



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS
ALIMENTOS

Iara Regina dos Santos

**EFEITO DA GERMINAÇÃO NO AMIDO, PROTEÍNA E
DIGESTIBILIDADE DO TRIGO**

Florianópolis
Setembro, 2018

Iara Regina dos Santos

**EFEITO DA GERMINAÇÃO NO AMIDO, PROTEÍNA E
DIGESTIBILIDADE DO TRIGO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientador (a): Prof^ª Dr^ª Alicia de Francisco

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Iara Regina dos
Efeito da germinação no amido, proteína e
digestibilidade do trigo / Iara Regina dos Santos
; orientadora, Alicia de Francisco, 2018.
113 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Glúten. 3. Cereal.
4. Digestão in vitro. 5. Enzimas hidrolíticas. I. de
Francisco, Alicia . II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência
dos Alimentos. III. Título.

Iara Regina dos Santos

**EFEITO DA GERMINAÇÃO NO AMIDO, PROTEÍNA E
DIGESTIBILIDADE DO TRIGO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciência dos Alimentos e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 28 de setembro de 2018.

Prof.^a Dr.^a Ana Carolina de Oliveira Costa
Coordenadora do Programa

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Alicia de Francisco
Orientadora (UFSC)

Prof.^a Dr.^a Elisa Helena Siegel Moecke
Membro (UFSC)

Prof.^o Dr.^o Pedro Luiz Manique Barreto
Membro (UFSC)

Prof.^a Dr.^a Itaciara Larroza Nunes
Membro (UFSC)

AGRADECIMENTOS

Obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e em meu crescimento pessoal e profissional durante essa trajetória.

À Prof^a. Dr^a Alicia de Francisco pela orientação, por me acolher e me inspirar ao longo desses anos. Sinto admiração pela pessoa que você é e me sinto privilegiada por ter aprendido tanto com seus ensinamentos diários.

À Bruna Mattioni, por sempre estar disposta a ajudar, por toda assistência e contribuição. Agradeço por sempre me guiar para encontrar as melhores respostas e por ensinar de uma maneira tão simples. Obrigada por todos esses anos, você foi essencial.

Ao seu Luiz Carlos Miranda e Rogério de Sá Borges da Embrapa, pelas amostras cedidas para a realização deste projeto.

A equipe do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), em especial a Susane, por todo auxílio e paciência na realização das imagens da fluorescência.

A equipe do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), principalmente a Emily pelas instruções e ajuda na utilização do criostato.

Ao Dr. Mike Tilley do USDA, por sanar todas minhas dúvidas sempre com muita agilidade.

Aos membros da banca examinadora, pela presença e por compartilharem seus conhecimentos.

A toda equipe Lab Ceres, pelo companheirismo, colaboração e apoio. Agradeço por estar inserida e um laboratório tão harmônico e alegre. Estela, Duda, Sandra, José, Claudio, Erick, Vitor, Luiza, Heloísa, Mariana, Maria e Val, obrigada por fazerem parte da minha trajetória, cada um deixou algo de si marcado em mim. Duda, obrigada por toda amizade ao longo do mestrado, você foi fundamental diante dos desafios e um suporte durante muitas dúvidas. Estela, obrigada por me acompanhar durante todos esses anos no laboratório. Sandra, obrigada por sempre se esforçar em fazer o melhor, você foi uma inspiração nessa trajetória.

Aos meus pais, por todo amor, amparo e motivação. Aos familiares e amigos, por todo o carinho.

À Capes pelo apoio financeiro para a concretização desta pesquisa.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pelas oportunidades ofertadas durante toda graduação e Pós-Graduação, aos professores vinculados, que contribuíram para meu aprendizado e crescimento.

RESUMO

Os cereais são alimentos importantes no fornecimento de energia e nutrientes na dieta humana. O trigo é um cereal que está entre as três culturas em maior número de área cultivada no mundo. A ampla escala de produção de trigo é devido a utilização deste cereal como matéria prima básica para diversos produtos e pelo seu alto valor nutricional. O nutriente em maior quantidade no grão de trigo é o amido e o segundo composto predominante, a proteína. Apesar da concentração de proteína não ser tão elevada, a alta frequência no consumo torna o trigo uma boa fonte deste nutriente. Outra atribuição importante da proteína do trigo se deve às características singulares do glúten. A presença das gliadinas e gluteninas, proteínas de reserva, junto a água e com a força mecânica formam uma rede forte viscoelástica com grande importância tecnológica. O processo de germinação tem sido utilizado para aumentar o valor nutricional dos grãos através das alterações bioquímicas e fisiológicas que ocorrem no crescimento e desenvolvimento da plântula. Apesar do uso de grãos germinados ser difundido desde a antiguidade, nos últimos anos o interesse no consumo de germinados cresceu mundialmente, isso devido aos efeitos benéficos a saúde. Os principais objetivos desse trabalho foram analisar as alterações no amido e proteína do grão de trigo (*Triticum aestivum* L.) em condições específicas de germinação, bem como avaliar a digestibilidade desses macronutrientes em diferentes períodos de germinação do grão. Durante a germinação houve redução no teor de amido total devido a hidrólise pelas amilases. Com a fluorescência foi possível observar que a degradação do amido ocorre inicialmente no endosperma em direção ao pericarpo. A digestibilidade amilácea foi superior a 99 %, porém, não foi afetada pela germinação ($p > 0,05$). Quanto a proteína total e glúten, houve uma redução com o processo germinativo, porém, as amostras com 6, 12 e 24 h de germinação apresentaram maior digestibilidade em relação aos grãos não germinados e demais tempos de germinação analisados ($p > 0,05$). Analisar as alterações proteicas e amiláceas dos grãos germinados permitiu uma maior compreensão dos potenciais benefícios da utilização destes grãos para o consumo humano.

Palavras-chave: Germinação. Glúten. Cereal. Digestão *in vitro*. Enzimas hidrolíticas.

ABSTRACT

Cereals are important foods in providing energy and nutrients in the human diet. Wheat is a cereal that is among the three crops in the greatest number of cultivated area in the world. The large scale of wheat production is due to the use of this cereal as a basic raw material for various products and for its high nutritional value. The major nutrient in wheat grain is starch and the second predominant compound, the protein. Although the protein concentration is not so high, the high frequency in the consumption makes the wheat a good source of this nutrient. Another important attribute of wheat protein is the unique characteristics of gluten. The presence of gliadins and glutenins, reserve proteins, together with water with the mechanical strength, form a strong viscoelastic network with great technological importance. The germination process has been used to increase the nutritional value of the grains through the biochemical and physiological changes that occur in the growth and development of the seedling. Although the use of germinated grains has been widespread since antiquity, in recent years the interest in the consumption of sprouts has grown worldwide, due to the beneficial effects on health. The main objectives of this work were to analyze the changes in wheat starch and protein (*Triticum aestivum* L.) under specific conditions of germination, as well as to evaluate the digestibility of these macronutrients in different periods of grain germination. During germination there was reduction in the total starch content due to the hydrolysis generated by the amylases. With the fluorescence it was possible to observe that the degradation of the starch occurs initially in the endosperm towards the pericarp. The amylaceous digestibility was higher than 99 %, but it was not affected by germination ($p > 0.05$). As for total protein and gluten, there was a reduction in the germination process, however, the samples with germination 6, 12 and 24 h showed higher digestibility in relation to the non-germinated grains and other germination times analyzed ($p > 0.05$). Analyzing the protein and amylaceous changes of germinated grains allowed a greater understanding of the potential benefits of the use of these grains for human consumption.

Keywords: Sprout. Gluten. Cereal. Digestion *in vitro*. Hydrolytic enzymes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perspectivas de crescimento da produção de cereais, oleaginosas, cana-de-açúcar e algodão.....	29
Figura 2. Modelo filogenético das relações entre genomas do trigo <i>Triticum aestivum</i> (AABBDD).....	31
Figura 3. Anatomia do grão de trigo	32
Figura 4. Endosperma do trigo.....	34
Figura 5. Modelo esquemático estrutural da composição proteica do glúten de trigo	38
Figura 6. Estrutura molecular dos polímeros da amilose (A) e amilopectina (B).....	39
Figura 7. Alterações da semente quanto ao conteúdo de água por tempo.....	41
Figura 8. Ação da α -amilase no processo germinativo.....	43
Figura 9. Esquema representativo dos principais pontos abordados na pesquisa.....	75
Figura 10. Representação dos procedimentos para germinação do trigo.....	76
Figura 11. Crescimento dos grãos de trigo BRS Graúna durante a germinação.....	77
Figura 12. Separação do grão de trigo de suas raízes seminais, coleótilo e radículas.....	78
Figura 13. Absorção de água pelas sementes de trigo durante a germinação.....	83
Figura 14. Representação da atividade da lipase/esterase, método FDB, com cinco repetições para cada tempo de desenvolvimento germinativo do trigo.....	85

Figura 15. Atividade da enzima α -amilase dos grãos de trigo durante a germinação.....	86
Figura 16. Micrografia eletrônica de varredura de trigo triturado em diferentes estágios de germinação (0 a 60 h). Grânulos de amido representado por A e B e setas indicando o ataque enzimático.....	87
Figura 17. Micrografia eletrônica de varredura de grão de trigo sem germinar (0 h) e após 48 horas de germinação.....	90
Figura 18. Proteína bruta e glúten durante os períodos de germinação do trigo expressos em g. 100 g ⁻¹ em base seca.....	91
Figura 19. Alterações morfológicas mais representativas durante a germinação de trigo com cortes de 40 μ m, fluorocromos fucsina ácida e calcofluor e captura de imagens com sobreposição de filtros (40 X).....	95
Figura 20. Micrografia de fluorescência da seção transversal (40 μ m) do trigo em 0 e 60 h de germinação com adição dos fluorocromos fucsina ácida e calcofluor e filtros UV e azul sobrepostos (10x).....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química das diferentes partes botânicas do grão de trigo	33
Tabela 2. Composição das soluções estoques e dos fluídos digestivos SSF, SGF e SIF calculados para um volume final de 500 mL.....	81
Tabela 3. Resultados médios em base seca de amido total e resistente em trigo germinado, expressos em g. 100 g ⁻¹	95
Tabela 4. Resultados médios de amido total e amido resistente após digestão in vitro de trigo germinado, em base seca e expressos em g. 100 g ⁻¹	99
Tabela 5. Influência do tempo de germinação sobre a digestibilidade do amido e proteína do trigo	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACC	<i>American Association of Cereal Chemists</i>
AE	Endosperma amiláceo
AL	Aleurona
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
AT	Amido total
CSLM	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>
CT	Células de transferência
DC	Doença celíaca
DMSO	Dimetilsulfóxido
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FDB	Dibutirato de fluoresceína
FN	<i>Falling Number</i>
GOPOD	Glucose oxidase-peroxidase
HMW	<i>High Molecular Weight</i>
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LMW	<i>Low Molecular Weight</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PB	Proteína bruta
PBD	Proteína bruta após digestão <i>in vitro</i>
PD	Digestibilidade proteica
PR	Proteínas de reserva
RS	Amido resistente
SD	Digestibilidade amilácea
SGF	Fluído gástrico simulado

