal Science**, v. 70, 57–65, 2006.

FENG, T. *et al.* Plant protein-based antioxidant Pickering emulsions and high internal phase Pickering emulsions against broad pH range and high ionic strength: Effects of interfacial rheology and microstructure. **LWT**, v. 150, n. A., p. 111–953, 2021.

GALVES, C. *et al.* Effect of pH and defatting on the functional attributes of safflower, sunflower, canola, and hemp protein concentrates. **Cereal Chemistry**, v. 96, n. 6, p.1036–1047, 2019.

GAO, H. *et al.* Review of recent advances in the preparation, properties, and applications of high internal phase emulsions. **Trends in Food Science and Technology**, v. 112, p. 36-49, 2021.

GAO, Z. *et al.* Effect of alkaline extraction pH on structure properties, solubility, and beany flavor of yellow pea protein isolate. **Food Research International**, v. 131, n. J., p. 109-145, 2020.

GEERS, M. E. J. *et al.* Protein nativity explains emulsifying properties of aqueous extracted protein components from yellow pea. **Food Structure**, v. 14, s. n., p. 104–111, 2017.

GERZHOVA, A., *et al.* Study of the functional properties of canola protein concentrates and isolates extracted by electro-activated solutions as non-invasive extraction method. **Food Bioscience**, 12, 128–138, 2015.

GHRIBI, A. M. *et al.* Effect of drying methods on physico-chemical and functional properties of chickpea protein concentrates. **Journal of Food Engineering**, v. 165, p. 179–188, 2015.

GILLGREN, T.; STADING, M. Mechanical and barrier properties of avenin, kafirin, and zein films. **Food Biophysics**, v. 3, n. 3, p. 287–294, 2008.

GORINSTEIN, S. *et al.* Evaluation of some cereals, plants and tubers through protein composition. **Journal of Protein Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 687–693, 1999.

GUO, Q.; MU, T.H. Emulsifying properties of sweet potato protein: Effect of protein concentration and oil volume fraction. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 1, p. 98–106, 2011.

HAMADA, J. S. Characterization of Protein Fractions of Rice Bran to Devise Effective Methods of Protein Solubilization. **Cereal Chemistry Journal**, v. 74, n. 5, p. 662–668, 1997.

HAMAKER, B.; MOHAMED, A.; HABBEN, J. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. **Cereal Chemistry**, v. 72, s.n, p. 583–588, 1995.

HOU, F. *et al.* Alkali solution extraction of rice residue protein isolates: Influence of alkali concentration on protein functional, structural properties and lysinoalanine formation. **Food Chemistry**, v. 218, p. 207–215, 2017.

HOUDE, M. *et al.* Barley protein concentrates: Extraction, structural and functional properties. **Food Chemistry**, v. 254, n. J, p. 367–376, 2018.

HU, Y. *et al.* Fabrication and characterization of novel Pickering emulsions and Pickering high internal emulsions stabilized by gliadin colloidal particles. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 300–310, 2016.

IOERGER, B. *et al.* An improved method for extraction of sorghum polymeric protein complexes. **Journal of Cereal Science**, v. 91, p. 102-876, 2020.

KARACA A.; LOW, N.; NICKERSON, M. Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2742-2750, 2011.

KIM, W.; WANG, Y.; SELOMULYA, C. Dairy and plant proteins as natural food emulsifiers. **Trends in Food Science and Technology**, v. 105, s. n., p. 261–272, 2020.

KLOPFENSTEIN, C. F.; HOSENEY, R. C. Nutritional properties of sorghum and the millets. In: DENDY, D.A.V. **Sorghum and Millets: Chemistry and Technology**, American Association of Cereal Chemists, p. 125–168, 1995.

KORNET, R. *et al.* Optimizing pea protein fractionation to yield protein fractions with a high foaming and emulsifying capacity. **Food Hydrocolloids**, v. 126, n. J., p. 107-456, 2022.

KRISTINSSON, H. G; HULTIN, H. O. Effect of low and high pH treatment on the functional properties of cod muscle proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 17, p. 5103–5110, 2003.

KUMAR, M. *et al.* Advances in the plant protein extraction: Mechanism and recommendations. **Food Hydrocolloids**, v. 115, s.n., p. 106-595, 2021.