SIF	Fluido intestinal simulado
SSF	Fluido salivar simulado
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS.....	25
CAPITULO 1 –	27
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
1 Trigo	29
1.1 Produção	29
1.2 Identidade genética	30
1.3 Estrutura do grão	32
2 Proteínas	35
2.1 Proteínas do trigo	36
2.2 Separação e caracterização das proteínas	37
2.3 Patologias relacionadas ao glúten	39
3 Amido	40
4 Germinação	42
4.1 Alterações durante a germinação	43
5 Digestão <i>in vitro</i>	47
6 Microscopia de alimentos	48
REFERÊNCIAS	51
CAPITULO 2 –	71
1 INTRODUÇÃO	75
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	77
2.1 Material	77
2.2 Métodos	77
2.2.1 Processo de germinação das sementes	77
2.2.2 Secagem e armazenamento das amostras	79

2.2.3 Digestão <i>in vitro</i>	80
2.2.4 Determinação de amido total	81
2.2.5 Amido Resistente	82
2.2.6. Digestibilidade amilácea <i>in vitro</i>	82
2.2.7 Atividade de α -amilase	82
2.2.8 Determinação de proteína bruta	82
2.2.9 Digestibilidade proteica <i>in vitro</i>	83
2.2.10 Teor de glúten	83
2.2.11 Microscopia eletrônica de varredura.....	83
2.2.12 Análises macro e microscópica de fluorescência.....	84
2.2.13 Análise estatística.....	84
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
3.1 Efeito da hidratação e alterações enzimáticas durante a germinação controlada.....	85
3.2 Morfologia dos grânulos de amido e rede proteica durante a germinação	88
3.3 Conteúdo proteico do trigo durante a germinação.....	93
3.4 Alteração do amido durante processo germinativo	95
3.5 Microscopia de fluorescência.....	96
3.6 Digestibilidade do amido e proteína durante germinação do trigo.....	98
CONCLUSÃO.....	103
REFERÊNCIAS	105

1 INTRODUÇÃO

Os cereais têm um papel primordial como fonte de nutrientes e fibras para a alimentação humana, sendo utilizados como base para diversos produtos (SCHEUER, 2009; REBELLO; GREENWAY; FINLEY, 2014). Dentre estes, o trigo é um cereal com alto valor nutricional (60 a 75 % de amido e 10 a 15 % de proteínas) e, por ser uma matéria prima básica no preparo de diversos alimentos consumidos diariamente por grande parte da população mundial, os quesitos de rendimento e qualidade são requeridos pela indústria de transformação (MEREDITH; POMERANZ, 1985; TROCCOLI et al., 2000; OLAERTS et al., 2016).

Por ser componente principal em diversos alimentos devido às características tecnológicas singulares, a produção de trigo apresenta expressiva relevância no agronegócio. A produção mundial em 2016 foi de 750 milhões de toneladas, e no Brasil, a produção alcançou 4,2 mil toneladas do grão na safra de 2017/2018 (CONAB, 2018; FAOSTAT, 2018).

O nutriente mais abundante do trigo é o amido, e é classificado como polissacarídeo de reserva energética (HOSENEY, 1991; SHEWRY, 2009; SCHEUER et al., 2011). O segundo composto predominante no trigo é a proteína, segundo Shewry et al. (2009), Zhang et al. (2010), Sheuer et al. (2011) e Zou et al. (2012), apesar da baixa concentração de proteínas (10 a 15 %), a alta frequência no consumo torna este cereal uma boa fonte deste nutriente. Além disso, as proteínas do trigo têm uma importância tecnológica única (KHAN; SHEWRY, 2009; JOHANSSON et al., 2013).

Essas características únicas das proteínas do trigo ocorrem devido à presença das proteínas de reserva gliadina e glutenina (integrantes do grupo das prolaminas e glutelinas respectivamente), as quais quando hidratadas, na presença de força mecânica, apresentam a formação de uma rede viscoelástica denominada glúten (WIESER, 2007; ABITRIGO, 2011; WAN et al., 2013). Essa rede proteica é a responsável pela coesividade e elasticidade da massa (HOSENEY, 1991). No grão, 80 % dessas proteínas são armazenadas no endosperma amiláceo (CORNELL; HOVELING, 1997).

De forma geral, os grãos manifestam alterações bioquímicas complexas, onde sua composição e suas propriedades físico-químicas podem ser alteradas por fatores genéticos, ambientais e condições de reprodução, aspectos estes que repercutem diretamente na sua qualidade (HOSENEY, 1991; TROCCOLI et al., 2000). Uma técnica que pode proporcionar melhorias na qualidade da farinha de trigo, bem como promover avanços tecnológicos, é a germinação (ZILIC et al., 2014).

Segundo Lin e Lai (2006), o processo de germinação é complexo e envolve reações bioquímicas e fisiológicas no grão, que resultam em mudança na composição química e morfológica. Com isso, a germinação é considerada uma ferramenta simples e econômica para melhorar a qualidade nutricional de cereais, crucíferas e leguminosas (SWIECA et al., 2012), proporcionando melhoras nutricionais na qualidade da farinha de trigo (ZILIC et al., 2014).

Os grãos germinados têm sido relacionados com a prevenção de doenças crônicas, cardiovasculares, câncer de cólon e diabetes (ANDERSON et al., 2004). Devido aos efeitos benéficos à saúde, o uso de grãos germinados em países europeus e orientais é difundido desde a antiguidade (SALAS-PÉREZ et al., 2016). Contudo, a qualidade das sementes e condições nas quais são germinadas podem alterar os componentes pró-saúde (DZIKI et al., 2015).

Segundo Donkor et al. (2012) e Pajak et al. (2014), durante a fase de crescimento dos grãos germinados a concentração de nutrientes permanece alta. Estudos reportam que a farinha de grãos germinados possui quantidades mais elevadas de açúcares livres, aminoácidos, peptídeos, minerais e amido resistente, quando comparada com as farinhas tradicionais (NODA et al., 2004; ANDERSEN et al., 2011; VAN HUNG et al., 2012; ZILIC et al., 2014). Porém, em algumas variedades a germinação não influenciou no teor proteico, mas alterou a fração de gliadinas e gluteninas (SWIECA; DZIKI; GAWLIK-DZIKI, 2017). Acredita-se que as endopeptidases possam hidrolisar as proteínas do glúten, impedindo formação de uma rede forte (REINIKAINEN et al., 2003; GOESAERT et al., 2005).

Além das mudanças durante a germinação, os componentes do trigo sofrem alterações durante o processo digestivo e a biodisponibilidade de nutrientes pode aumentar ou diminuir no trato digestivo como consequência do efeito enzimático, mudanças no pH,

mudanças estruturais dos compostos, presença de sais e de micro-organismos, entre outros fatores que possibilitam a degradação e biodisponibilidade de nutrientes (KULKARNI et al., 2009; HUR et al., 2011, MINEKUS et al., 2014).

Nesse sentido, podem ser utilizados modelos de digestão *in vitro* que permitem simular as condições *in vivo* do processo de digestão nas etapas: boca, estômago e intestino delgado; levando em consideração todos os fatores fisiológicos importantes da digestão: enzimas, pH, temperatura, sais e tempo de digestão (BOISEN; EGGUM, 1991).

Assim, identificar as mudanças que ocorrem no alimento tanto em processos biológicos (germinação) quanto no processo digestivo é um fator importante para determinar o potencial nutricional dos grãos. Com o contexto apresentado, o estudo propõe analisar a influência da germinação controlada do grão de trigo sobre as características nutricionais e estruturais das proteínas e do amido, bem como verificar a disponibilidade destes compostos após a digestão *in vitro*.

O trabalho está apresentado na forma de dois capítulos. O Capítulo 1 consiste na Revisão Bibliográfica acerca dos principais tópicos sobre o trigo, seus compostos, processo germinativo e digestibilidade. O Capítulo 2 trata das alterações proteicas e amiláceas durante a germinação do trigo e a simulação do processo digestivo nesses grãos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações nutricionais e morfológicas do amido e das proteínas dos grãos de trigo durante o processo de germinação controlado e verificar a digestibilidade após a simulação *in vitro*.

2.2 Específicos

- Acompanhar alterações na microestrutura das amostras de grão de trigo após germinação durante 0, 6, 12, 24, 36, 48 e 60 horas por microscopia de fluorescência.
- Avaliar as alterações proteicas a partir do teor de proteína bruta e teor de glúten durante o processo de germinação.
- Analisar as alterações amiláceas a partir das análises de amido total, resistente, atividade de α -amilase, microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Avaliar o impacto da germinação sobre a digestibilidade *in vitro* do trigo quanto ao teor de proteína bruta, amido total e resistente.

**CAPÍTULO 1 –
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

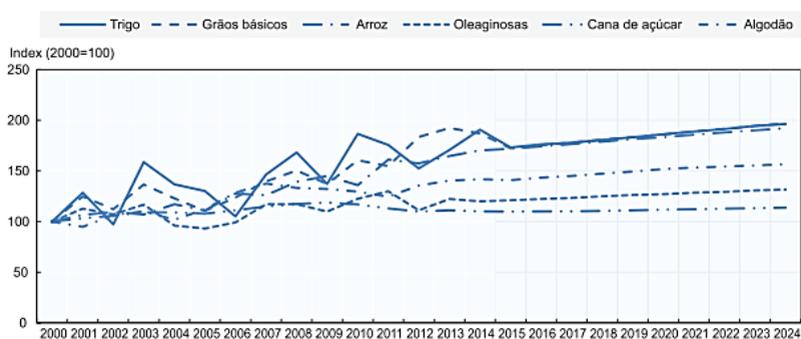
1 Trigo

1.1 Produção

O trigo é uma das três culturas mais importantes do mundo em área cultivada (CURTIS; RAJARAM; MACPHERSON, 2002). Em 2016 a produção mundial de trigo alcançou aproximadamente 750 milhões de toneladas em uma área de 220 milhões de hectares (FAOSTAT, 2018). Segundo a *Grain: World Markets and Trade* (2018), a União Européia foi a maior produtora mundial em 2017, com 151,68 milhões de toneladas.

A produção mundial de trigo em 2018 caiu substancialmente em relação ao ano passado, porém, quando comparado com as oleaginosas, cana-de-açúcar e algodão, a cultura de cereais deve continuar com um aumento considerável, como observado na Figura 1 (FAO, 2015; USDA, 2018). Acredita-se que em 2024 o consumo de trigo deva atingir 11,5 Mt, e o preço ao produtor deverá aumentar cerca de 6,4 % por ano para incentivar a produção (FAO, 2015).

Figura 1. Perspectivas de crescimento da produção de cereais, oleaginosas, cana-de-açúcar e algodão



Fonte: FAO (2015).

Alguns registros denotam que a cultura de trigo no Brasil teve início na década de 50. Na época, a produção de milho, arroz e mandioca era mais comum do que o cultivo do trigo, porém, a tradição alimentar

dos colonizadores e a elevada importação de trigo, pressionaram o Governo a estimular a produção desse cereal (OSORIO, 1982).

No Brasil, na safra de 2017/2018, a área plantada de trigo foi de 1,9 mil hectares, alcançando uma produção de 4,2 mil toneladas do grão (CONAB, 2018). Por se tratar de uma cultura predominantemente de inverno, a região sul do Brasil se destaca no cultivo, sendo o Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina os responsáveis por cerca de 85 % da produção nacional (CONAB, 2018a).

Embora essa cultura tenha uma importância notória no agronegócio brasileiro, o rendimento ainda é considerado baixo quando comparado a outros países (USDA, 2014). Para atender às necessidades internas, o país, como alternativa, recorre comprando do mercado internacional, geralmente de países como Argentina, Canadá, Estados Unidos e Paraguai. Dentre os países em desenvolvimento o Brasil tem se tornado o maior importador de trigo, com cerca de 6 a 7 milhões de toneladas por ano (POPPER; SCHAFER; FREUND, 2006; CONAB, 2018b).

1.2 Identidade genética

A palavra trigo vem do latim *triticum*, que recebeu essa denominação devido ao processo de trituração que é utilizado para separar o grão da camada que o reveste, esta palavra pode ser utilizada para referir-se tanto à planta quanto às sementes (LÉON, 2007).

O trigo é pertencente à família Poaceae (Gramineae), que, por sua vez, inclui culturas como a Cevada (*Hordeum vulgare* L.), aveia (*Avena sativa* L.), centeio (*Secale cereale* L.), milho (*Zea mays* L.) e o arroz (*Oryza sativa* L.) (KHADKA, 2016).

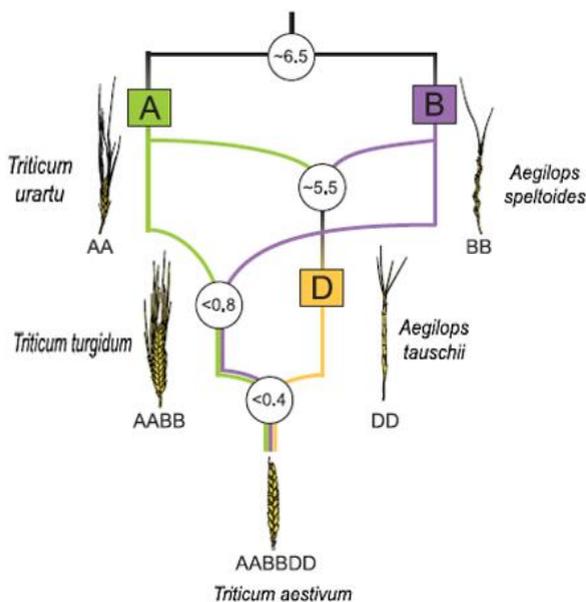
O trigo (*Triticum aestivum* L.) é um dos cereais mais importantes do mundo, sendo utilizado por 30 % da população mundial (MARCUSSEN et al., 2014). Sua flexibilidade em diferentes condições climáticas é um dos motivos pelo qual é cultivado mundialmente. Parte dessa adaptabilidade está relacionada ao genoma, no qual sofreu dois eventos de poliploidização até chegar ao genoma alohexaplóide (NESBITT; SAMUEL, 1996; PETERSEN et al., 2006).

O trigo hexaplóide foi formado a partir de múltipla hibridização, com pelo menos três espécies progenitoras diferentes (A, B e D). Acredita-se que a partir da hibridização de duas linhagens diploides, o *Triticum urartu* (genoma AA) com *Aegilops speltoides* (genoma BB),

originou-se o *Triticum turgidum* (AABB), um tetraploide (HUANG et al., 2002).

A segunda hibridização ocorreu entre o *Triticum turgidum* e uma espécie de gramínea diploide, o *Aegilops tauschii* (genoma DD). Esse segundo evento resultou no ancestral do *Triticum aestivum* ssp. *aestivum* (AABBDD, trigo moderno), o *T. aestivum* ssp. *spelta* (NESBITT; SAMUEL, 1996; PETERSEN et al., 2006; EVERSOLE et al., 2014). A árvore genealógica do trigo e os eventos de hibridizações citados podem ser observados na Figura 2.

Figura 2. Modelo filogenético das relações entre genomas do trigo *Triticum aestivum* (AABBDD)



Legenda: Círculos = datas das hibridizações dadas em milhões de anos.

Fonte: Marcussen et al. (2014).

Desde então, o *Triticum aestivum*, conhecido como trigo pão, tem feito parte de 95 % de toda produção de trigo cultivada em todo o mundo (MARCUSSEN et al., 2014; EVERSOLE et al., 2014). Cultivares com alta eficiência tendem a eliminar os menos eficientes, caso haja uma doença devastadora desses cultivares de alta qualidade, há o risco de não

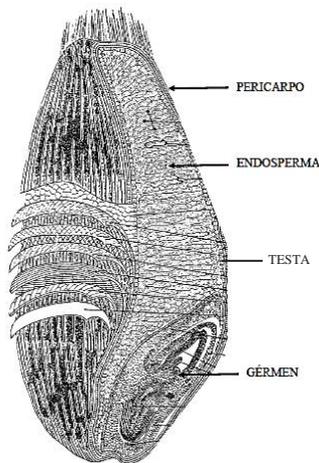
existir matérias primas para recomençar. Uma prova desse risco, é que os cultivares de trigo introduzidos em 1958 desapareceram em até 98 % (LABOURIAU, 1983).

1.3 Estrutura do grão

O grão de trigo é uma cariopse, ou seja, possui semente única. Geralmente tem entre 5 e 9 mm de comprimento e um peso que varia de 35 a 50 mg (HOSENEY, 1991; EVERS; MILLAR, 2002). Durante praticamente toda a extensão longitudinal da parte ventral (lado oposto ao gérmen) é acompanhado de um sulco, que interfere na extração da farinha, necessitando um processo abrasivo com sucessivas triturações (HOSENEY, 1991; CHEFTEL; CHEFTEL, 1992).

É constituído basicamente por três partes: pericarpo (4,5 a 8,6 %), endosperma (84 a 89 %) e gérmen (2,5 a 3,5 %) (Figura 3) (GUAGLIA, 1991; EVERS; MILLAR, 2002). O grão de trigo possui um revestimento (2,5 %) que é conhecido como testa. A testa é responsável pela entrada de água para o embrião (EVERS; MILLAR, 2002).

Figura 3. Anatomia do grão de trigo



A composição química pode variar de acordo com a parte do grão. A partir das informações contidas na Tabela 1 é possível observar variações na composição de diferentes partes botânicas do trigo.

Tabela 1. Composição química das diferentes partes botânicas do grão de trigo

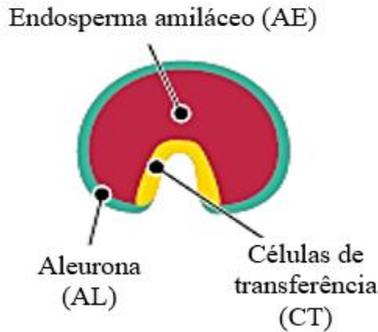
	% em grão seco	Composição (% P/ P seco)			
		Proteínas (N x 6,25)	Fibra bruta	Lipídios	Cinzas
Grão integral	100	12	2	2	1,5
Tegumentos externos	9	5	21	1	3
Camada de aleurona	8	18	7	9	16
Gérmen	3	26	3	10	5
Endosperma	80	10	< 0,5	1	0,5
Farinha branca	-	11	< 0,5	1	0,5

Fonte: Adaptado de Cheftel, Cuq e Lorient (1989).

O endosperma é a maior parte do grão (84 a 89 %). Está composto de uma matriz proteica com paredes celulares espessas, proteínas funcionais e nutricionais. Essa matriz, com células grandes, também armazena grandes quantidades de grânulos de amido (GUAGLIA, 1991; HADDAD et al., 2001; EVERS; MILLAR, 2002; KHADKA, 2016).

No endosperma do trigo existem três tipos de células principais: endosperma amiláceo, a camada de aleurona e células de transferência (Figura 4) (DREA et al., 2005). O endosperma amiláceo está em maior quantidade e é responsável pelo acúmulo de amido e proteínas (PFEIFER et al., 2014).

Figura 4. Endosperma do trigo



Fonte: Pfeifer et al. (2014).

A camada de aleurona botanicamente faz parte do endosperma, ainda que se separe junto com o farelo durante a moagem (HOSENEY, 1991). Este, circunda quase todo o endosperma, exceto onde as células de transferência se desenvolvem (PFEIFER et al., 2014). O que caracteriza a aleurona do trigo é a camada simples, diferentemente da cevada, que tem uma camada múltipla contendo de duas a três células de profundidade (BUTTROSE, 1963; HOSHIKAWA, 1993; WALBOT, 1994).

A aleurona contém proteínas com alto teor de lisina, fibra insolúvel, vitaminas solúveis em água, lipídios, esteróis, ligninas, entre outros (HEMERY et al., 2009; DELCOUR; HOSENEY, 2010; BROUNS et al., 2012), a qual possui um papel fundamental na germinação dos grãos. As células de transferência atuam no transporte da sacarose para o endosperma e embrião (PFEIFER et al., 2014).

A anatomia do endosperma tem relação direta com a textura do trigo, ou seja, interfere nas propriedades de vitreosidade e dureza do grão (HADDAD et al., 2001). A vitreosidade se refere à compacticidade do endosperma. É determinada pelas condições ambientais durante o desenvolvimento do grão, como a temperatura, água e nitrogênio disponíveis. A dureza se refere ao grau de resistência à deformação. É um parâmetro físico determinado por fatores genéticos e desta forma, o grau de dureza no trigo está diretamente relacionado com o teor de proteína (HOSENEY, 1991; EL-KHAYAT et al., 2006; GREFFEUILLE et al., 2007).