LAM, R. S. H.; NICKERSON, M. T. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 975–984, 2013.

LATIF, S.; MULLER, J. Potential of cassava leaves in human nutrition: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 44, n. 2, p. 147-158, 2015.

LIU, F.; TANG, C-H. Soy Protein Nanoparticle Aggregates as Pickering Stabilizers for Oil-in-Water Emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 37, p. 8888–8898, 2013.

LIU, L *et al.* Characterization of sorghum grain and evaluation of sorghum flour in a Chinese egg noodle system. **Journal Cereal Science**, v. 55, s.n., p. 31–36, 2012.

LIU, Xiao *et al.* Wheat gluten-stabilized high internal phase emulsions as mayonnaise replacers. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 168–175, 2018.

LONG, W. F.; E LABUTE, P. Calibrative approaches to protein solubility modeling of a mutant series using physicochemical descriptors. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 24, s.n., p. 907–916, 2010.

LOVEDAY, S. M. Food Proteins: Technological, Nutritional, and Sustainability Attributes of Traditional and Emerging Proteins. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 10, n. 1, p. 311–339, 2019.

LOVEDAY, S. M. Plant protein ingredients with food functionality potential. **Nutrition Bulletin**, v. 45, n. 3, p. 321–327, 2020.

MAESTRI, D. *et al.* Proximate Composition and Seed Lipid Components of Sorghum Cultivars from Argentina. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 70, n. 3, p. 334–336, 1996.

- MAJZOABI, M. *et al.* Functional properties of acetylated glutenin and gliadin at varying pH values. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1402–1407, 2012.
- MALEKZAD, H. *et al.* Plant protein-based hydrophobic fine and ultrafine carrier particles in drug delivery systems. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 47–67, 2018.
- MARIOTTI, F. Plant protein, animal protein, and protein quality. In: MARIOTTI, F., ed. **Vegetarian and plant-based diets in health and disease prevention**. San Diego: Elsevier, 2017. p. 621–42.
- MCCLEMENTS, D. J. Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 7, p. 611–649, 2007.
- MCCLEMENTS, D.J. **Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques**. Boca Raton: CRC Press, 2005.
- MESA-STONESTREET, N. J.; ALAVI, D.; BEAN, S. R. Sorghum Proteins: The Concentration, Isolation, Modification, and Food Applications of Kafirins. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 5, p. 90-104, 2010.
- MORAD, M. M.; DOHERTY, C. A.; ROONEY, L. W. Effect of sorghum variety on baking properties of US Conventional Bread, Egyptian Pita “Balady” Bread and Cookies. **J Food Sci.** v. 49, p. 1070–1074, 1984.
- MULTARI, S.; STEWART, D. RUSSELL, W. R. Potential of fava bean as future protein supply to partially replace meat intake in the human diet. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 5, p. 511–522, 2015.
- NIKBAKHT NASRABADI, M. *et al.* Plant based Pickering stabilization of emulsions using soluble flaxseed protein and mucilage nano-assemblies. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 563, n.N, p. 170–182, 2019.
- NISHINARI, K. *et al.* Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 301–318, 2014.
- NISSEN, S. H *et al.* Increased solubility and functional properties of precipitated Alfalfa protein concentrate subjected to pH shift processes. **Food Hydrocolloids**, v. 119, 2021.
- NTONE, E. *et al.* Adsorption of rapeseed proteins at oil/water interfaces. Janus-like napins dominate the interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 583, p. 459–469, 2021.
- OSBORNE, T. B. **The vegetable proteins**. Second Edition. Longmans, Green and Co. London Plant Physiology, v. 154, s. n., p. 1842- 1854, 1924.
- OZANAN, F. M. *et al.* **Sistema agroindustrial do sorgo sacarino no Brasil e a participação público-privada: oportunidades, perspectivas e desafios**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2012, 76 p.

PARK, S.; BEAN, S. Investigation and Optimization of the Factors Influencing Sorghum Protein Extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, p. 7050–7054, 2003.

PAULIS, J. W.; WALL, J. S. Distribution and electrophoretic properties of alcohol-soluble proteins in normal and high-lysine sorghums. **Cereal Chemistry**, v. 56, s. n., p. 20-23, 1979.