Ainda referindo-se às propriedades de vitreosidade e dureza do grão, os trigos podem ser vítreos e translúcidos, ou opacos e farináceos. Há associação entre o conteúdo de proteína, qualidade vítrea e dureza do

grão. Trigos duros ricos em proteínas (12 a 15 g. 100 g⁻¹ de proteína) tendem a ser vítreos, estruturalmente a proteína adere firmemente a superfície do amido. Trigos moles pobres em proteínas (8,5 a 9,5 g. 100 g⁻¹) tendem a ser opacos, geralmente a aparência da proteína é semelhante ao trigo duro, porém, não há revestimento do amido. Por essa ligação proteína-amido ser fraca, rompe-se com facilidade, sendo difícil encontrar grãos quebrados (HOSENEY, 1991).

2 Proteínas

Uma forma de classificar as proteínas baseia-se nas funções e relações bioquímicas, dividindo-as em proteínas de reserva, proteínas estruturais e metabólicas e proteínas de proteção. A primeira tem a função de armazenar nitrogênio, carbono e enxofre. As estruturais e metabólicas são imprescindíveis para a estrutura e crescimento da semente. A de proteção se opõe aos patógenos microbianos, invertebrados ou desidratação. Bewley (2001) ressalta que algumas funções podem ser combinadas, como a de reserva e proteção.

Osborne (1924) classificou as proteínas dos cereais de acordo com a solubilidade, dividindo-as em quatro grupos: albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas. As albuminas são encontradas em pequenas quantidades em sementes, são solúveis em água e coagulam sobre aquecimento. As globulinas também estão presentes em sementes, geralmente em forma cristalina, são solúveis em soluções salinas e insolúveis em água. As prolaminas são encontradas em cereais e são solúveis em álcool. Já as glutelinas são solúveis em soluções básicas (SHEWRY; CASEI, 1999).

Nos cereais e nas gramíneas selvagens encontram-se principalmente as prolaminas. Na proteína do trigo estão presentes as glutelinas e as prolaminas, que por ter ligações de enxofre são solúveis em soluções alcoólicas (FERREIRA; BORGHETTI, 2004). As proteínas de reserva do trigo são funcionais, e por essa razão são consideradas únicas. Acreditava-se que o conteúdo proteico estava ligado somente aos fatores ambientais, no entanto, observou-se a relação genética com o conteúdo de proteína, podendo-se fazer cruzamentos para aumentar ou reduzir a riqueza proteica (HOSENEY, 1991).

A proteína é importante do ponto de vista nutricional, e quando se altera o conteúdo proteico dos cereais, as composições relativas dos

diferentes tipos de proteínas precisam ser consideradas. A quantidade de albuminas e globulinas (proteínas fisiologicamente ativas) aumenta com um conteúdo maior de proteína. Porém, expresso em porcentagem na forma de proteína total, não aumenta com tanta rapidez como as proteínas de reserva (prolaminas e glutelinas) (HOSENEY, 1991).

As proteínas de reserva (PR) são sintetizadas no retículo endoplasmático e transportadas até os vacúolos de reserva (corpos proteicos). A síntese e a deposição das proteínas variam de espécie em espécie, estando sujeitas a uma regulação temporal e espacial, aparecendo em diferentes estágios do desenvolvimento das sementes (HERMAN; LARKINS, 1999).

O transporte das PR pode ser realizado pelo complexo de Golgi ou, em alguns cereais, a partir do retículo endoplasmático rugoso. Outro vacúolo com depósito de proteínas são os vacúolos líticos. Este, contém enzimas proteolíticas ácidas (hidrolases ácidas) que hidrolisam as proteínas para o crescimento na fase pós-germinativa, sustentando o desenvolvimento inicial da plântula. A síntese das PR ocorre quando os mRNA codificam as proteínas, que estão nos tecidos de reserva (cotilédones, endosperma, etc.), em períodos bem definidos durante o desenvolvimento da semente (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

2.1 Proteínas do trigo

No trigo a proporção média das proteínas são: albuminas (9 %), globulinas (5 %), prolaminas (40 %) e glutelinas (46 %). O trigo é o único cereal que possui glúten em quantidade expressiva, sendo as proteínas do glúten responsáveis pelas propriedades viscoelásticas e coesivas da massa (CHEFTEL; CUQ; LORIENT, 1989; MÓDENES et al., 2009; ABITRIGO, 2011).

As proteínas de reserva do grão de trigo, gliadinas e gluteninas, quando adicionadas de água e submetidas à força mecânica formam uma rede chamada glúten (ABITRIGO, 2011; WAN et al., 2013). As gliadinas têm cadeias simples e pouca resistência a extensão, porém, quando hidratadas proporcionam coesividade. As gluteninas são compostas de cadeias ramificadas, são resistentes a extensão, conferindo elasticidade a massa (HOSENEY, 1991).

As cadeias proteicas de gliadinas e gluteninas têm uma pequena força de repulsão entre si, e nessas condições que se encontram, sem cargas negativas e baixos níveis de cargas positivas, facilitam a interação

entre elas, havendo a formação de uma massa forte e coesa (HOSENEY, 1991).

A maioria das farinhas de outras fontes também têm a capacidade de quando fermentadas, produzir gás e conseqüente crescimento da massa, porém, cita-se as capacidades únicas da rede de glúten por conseguir reter os gases produzidos na fermentação, sustentando o aumento da massa e formando um produto esponjoso. Nas demais farinhas o gás tende a escapar e o pão achata-se (HOSENEY, 1991; ABITRIGO, 2011). A capacidade de absorção de água pelas proteínas, combinadas à capacidade de retenção do gás carbônico resultam na força de panificação (ÓLAN et al., 2010).

Dentre os aminoácidos que formam o glúten, a glutamina com 327,2 moles/1000 moles de aminoácidos e prolina com 147,7 moles/1000 moles somam 40 % dos resíduos de aminoácidos totais (CHEFTEL; CUQ; LORIENT, 1989).

Para degradar as proteínas que são ingeridas, o organismo humano produz cerca de 570 proteases, que são divididas de acordo com o metabolismo catalítico em: serina proteases, cisteína proteases, proteases aspárticas, treonina proteases e metaloproteases (PUENTE et al., 2003; QUESADA et al., 2009; RAWLINGS et al., 2014).

2.2 Separação e caracterização das proteínas

As gliadinas e gluteninas dispõem de funções diferentes na panificação e isto se deve principalmente às diferenças na composição do próprio glúten. Tanto a eletroforese como a cromatografia têm sido técnicas que contribuem para caracterização das proteínas (LAFIANDRA; MACRITCHIE, 1997), e a partir dessas, é possível classificar as proteínas do glúten.

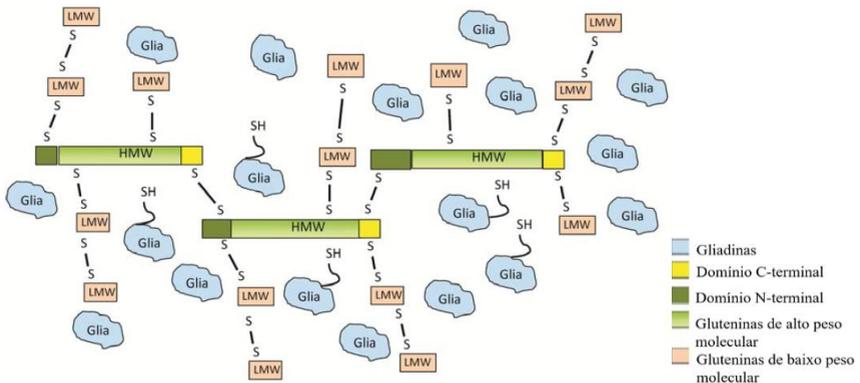
As gliadinas são divididas em quatro grupos: α -, β -, γ - e ω -gliadinas, quando separadas em peptídeos as massas moleculares vão de 30 a 80 kDa (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). As ω -gliadinas possuem massas moleculares entre 46 e 74 kDa, já as α -, β -, γ -gliadinas possuem massas moleculares inferiores, entre 30 e 45 kDa (JOHANSSON et al., 2013). Embora algumas gliadinas sejam pobres em enxofre, elas formam principalmente ligações intramoleculares dissulfeto (JOHANSSON et al., 2013). As α -, γ - e ω - gliadinas interagem com as β -gliadinas por ligações de hidrogênio, essas ligações também atuam para

manter unidas as gluteninas e gliadinas (KASARDA; BERNARDIN; QUALSET, 1976; SCARDONE; FORLANI; CERLETTI, 2000; SHEWRY, 2009).

As gluteninas são consideradas um grupo heterogêneo com massas moleculares que variam de 12 a 130 kDa e ligações intermoleculares dissulfeto. São classificadas como de alta massa molecular (HMW-GS, do inglês *High Molecular Weight*) quando possuem acima de 90 kDa, e de baixa massa molecular (LMW-GS, do inglês *Low Molecular Weight*) abaixo deste mesmo valor (WIESER, 2007; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

As LMW-GS são classificadas de acordo com a massa molecular e ponto isoelétrico em B, C e D. Podem ser classificadas também quanto a sequência N-terminal, em Serina e Metionina (HAMER, 2003). Outros subgrupos como i-, s- e m- foram identificados baseando-se na composição de aminoácidos no N-terminal (JOHANSSON et al., 2013). As HMW-GS podem ser agrupadas em x, de 83 a 88 kDa, e y, de 67 a 74 kDa (HAMER, 2003; WIESER, 2007). Um modelo esquemático da interação entre gliadinas e gluteninas de alta e baixa massa molecular pode ser observado na Figura 5.

Figura 5. Modelo esquemático estrutural da composição proteica do glúten de trigo



Fonte: Adaptado de Johansson et al. (2013).

As proteínas de reservas por terem essas diferenças em suas massas moleculares e diferença de carga, podem ser separadas em frações com o método de SDS-PAGE. Essa técnica permite a separação acordo com a mobilidade em gel de poliacrilamida pH 2 na presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) (HOSENEY, 1991; HAMER, 2003; WIESER, 2007). Não existe uma extração que solubilize totalmente a proteína da farinha, mas após o uso de SDS no tampão de extração foi observada uma maior eficiência do método (RIZZA et al., 2005).

2.3 Patologias relacionadas ao glúten

Em alguns indivíduos susceptíveis, a gliadina pode induzir ou desencadear uma resposta inadequada do sistema imunológico, podendo haver desde hipersensibilidade, alergia até desordens autoimunes (SAPONE et al., 2012; FASANO et al., 2015, SCHERF; KOEHLER; WIESER, 2016). Dentre essas, a doença celíaca (DC) é imunomediada pela ingestão do glúten, reconhecida pela inflamação nas vilosidades no intestino, que resulta na má absorção dos nutrientes. Sabe-se que essa toxicidade resulta principalmente pela sequência do peptídeo 33-mer (WIESER; KOEHLER, 2008; SHAN et al., 2002).

A fração de gliadina conhecida como a mais imunorreativa é a ω -5 gliadina (ZILIC et al., 2016). Para determinação de glúten em alimentos é recomendado a técnica de imunoensaio ELISA R5 sanduíche, que é específico para a sequência de aminoácidos que mais afeta a doença celíaca: glutamina-glutamina-prolina-fenilalanina-prolina (QQFPF) (ÓSMAN et al., 2001; LÓPEZ; LLORENTE; MÉNDEZ, 2002; CÓDEX ALIMENTARIUS, 2008). Outra técnica recomendada é o ELISA G12, que detecta o peptídeo 33-mer (MÓRON et al., 2008; HALBMAYR-JECH et al., 2012).

O tratamento para todas essas desordens relacionadas ao glúten é a exclusão total do glúten na dieta. Há amplas investigações para encontrar novas alternativas para esses indivíduos, como fatores que diminuam a imunogenicidade destes cereais, estudos sobre as endopeptidases, ou terapia enzimática com enzimas proteolíticas (PUENTE et al., 2003; CASTRO-ANTUNES et al., 2011; BETHUNE; KHOSLA, 2012; WIESER, KOEHLER; 2012; HERRERA, 2016).

3 Amido

Morfológicamente o amido é encontrado na forma de grânulos. Quando se forma só um grânulo em um amiloplasto é classificado como simples, quando mais de um grânulo é formado em um mesmo amiloplasto, classificado como composto. No trigo, milho, cevada, centeio e sorgo são encontrados amidos simples (LINDEBOOM; CHANG; TYLER, 2004; LAJOLO; MENEZES, 2006). Só aveia e arroz têm amido composto (DELCOUR; HOSENEY, 2010).

Os grânulos de amido podem ter diferentes morfologias: esférico, oval, poligonal, alongado, dentre outros. O tamanho varia de submícron a 100 μm (GOESAERT et al., 2005). O grão de trigo caracteriza-se por ter duas populações de amido, o tipo A e tipo B. O tipo A apresenta grânulos grandes (22 a 36 μm) e lenticulares que se formam do quarto ao sétimo dia depois da floração. O tipo B são pequenos (2 a 3 μm) e esféricos, aparecem depois do décimo dia de floração (BECHTEL et al., 1990; GOESAERT et al., 2005; PÉREZ; BERTOFT, 2010).

Quanto às estruturas cristalinas os grânulos de amido se apresentam em três tipos (A, B e C), o conteúdo de água e a forma dos cristais geram diferentes difrações em raios-x. O tipo A predomina em cereais, o tipo B em tubérculos e raízes e o tipo C é uma combinação dos amidos tipo A e B, encontrado em leguminosas e alguns tubérculos de espécies tropicais (BULÉON et al., 1998; KOSSMANN; LLOYD, 2000).

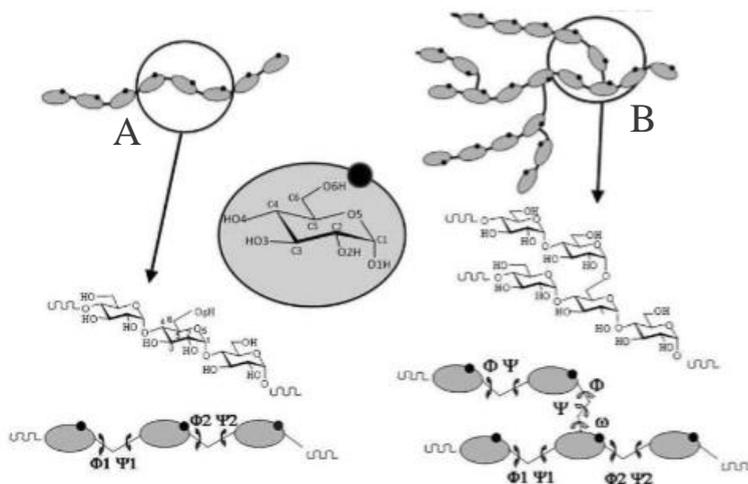
Molecularmente, o amido é formado pela união dos polímeros de glicose, denominados amilose e amilopectina. A maioria dos amidos possui esses componentes na proporção de 70 a 80 % de amilopectina e 20 a 30 % de amilose, exceto as variedades cerosas que apresentam um nível baixo de amilose (menor que 3 %) (ZOBEL, 1988; PÉREZ; BERTOFT, 2010).

A amilose é um polissacarídeo predominantemente linear formado por unidades de α -D-glicopirranose unidas por ligações α -(1,4) com grau de polimerização de 500 a 6000 resíduos de glicose. A linearidade confere algumas propriedades, como formação de complexos com o iodo, álcoois ou ácidos orgânicos e a tendência a retrogradação, produzindo géis duros e filmes fortes (ZOBEL, 1988; HOSENEY, 1991; SHAO et al., 2007).

A amilopectina, também formada por moléculas de α -D-glicopirranose, é considerada uma macromolécula e possui ramificações ao longo de sua estrutura. As moléculas são unidas por ligações α -(1,4) e interligadas pelas ligações α -(1,6), com grau de polimerização de 3×10^5 a

3×10^6 . Dividem-se em três grupos: A, composta por ligações α -(1,4); B, onde a glicose é unida por ligações α -1,4 e α -1,6; e C, ligações α -(1,4) e α -(1,6) e um grupo redutor (ZOBEL, 1988; HOSENEY, 1991). As estruturas da amilose e amilopectina podem ser observadas na Figura 6.

Figura 6. Estrutura molecular dos polímeros da amilose (A) e amilopectina (B)



Fonte: Pérez e Bertoft (2010).

O amido e produtos da degradação do amido que não são digeridos pelas enzimas humanas são definidos como amido resistente (EURESTA, 1992). Seu papel fisiológico é similar ao da fibra alimentar, resiste à digestão no intestino delgado e é fermentado no intestino grosso, servindo como substrato para o crescimento de bactérias intestinais (YUE; WARING, 1998; HARALAMPU, 2000). O amido resistente (RS) é classificado diante da sua resistência à digestão, o amido resistente tipo 1 é fisicamente inacessível, o RS tipo 2 é classificado pela forma do grânulo e o RS tipo 3 ocorre pela retrogradação do amido. O teor de RS e resposta glicêmica são dois importantes indicadores da digestibilidade amilácea (ENGLYST; KINGMAN; CUMMINGS, 1992; MUIR; O'DEA, 1992; CHAMP; FAISANT, 1996; GOÑI et al., 1996)

4 Germinação

O termo germinação apresenta diferentes conceitos, agronomicamente e tecnologicamente é caracterizado como a emergência de parte da planta /plântula em algum tipo de substrato ou solo. Botanicamente, são consideradas sementes germinadas quando partes do embrião emergem dentro dos envoltórios, que geralmente formam uma curvatura da radícula (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

A germinação é um processo fácil e econômico para aumentar a qualidade nutricional e nutracêutica por meio da mudança do perfil químico dos grãos (DONKOR et al., 2012; SWIECA et al., 2012). Os cereais germinados vêm sendo consumidos principalmente em países orientais e europeus devido aos seus efeitos benéficos à saúde (SALAS-PÉREZ et al., 2016). O consumo de sementes germinadas está aumentando, já que boa parte dos consumidores optam por alimentos nutritivos e com propriedades funcionais (NARINA; HAMAMA; BHARDWAJ, 2012).

Além das alterações químicas é importante salientar que os alimentos germinados são consumidos de forma integral, e o consumo total desses grãos gera diversos benefícios para a saúde, como prevenção de doenças crônicas, cardiovasculares, câncer de cólon e diabetes (BAZZANO et al., 2002; BINGHAM et al., 2003; ANDERSON et al., 2004).

Os grãos germinados contêm diversos componentes pró-saúde, e estes podem ser influenciados pelas condições de produção, qualidade das sementes e processo de germinação (FARDET, 2010; ANDERSEN; KOEHLER; SOMOZA, 2011; DZIKI et al., 2015). Um estudo em sementes germinadas relata benefícios relacionados com a melhora da digestão das proteínas, diminuição dos ácidos graxos saturados totais, triglicerídeos, redução do teor de ácido fítico e maior biodisponibilidade de ferro (KHOLE et al., 2014).

No processo de germinação do trigo, há um aumento de enzimas como a α -amilase, algumas proteases, dentre outras. Essas enzimas degradam o amido, polissacarídeos não amiláceos e proteínas, gerando um aumento nos açúcares redutores, fibras solúveis, peptídeos e aminoácidos (KOEHLER et al., 2007; ZILIC et al., 2016).

Ao avaliar o teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de extratos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) foi observado um aumento desses compostos, enaltecendo no terceiro dia de germinação

(GUAJARDO-FLORES; SERNA-SALDÍVAR; GUTIÉRREZ-URIBE, 2013).

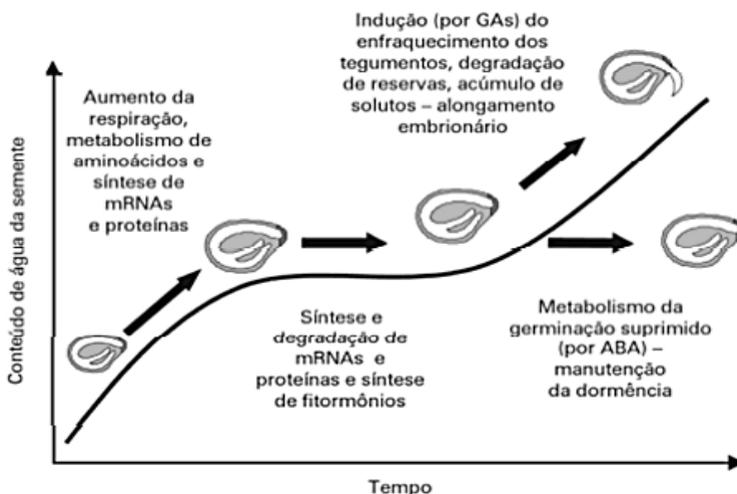
Em estudos realizados por Andersen, Koehler e Somoza (2011), observou-se efeitos benéficos sobre a homeostase da glicose ao formular pão de trigo fortificado com trigo germinado. Amici et al. (2008) evidenciaram nos brotos de trigo compostos importantes como enzimas, glicosídeos reduzidos e polifenóis.

4.1 Alterações durante a germinação

Acredita-se que as sementes tenham surgido entre 360 a 340 milhões de anos atrás. Sequências de eventos auxiliaram para que as sementes conseguissem se desenvolver com suas próprias reservas, sem depender da planta mãe (FERREIRA; BORGUETTI, 2004).