PENG, W. *et al.* Effects of heat treatment on the emulsifying properties of pea proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 52, s. n., p. 301–310, 2016.

PEROVIĆ, M. N.; KNEŽEVIĆ JUGOVIĆ, Z. D.; ANTOV, M. G. Improved recovery of protein from soy grit by enzyme-assisted alkaline extraction. **Journal of Food Engineering**, v. 276, n. December 2019, p. 109-894, 2020.

PEZZALI, J. G. *et al.* Characterization of white and red sorghum flour and their potential use for production of extrudate crisps. **PLoS ONE**, v. 15, n. 6, p. 1–13, 2020.

POJIĆ, M.; MIŠAN, A.; TIWARI, B. Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. **Trends in Food Science and Technology**, v. 75, s.n, p. 93–104, 2018.

PONTIERI, P. *et al.* Comparison of extraction methods for isolating *kafirin* protein from food grade sorghum flour. **Australian Journal of Crop Science**, v. 13, n. 8, p. 1297–1304, 2019.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996, v.2.

QIU, S. *et al.* Physicochemical characterization and rheological behavior of hemicelluloses isolated from sorghum bran, sorghum bagasse and sorghum biomass. **Food Hydrocolloids**, v. 100, s. n., 2020.

REN, Z. *et al.* Functional properties and structural profiles of water-insoluble proteins from three types of tea residues. **LWT**, v. 110, p. 324–331, 2019.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. 2. ed. rev. São Paulo: Blucher, 2007. 184 p. v. 1. ISBN 978-85-212-0366-7.

SAGIS, L. M. C.; YANG, J. Protein-stabilized interfaces in multiphase food: comparing structure-function relations of plant-based and animal-based proteins. **Current Opinion in Food Science**, v. 43, p. 53–60, 2022.

SARI, Y. W. *et al.* Towards plant protein refinery: Review on protein extraction using alkali and potential enzymatic assistance. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 8, p. 1138–1157, 2015.

SARKAR, A.; DICKINSON, E. Sustainable food-grade Pickering emulsions stabilized by plant-based particles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 49, p. 69–81, out. 2020.

SCHOBER T. J. *et al.* Gluten-free bread from sorghum: quality differences among hybrids. **Cereal Chemistry**, v. 82, p. 394–404, 2005.

SERNA-SALDIVAR, S. O.; ESPINOSA-RAMÍREZ, J. Grain Structure and Grain Chemical Composition. **Sorghum and Millets**: Elsevier, 2019. p. 85–129.

SGARBIERI, Valdomiro C. **Proteínas em Alimentos Proteicos**. 1. ed. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 520 p. ISBN 8585519185.

SHAH, U. *et al.* Physicochemical characterization of kafirins extracted from sorghum grain and dried distillers' grain with solubles related to their biomaterial functionality. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 15204, 2021.

SHERMAN, P. A Critique of some methods proposed for evaluating the emulsifying capacity and emulsion stabilizing performance of vegetable proteins. **Italian Journal of Food Science**, v. 7, s.n., p. 3–10, 1995.

SHEVKANI, K. *et al.* Structural and functional characterization of kidney bean and field pea protein isolates: a comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 43, s. n., p. 679–689, 2015.

SHI, A. *et al.* Pickering and high internal phase Pickering emulsions stabilized by protein-based particles: A review of synthesis, application and prospective. **Food Hydrocolloids**, v. 109, n. F., p. 106-117, 2020.

SHULL, J. M.; WATTERSON, J. J.; KIRLEIS, A. W. Proposed Nomenclature for the Alcohol-Soluble Proteins (Kafirins) of Sorghum bicolor (L. Moench) Based on Molecular Weight, Solubility, and Structure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 1, p. 83–87, 1991.

SIM, S. Y. J. *et al.* Plant Proteins for Future Foods: A Roadmap. **Foods**, v. 10, n. 8, p. 1967, 2021.

SRIDHARAN, S. *et al.* Pea flour as stabilizer of oil-in-water emulsions: Protein purification unnecessary. **Food Hydrocolloids**, v. 101, p. 105-533, 2020.

STAMENKOVIC, O. S. *et al.* Production of biofuels from sorghum. **Renewable and Sustainability Energy Reviews**, v. 124, s. n., 2020.