O início da germinação é determinado com o processo de absorção de água pelo embrião e termina com o surgimento do eixo embrionário (LABOURIAU, 1983; BEWLEY; BLACK, 1994; NONOGAKI; BASSEL; BEWLEY, 2010). Alguma das transformações decorrentes do conteúdo de água na semente até a formação do eixo embrionário podem ser observadas na Figura 7.

Figura 7. Alterações da semente quanto ao conteúdo de água por tempo



Legenda: ABA = Ácido abscísico e GAs = Giberelinas.
Fonte: Ferreira e Borghetti (2004) apud Cunha (2014).

A presença de água é uma das condições primordiais para germinação de uma semente viável. Outros fatores como temperatura favorável, composição de gases na atmosfera, iluminação e inibidores de germinação também são importantes. O conteúdo de nutrientes dos germinados pode ser alterado dependendo das condições impostas (LORENZ; VALVANO, 1981; PRICE, 1988).

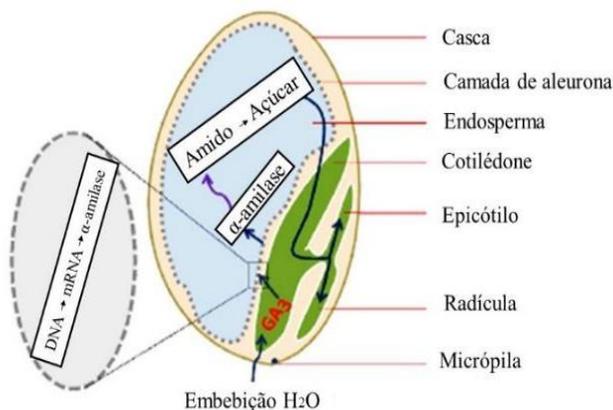
Filho (2005) considera a água fundamental para o metabolismo celular para a ativação enzimática e transporte e solubilização de reservas. O crescimento da semente é iniciado com a divisão celular e a expansão das células individuais, resultando no aumento de número e tamanho destas células, refletindo na expansão da semente (LABOURIAU, 1983).

A atividade antioxidante elevada nos cereais germinados ocorre principalmente pelo aumento da atividade das enzimas endógenas (ALVAREZ-JUBETE et al., 2010). Uma dessas enzimas é a α -amilase, que apresenta baixas concentrações em cereais intactos, no entanto, durante a germinação, o nível dessa endoenzima aumenta (HOSENEY, 1991).

A α -amilase é sintetizada na camada de aleurona e escutelo e responsável por degradar as ligações α -(1,4), hidrolisando as reservas de amido (Figura 8). Assim inicia-se o processo de clivagem do amido em moléculas de açúcar (DERERA, 1989; DELCOUR; HOSENEY, 2010; GAO et al., 2013; KHADKA, 2016). A ação desta endoenzima na clivagem interna das ligações α -(1,4), na amilose e na amilopectina, produz maltose, glicose e dextrinas (HUANG et al., 1990; SUTLIFF et al., 1991).

A enzima β -amilase hidrolisa as extremidades não redutoras da amilose e amilopectina, sua ação é interrompida nas ligações α -(1,6), produzindo maltose e dextrina β -limite (KAKEFUDA; DUKE; HOSTAK, 1986; HOSENEY, 1991). A β -amilase é acumulada durante o desenvolvimento do grão, se mantém ligada aos grânulos de amido e participa da mobilização amilácea durante o processo germinativo (ZIEGLER, 1999).

Figura 8. Ação da α -amilase no processo germinativo



Fonte: Adaptado de Khadka (2016).

A completa hidrólise do amido depende de ação conjunta de enzimas como α -amilase (EC 3.2.1.1), β -amilase (EC 3.2.1.2), enzima desramificadora (limite dextrinase, pululanase ou enzima-R) (EC 3.2.1.41) e α -glicosidase (EC 3.2.1.20) (SUN; HENSON, 1991; KUNTZ; BAMFORTH, 2007; HENSON; DUKE, 2008; MUSLIN; KARPELENIA; HENSON, 2003). Quando os grânulos de amido ainda estão intactos, apenas a α -amilase e a α -glicosidase podem hidrolisá-los (SUN; HENSON, 1990; SUN; DUKE; HENSON, 1995).

Além das α -amilases, a ação das proteinases e outras enzimas também marcam o início da germinação. As hidrólises das proteínas de reserva ocorrem de acordo com a atividade hidrolítica das proteases. As endopeptidases atacam ligações peptídicas internas do polipeptídeo, produzindo oligopeptídeos que são reduzidos aos seus aminoácidos. As aminopeptidases atacam o terminal amino, e as carboxipeptidases atacam o terminal carboxílico do peptídeo. Esses corpos proteicos, dependendo da planta, podem ser acumulados nos cotilédones ou no endosperma até a germinação (LABOURIAU, 1983; MUNTZ et al., 2001).

Durante a germinação as proteínas de reserva desaparecem, isso indica a importância desta proteína no início do desenvolvimento da

plântula. A mobilização das reservas é importante como fonte de energia para ocorrer a germinação e desenvolvimento da plântula. As proteínas de reserva podem suprir os aminoácidos, produzir substâncias de substratos respiráveis ou participar de outros processos (LABOURIAU, 1983; FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

Nas sementes de cereais o acúmulo de proteínas ocorre no endosperma, e a síntese das proteinases ocorre principalmente na camada de aleurona. Estas enzimas hidrolisam as proteínas do endosperma durante a germinação convertendo as mesmas em amidas (glutamina e asparagina) e deslocam-se para o eixo em crescimento (FERREIRA; BORGHETTI, 2004). Durante a fase de crescimento das sementes a concentração de nutrientes é alta (DONKOR et al., 2012; PAJAK et al., 2014).

Van Hung et al. (2012) germinaram o trigo por 48 h e observaram que os aminoácidos livres, cinzas e fibra alimentar total tiveram um aumento significativo, já os lipídios tiveram uma redução. Nesse mesmo estudo, foi possível observar um aumento da capacidade antioxidante, visto um aumento do conteúdo de compostos fenólicos.

Em outro estudo utilizando trigo com alto teor de amilose, observaram que a germinação aumentou significativamente as fibras alimentares, proteínas totais e lipídeos, este último, apresentando resultados divergentes do estudo anterior (VAN HUNG; MAEDA; MORITA, 2015).

Alguns estudos indicam que o teor de proteína aumenta devido à perda de hidratos de carbono que ocorre durante a respiração na germinação, porém, outros estudos apontam uma redução no teor proteico decorrente do consumo de nitrogênio para o crescimento do gérmen (HWANG; BUSHUK, 1973; LUKOW; BUSHUK, 1984; SIMSEK et al., 2014; OLAERTS et al., 2016). De acordo com Sibian, Saxena e Riar (2017), a germinação aumenta o conteúdo de aminoácidos essenciais, refletindo em uma melhora nutricional e qualidade proteica do grão.

Quanto às vitaminas, Plaza, De Ancos e Cano (2003) avaliaram a germinação de sementes de trigo, alfafa e soja, e relataram aumentos nas vitaminas A, C, E e grupo B, assim como fitoestrógenos daidzeína e genisteína.

Swieca, Dziki e Gawlik-Dziki (2017) estudaram o amido e proteína da farinha de trigo germinada e farinha de trigo normal. Observaram que uma substituição parcial da farinha normal por germinada resultou em um aumento de fenóis e proteínas e uma redução na digestibilidade do amido.

Quando comparado à farinha de trigo normal e farinha de trigo germinado, esta última possui maior quantidade de açúcar livre, aminoácidos, peptídeos e minerais. Há uma melhora na bioacessibilidade desses compostos e maior teor de amido resistente (NODA et al., 2004; ANDERSEN et al., 2011; VAN HUNG et al., 2012; ZILIC et al., 2014).

Uma das razões de incorporar grãos germinados nos alimentos é a melhoria da digestibilidade da proteína e aminoácidos essenciais (SANGRONIS; MACHADO, 2007). Segundo alguns autores, a maior digestibilidade proteica de farinhas do trigo germinado ocorre pela redução de fatores antinutricionais (ABBEY; MARK-BALM, 1988; MARERO et al., 1991; GHAVIDEL; PRAKASH, 2007).

5 Digestão *in vitro*

A digestão é um processo físico e químico que acontece no trato gastrointestinal. Esse processo transforma os alimentos ingeridos em moléculas menores que são absorvidas e utilizadas pelas células do organismo (TORTORA; DERRICKSON, 2008). Dessa forma, o processo físico consiste na redução do tamanho das partículas mediante força mecânica e o químico engloba a transformação das macromoléculas em moléculas simples por ação das enzimas digestivas, hidrolisando proteínas em aminoácidos, carboidratos em monossacarídeos e gorduras em glicerol e ácidos graxos (AGUDELO, 2015).

A digestão *in vitro* é uma técnica que visa simular a digestão *in vivo*, fornecendo alternativas para o rastreio de alguns ingredientes, composições e suas estruturas antes e após a digestão (COLES; MOUGHAN; DARRAGH, 2005; HUR et al., 2011; PESSOA, 2016). A digestão pode variar de acordo com o tipo e quantidade de alimento ingerido e de acordo com o organismo de cada indivíduo (GONZÁLEZ-ARIAS et al., 2013).

O processo para simulação digestiva geralmente inclui a fase oral, fase gástrica e intestinal, levando em conta a presença e concentrações das enzimas digestivas, as concentrações de sais, o pH, o tempo de digestão e alguns outros fatores (MINEKUS et al., 2014). Algumas individualidades dependem das características da amostra (HUR et al., 2011). As características enzimáticas são os fatores mais importantes na digestão *in vitro*, sendo que alguns fatores afetam as atividades enzimáticas, como a temperatura, pH, estabilidade, ativadores e inibidores e tempo de incubação (KULKARNI et al., 2007).

Nesse contexto, o termo bioacessibilidade e biodisponibilidade são utilizados para representar a fração dos alimentos que podem ser utilizados nos processos metabólicos do organismo (MOTTA, 2015). A fração do nutriente, cedida pela matriz alimentícia que é absorvida durante a digestão, é considerada bioacessível (BENITO; MILLER, 1998). Assim, do total de nutrientes bioacessíveis no trato gastrointestinal, apenas uma fração é utilizada para funções fisiológicas ou como estoque do organismo, e esta é considerada a fração biodisponível (TOGNON, 2012).

O potencial nutricional dos alimentos, mais do que a soma de todos os nutrientes, deve estar correlacionado com a sua bioacessibilidade, biodisponibilidade no organismo e sua condição estrutural. Ao conectar esses fatores é possível interpretar quanto dos nutrientes ingeridos são absorvidos e utilizados pelo organismo (MOTTA, 2015).