STEFFE, J. **Rheological Methods in Food Process Engineering**. 2 ed. East Lansing: Freeman Press, 1996. 428 p.

STONE, A. K. *et al.* Plant protein ingredients. **Encyclopedia of Food Chemistry**, v. 1, s. n., p. 229-234, 2019.

TAN, M.; NAWAZ, M. A.; BUCKOW, R. Functional and food application of plant proteins – a review. **Food Reviews International**, v. 0, n. 0, p. 1–29, 2021.

TANG, Y. R.; GHOSH, S. Stability and rheology of canola protein isolate-stabilized concentrated oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 113, p. 106-399, 2021.

TAYLOR, *et al.* Fractionation of proteins from low-tannin sorghum grains. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 32, s. n., p. 149-154, 1984.

TAYLOR, J. *et al.* Glacial acetic acid- A novel food-compatible solvent for kafirin extraction. **Cereal Chemistry**, v. 82, n. 5, p. 485–487, 2005.

TAYLOR, J.; TAYLOR, J. R. N. Making Kafirin, the Sorghum Prolamin, into a Viable Alternative Protein Source. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 95, n. 8, p. 969–990, 2018.

TESSARI, P.; LANTE, A.; MOSCA, G. Essential amino acids: Master regulators of nutrition and environmental footprint? **Scientific Reports**, v. 6, s. n., 2016.

TILMAN, D.; CLARK, M. Global diets link environmental sustainability and human health. *Nature*, v. 515, s. n., p. 518-522, 2014.

TOEWS, R.; WANG, N. Physicochemical and functional properties of protein concentrates from pulses. **Food Research International**, v. 52, n. 2, p. 445–451, 2013.

VAN DER GOOT, A. *et al.* Concepts for further sustainable production of foods. **Journal of Food Engineering**, v. 168, p. 42–51, 2016.

VISHWANATHAN, K. H.; SINGH, V.; SUBRAMANIAN, R. Influence of particle size on protein extractability from soybean and okara. **Journal of Food Engineering**, v. 102, n. 3, p. 240–246, 2011.

WANG, Y. *et al.* Improving stability of gliadin-based Pickering emulsions by deamidation. **Journal of Food Engineering**, v. 271, n. A, p. 109-773, 2020.

WU, J. *et al.* Characterization and analysis of an oil-in-water emulsion stabilized by rapeseed protein isolate under pH and ionic stress. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 13, p. 4734–4744, 2020.

WU, Y. V. Protein concentrate from normal and high-lysine sorghums: preparation, composition, and properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 2, p. 305–309, 1978.

XIAO, J. *et al.* Kafirin nanoparticles-stabilized Pickering emulsions: Microstructure and rheological behavior. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 30–39, 2016.

XIAO, J.; LU, X.; HUANG, Q. Double emulsion derived from kafirin nanoparticles stabilized Pickering emulsion: Fabrication, microstructure, stability and in vitro digestion profile. **Food Hydrocolloids**, v. 62, p. 230–238, 2017.

XIAO, J.; NIAN, S.; HUANG, Q. Assembly of kafirin/carboxymethyl chitosan nanoparticles to enhance the cellular uptake of curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 166–175, 2015.

YANG, J. *et al.* Effects of high-pressure homogenization on faba bean protein aggregation in relation to solubility and interfacial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 83, s. n., p. 275–286, 2018.

YILDIZ, G. *et al.* Functionalizing soy protein nano-aggregates with pH-shifting and manothermo-sonication. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 505, p. 836–846, 2017.

ZHANG, T. *et al.* Emulsifying properties of chickpea protein isolates: Influence of pH and NaCl. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 1, p. 146–152, 2009.

ZHAO, H. *et al.* Comparison of wheat, soybean, rice, and pea protein properties for effective applications in food products. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 1–12, 2020.

ZHAO, J.; TIAN, Z.; CHEN, L. Effects of Deamidation on Structure and Functional Properties of Barley Hordein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 21, p. 11448–11455, 2010.

ZHENG, Wei-Mou. Proteins: From sequence to structure. **Chinese Physics B**, v. 23, n. 7, p. 078705, 2014.

ZOU, L. *et al.* Cereal proteins in nanotechnology: formulation of encapsulation and delivery systems. **Current Opinion in Food Science**, v. 25, s. n., p. 28-34, 2019.