Estudos com digestão *in vitro* fornecem resultados aliados à digestibilidade, degradação, bioacessibilidade, estabilidade e mudanças estruturais de compostos (HUR et al., 2011). A forma química do nutriente, as interações com os outros alimentos que são consumidos paralelamente e o processamento pré consumo são alguns dos fatores vinculados a bioacessibilidade e/ou biodisponibilidade dos nutrientes (GIBSON et al., 2006).

Há muitas metodologias utilizadas como modelo de digestão *in vitro*, essa não uniformização impossibilita a comparação de dados de forma precisa (MCCLEMENTS; LI, 2010; WILLIAMS et al., 2012). No presente estudo foi utilizado o método harmonizado, proposto dentro de um consenso pela rede COST Infogest, que padronizou condições fisiologicamente relevantes para que a reprodução de dados relacionados a bioacessibilidade de nutrientes e não nutrientes e digestibilidade de macronutrientes sejam mais comparáveis (MINEKUS et al., 2014).

6 Microscopia de alimentos

Anteriormente a técnica de microscopia óptica era utilizada apenas para identificar contaminações e adulterações. Atualmente sabe-se dos diversos benefícios de utilizar a técnica microscópica, sendo alguns dos objetivos verificar os principais componentes estruturais dos alimentos, identificar substâncias e organismos estranhos e elucidar as interferências nas propriedades dos alimentos (MOECKE; DE FRANCISCO, 1995; FERRANDO; SPIESS, 2000).

As mudanças moleculares e estruturais dos componentes do alimento tanto nos processos clássicos quanto nos novos são primordiais para controlar, explicar e conduzir os processamentos e produção de alimentos (AGUILERA, 1990; KALÁB; ALLAN-WOJTAS; MILLER, 1995).

Dentre as técnicas microscópicas mais utilizadas, há um destaque para a microscopia eletrônica de varredura (MEV) (MUNCK; DE FRANCISCO, 1989). Com a MEV é possível observar a superfície e profundidade dos compostos alimentícios em alta resolução. A fonte de iluminação é igual a do microscópio óptico, um filamento quente de tungstênio que produz luz e elétrons. As lentes são bobinas eletromagnéticas que projetam o feixe de elétrons, possibilitando que os elétrons percorram a amostra (MOECKE; DE FRANCISCO, 1995).

A técnica de microscopia de fluorescência e análise de imagem é uma alternativa para caracterizar a proteína e suas interações, a análise da composição botânica e o estudo do malte e brotação de cereais. (MUNCK; DE FRANCISCO, 1989; SHOTTON, 1989; HEPLER; GUNNING, 1998; LÓPEZ-BÁRON et al., 2017).

REFERÊNCIAS

ABBEY, B. W.; MARK-BALM, T. Nutritional quality of weaning foods prepared from composite flours of maize, ungerminated and germinated cowpea. **Nutrition Reports International**, v. 38, n. 3, p. 519-526, 1988.

ABITRIGO. Associação Brasileira da Indústria do Trigo. **O triticulor e o Mercado**. São Paulo, 2011. 44p. Disponível em: <http://abitrito.com.br/associados/arquivos/cartilha_triticulor.pdf>. Acesso em: 21 de fevereiro de 2017.

AGUDELO, M. A. H. **Estudo da bioacessibilidade *in vitro* (estática e dinâmica) de alguns metais de importância biológica em semente de soja transgênica e não transgênica**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Estadual de Campinas, 2015.

AGUILERA, J. M. D. W. **Stanley Microstructural principles of food processing & Engineering Elsevier Applied Science**. London & New York, 1990.

ALVAREZ-JUBETE, L.; WIJNGAARD, H.; ARENDT, E. K.; GALLAGHER, E. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 770-778, 2010.

AMICI, M.; BONFILI, L.; SPINA, M.; CECARINI, V.; CALZUOLA, I.; MARSILI, V.; ELEUTERI, A. M. Wheat sprout extract induces changes on 20S proteasomes functionality. **Biochimie**, v. 90, n. 5, p. 790-801, 2008.

ANDERSEN, G.; KOEHLER, P.; SOMOZA, V. Metabolic effects of bread fortified with wheat sprouts and bioavailability of ferulic acid from wheat bran. **Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention**, p. 507-517, 2011.

ANDERSON, J. W.; RANGLES, K. M.; KENDALL, C. W.; JENKINS, D. J. Carbohydrate and fiber recommendations for individuals with diabetes: a quantitative assessment and meta-analysis of the evidence.

Journal of the American College of Nutrition, v. 23, n. 1, p. 5-17, 2004.

BAZZANO, L. A.; HE, J.; OGDEN, L. G.; LORIA, C. M.; VUPPUTURI, S.; MYERS, L.; WHELTON, P. K. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 1, p. 93-99, 2002.

BECHTEL, D. B.; ZAYAS, I. N. N. A.; KALEIKAU, L. O. R. I.; POMERANZ, Y. Size-distribution of wheat starch granules during endosperm development. **Cereal Chemistry**, v. 67, n. 1, p. 59-63, 1990.

BENITO, P.; MILLER, D. Iron absorption and bioavailability: an updated review. **Nutrition Research**, v. 18, n. 3, p. 581-603, 1998.

BETHUNE, M. T.; KHOSLA, C. Oral enzyme therapy for celiac sprue. **Methods in Enzymology**, v. 502, p. 241, 2012.

BEWLEY, J. D. Seed germination and reserve mobilization. **Encyclopedia of Life Sciences Nature Publishing Group**, p. 1-7, 2001.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. Seeds. In: **Seeds**. Springer Us., p. 1-33, 1994.

BINGHAM, S. A.; DAY, N. E.; LUBEN, R.; FERRARI, P.; SLIMANI, N.; NORAT, T.; TJONNELAND, A. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. **The Lancet**, v. 361, n. 9368, p. 1496-1501, 2003.

BOISEN, S.; EGGUM, B. O. Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. **Nutrition Research Reviews**, v. 4, n. 01, p. 141-162, 1991.

BROUNS, F.; HEMERY, Y.; PRICE, R.; ANSON, N. M. Wheat aleurone: separation, composition, health aspects, and potential food

use. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 6, p. 553-568, 2012.

BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, n. 2, p. 85-112, 1998.

BUTTROSE, M. S. Ultrastructure of the developing aleurone cells of wheat grain. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 4, p. 768-774, 1963.

CASTRO-ANTUNES, M. M.; CROVELLA, S.; BRANDÃO, L. A. C.; GUIMARÃES, R. L.; MOTTA, M. E. F. A.; SILVA, G. A. P. D. Frequency distribution of HLA DQ2 and DQ8 in celiac patients and first-degree relatives in Recife, northeastern Brazil. **Clinics**, v. 66, n. 2, p. 227-231, 2011.

CHAMP, M.; FAISANT, N. Resistant starch: analytical and physiological aspects. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.1, p.37- 43, 1996.

CHEFTEL, J.; CHEFTEL, H. **Introducción a La Bioquímica y Tecnología de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1992, v.1, p. 99-134.

CHEFTEL, J.; CUQ, J.; LORIENT, D. **Proteínas Alimentarias: Bioquímica, Propiedades Funcionales, Valor Nutricional, Modificaciones Químicas**. Zaragoza: Acribia, 346 p., 1989.

CODEX ALIMENTARIUS. Codex standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten. **Codex Standard**, p. 118-1979, 2008.

COLES, L. T.; MOUGHAN, P. J.; DARRAGH, A. J. In vitro digestion and fermentation methods, including gas production techniques, as applied to nutritive evaluation of foods in the hindgut of humans and other simple-stomached animals. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123, p. 421-444, 2005.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**, Brasília, v.11, p.148, 2018b. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 02 ago 2018.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Análise mensal: Trigo**. Brasília, 2018a. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 13 mai 2018.

CORNELL, H.; HOVELING, A.W. **Wheat: Chemistry and Utilization**. Ed: Technomic Publishing: Lancaster. p. 327-373, 1997.

CUNHA, A. F. **Análise do perfil de compostos fenólicos e da atividade antioxidante em sementes de trigo *Triticum aestivum* L. e de cevada *Hordeum vulgare* em diferentes estágios de germinação**. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2014.

CURTIS, B. C.; RAJARAM, S.; MACPHERSON, H. G. Bread Wheat – Improvement and Production. **FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations – Plant Production and Protection Series**, Roma, n. 30, 2002.

DA MOTTA, C. A. F. A. **Pseudocereais como ingredientes de formulações destinadas a uma alimentação especial**. Porto, 2015. 256 f. Tese (Doutorado em Nutrição Clínica). Faculdade de Ciências da Nutrição, Universidade do Porto, Portugal.

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

DELCOUR, J.; HOSENEY, R. C. **Principles of Cereal Science and Technology**. 2010.

DERERA, N. F. The effects of preharvest rain. **Preharvest Sprouting in Cereals**, p. 2–14. CRC Press Inc., Boca Raton, USA, 1989.

DONKOR, O. N.; STOJANOVSKA, L.; GINN, P.; ASHTON, J.; VASILJEVIC, T. Germinated grains–Sources of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 950-959, 2012.

DREA, S.; LEADER, D.J.; ARNOLD, B.C.; SHAW, P.; DOLAN, L.; DOONAN, J.H. Systematic spatial analysis of gene expression during wheat caryopsis development. **The Plant Cell**, v. 17, n. 8, p. 2172-2185, 2005.

DZIKI, D.; GAWLIK-DZIKI, U.; KORDOWSKA-WIATER, M.; DOMAN-PYTKA, M. Influence of elicitation and germination conditions on biological activity of wheat sprouts. **Journal of Chemistry**, v. 2015, 2015.

EL-KHAYAT, G. H.; SAMAAN, J.; MANTHEY, F. A.; FULLER, M. P.; BRENNAN, C. S. Durum wheat quality I: some physical and chemical characteristics of Syrian durum wheat genotypes. **International Journal of Food Science and Technology**, v.41, supplement 2, p. 22-29, 2006.

ENGLYST, H. N.; KINGMAN, S.M.; CUMMINGS, J.H. Classificação e medição de frações de amido nutricionalmente importantes. **Revista Européia de Nutrição Clínica**, v. 46, p. S33-50, 1992.

EURESTA, Resistant starch Proceedings from the second plenary meeting of EURESTA: European FLAIR Concerted Action n° 11 on physiological implications of the consumption of resistant starch in man. **European Journal Clinical Nutrition**, 1992.

EVERS, T.; MILLAR, S. Cereal grain structure and development: some implications for quality. **Journal of Cereal Science**, v. 36, n. 3, p. 261-284, 2002.

EVERSOLE, K.; FEUILLET, C.; MAYER, K.F.; ROGERS, J. Slicing the wheat genome. **Science**, v. 345, n. 6194, p. 285-287, 2014.

FAO. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Agricultura brasileira: perspectivas e Desafios. **Perspectivas Agrícolas no Brasil: Desafios da Agricultura Brasileira 2015-2024**. 2015. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/download/PA20142015CB.pdf>>. Acesso em: 18 de janeiro de 2017.

FAOSTAT. Statistical databases. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2018. Disponível em:

<<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 12 de março de 2018.

FARDET, A. New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: what is beyond fibre? **Nutrition Research Reviews**, v. 23, n. 01, p. 65-134, 2010.

FASANO, A.; SAPONE, A.; ZEVALLOS, V.; SCHUPPAN, D. Nonceliac gluten sensitivity. **Gastroenterology**, v. 148, n. 6, p. 1195-1204, 2015.

FERRANDO, M.; SPIESS, W. E. L. Review: confocal scanning laser microscopy. A powerful tool in food science revision: microscopía láser confocal de barrido. Una potente herramienta en la ciencia de los alimentos. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v. 6, n. 4, p. 267-284, 2000.

FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação, do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p. 323, 2004.

FILHO, J. M. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Fealq, 2005.

GAO, F.; RAMPITSCH, C.; CHITNIS, V.R.; HUMPHREYS, G.D.; JORDAN, M.C.; AYELE, B.T. Integrated analysis of seed proteome and mRNA oxidation reveals distinct post-transcriptional features regulating dormancy in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Biotechnology Journal**, v. 11, n. 8, p. 921-932, 2013.

GHAVIDEL, R.A.; PRAKASH, J. The impact of germination and dehulling on nutrients, antinutrients, in vitro iron and calcium bioavailability and in vitro starch and protein digestibility of some legume seeds. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, n. 7, p. 1292-1299, 2007.

GIBSON, R. S.; PERLAS, L.; HOTZ, C. Improving the bioavailability of nutrients in plant foods at the household level. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 65, n. 2, p. 160-168, 2006.

GOESAERT, H.; BRIJS, K.; VERAVERBEKE, W. S.; COURTIN, C. M.; GEBRUERS, K.; DELCOUR, J. A. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 1-3, p. 12-30, 2005.

GOÑI, I.; GARCIA-DIZ, L.; MAÑAS, E.; SAURA-CALIXTO, F. Analysis of resistant starch: a method for foods and food products. **Food Chemistry**, v.56, p.445-449, 1996.

GONZÁLEZ-ARIAS, C. A; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J. Mycotoxin bioaccessibility/absorption assessment using in vitro digestion models: a review. **World Mycotoxin Journal**, v. 6, n. 2, p. 167-184, 2013.

GUAJARDO-FLORES, D.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative activities of extracted saponins and flavonols from germinated black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1497-1503, 2013.

HADDAD, Y.; BENET, J. C.; DELENNE, J. Y.; MERMET, A.; ABECASSIS, J. Rheological behaviour of wheat endosperm - proposal for classification based on the rheological characteristics of endosperm test samples. **Journal of Cereal Science**, v. 34, n.1, p. 105-113, 2001.

HALBMAYR-JECH, E.; HAMMER, E.; FIELDER, R.; COUTTS, J.; ROGERS, A.; CORNISH, M.. Characterization of G12 sandwich ELISA, a next-generation immunoassay for gluten toxicity. **Journal of AOAC International**, v. 95, n. 2, p. 372-376, 2012.

HAMER, R. J. Chapter IV Gluten. In: **Progress in Biotechnology**. Elsevier, 2003. p. 87-131.

HARALAMPU, S.G. Resistant starch – a review of the physical properties and biological impact of RS3. **Carbohydrate Polymers**, v.41, p.285-292, 2000.

HEMERY, Y.; LULLIEN-PELLERIN, V.; ROUAU, X.; ABECASSIS, J.; SAMSON, M. F.; ÅMAN, P.; BARRON, C. Biochemical markers: efficient tools for the assessment of wheat grain tissue proportions in milling fractions. **Journal of Cereal Science**, v. 49, n. 1, p. 55-64, 2009.

HENSON, C. A.; DUKE, S. H. A comparison of standard and nonstandard measures of malt quality. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 66, n. 1, p. 11-19, 2008.

HEPLER, P. K.; GUNNING, B. E. Confocal fluorescence microscopy of plant cells. **Protoplasma**, v. 201, n. 3-4, p. 121-157, 1998.

HERMAN, E.M. ; LARKINS, B. A. Protein storage bodies and vacuoles. **The Plant Cell**, v.11, p. 601-613, 1999.

HERRERA, M. G. **Elucidación de la auto-organización de la proteína gliadina y su péptido 33-mer *in vitro***. Argentina, 2016. Tese (Doutorado em Química) – Universidad Nacional del Sur, Argentina.

HOSENEY, R.C. **Principios de Ciencia y Tecnología de los Cereales**. Zaragoza: Acribia, 1991. IX, 321p. ISBN 842000703X (Broch.).

HOSHIKAWA, K. Anthesis, fertilization and development of caryopsis. **Science of the Rice Plant**, v. 1, n. Part III, p. 339-376, 1993.

HUANG, S.; SIRIKHACHORNKIT, A.; SI, X.; FARIS, J.; GILL, B.; HASELKORN, R.; GORNICKI, P. Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the Triticum/Aegilops complex and the evolutionary history of polyploid wheat. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 12, p. 8133-8138, 2002.

HUANG, N.; SUTLIFF, T. D.; LITTS, J.C.; RODRIGUEZ, R. L. Classification and characterization of the rice α -amylase multigene family. **Plant Molecular Biology**, v. 14, n. 5, p. 655-668, 1990.

HUR, S. J.; LIM, B. O.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. *In vitro* human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 1-12, 2011.

HWANG, P.; BUSHUK, W. Some changes in the endosperm proteins during sprouting of wheat. **Cereal Chemistry**, 1973.

INTERNATIONAL GRAINS COUNCIL. **Grain Market Report**. International Grains Council, 2015.

JOHANSSON, E.; MALIK, A. H.; HUSSAIN, A.; RASHEED, F.; WILLIAM, R.; NEWSON, W. R.; PLIVELIC, T.; HEDENQVIST, M. S.; GÄLLSTEDT, M.; KUKTAITE1, R. Wheat gluten polymer structures: the impact of genotype, environment, and processing on their functionality in various applications. **Cereal Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 367-376, 2013.

KAKEFUDA, G.; DUKE, S. H.; HOSTAK, M. S. Chloroplast and extrachloroplastic starch-degrading enzymes in *Pisum sativum* L. **Planta**, v. 168, n. 2, p. 175-182, 1986.

KALÁB, M.; ALLAN-WOJTAS, P.; MILLER, S. S. Microscopy and other imaging techniques in food structure analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 6, p. 177-186, 1995.

KASARDA, D.D.; BERNARDIN, J.E.; QUALSET, C.O. Relationship of gliadin protein components to chromosomes in hexaploid wheats (*Triticum aestivum* L.). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, n. 10, p. 3646-3650, 1976.

KHADKA, P. **Proteomics Study of Pre-Harvest Sprouting in Wheat**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – South Dakota State University, EUA, 2016.

KHAN, K.; SHEWRY, P. R. (Ed.). **Wheat: chemistry and technology**. 4th ed. St. Paul, Minn.: AACC International, 2009. 467 p. ISBN 9781891127557.

KHOLE, S.; CHATTERJEE, S.; VARIYAR, P.; SHARMA, A.; DEVASAGAYAM, T. P. A.; GHASKADBI, S. Bioactive constituents of germinated fenugreek seeds with strong antioxidant potential. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 270-279, 2014.

KOEHLER, P.; HARTMANN, G.; WIESER, H.; RYCHLIK, M. Changes of folates, dietary fiber, and proteins in wheat as affected by germination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 4678-4683, 2007.

KOSSMANN, J.; LLOYD, J. Understanding and influencing starch biochemistry. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, n. 3, p. 171-226, 2000.

KULKARNI, S. D.; ACHARYA, R.; RAJURKAR, N.S.; REDDY, A.V.R. Evaluation of bioaccessibility of some essential elements from wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) by *in vitro* digestion method. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 681-688, 2007.

KUNTZ, R. J.; BAMFORTH, C. W. Time course for the development of enzymes in barley. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 113, n. 2, p. 196-205, 2007.

LABORIAU, L. G. A germinação das sementes: programa regional de desenvolvimento científico e tecnológico. **Washington: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos**, 1983.

LAFIANDRA, D.; MACRITCHIE, F. Structure function relationships of wheat proteins. **Food Proteins and their Applications**. Marcel Dekker, New York, USA, p. 293-324, 1997.

LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. **Carboidratos en alimentos regionales Iberoamericanos**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006. 648p.

LÉON, A. E. **De Tales Harinas, Tales Panes: Granos, Harinas y Productos de Panificación em Iberoamérica**. Córdoba: Hugo Báez, 2007, 473p.

LIN, P.; LAI, H. Bioactive compounds in legumes and their germinated products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 11, p. 3807-3814, 2006.

LINDEBOOM, N.; CHANG, P. R.; TYLER, R. T. Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review. **Starch-Stärke**, v. 56, n. 3-4, p. 89-99, 2004.

LÓPEZ VILLAR, E.; LLORENTE GÓMEZ, M. M.; MÉNDEZ CORMÁN, E. Method for extracting gluten contained in heat-processed and non-heat-processed foodstuffs, compatible with an enzyme-linked immunosorbent assay, composition and kits comprising said composition. 2002. Acesso em: 12 de março de 2018. URL: <<http://hdl.handle.net/10261/2706>>

LÓPEZ-BARÓN, N.; GU, Y.; VASANTHAN, T.; HOOVER, R. Plant proteins mitigate *in vitro* wheat starch digestibility. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 19-27, 2017.

LORENZ, K.; VALVANO, R. Functional characteristics of sprout-damaged soft white wheat flours. **Journal of Food Science**, v. 46, p. 1018-1020, 1981.

LUKOW, O. M.; BUSHUK, W. Influence of germination on wheat quality. I. Functional (breadmaking) and biochemical properties. **Cereal Chemistry**, 1984.

MARCUSSEN, T.; SANDVE, S.R.; HEIER, L.; WULFF, B.B.; STEUERNAGELL, B.; MAYER, K.F.; OLSEN, O.A. A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. **Science**, v. 345, p. 1250092-1250092, 2014.

MARERO, L. M.; PAYUMO, E.M.; AGUINALDO, A.R.; MATSUMOTO, I.; HOMMA, S. Antinutritional factors in weaning foods prepared from germinated cereals and legumes. **Lebensmittel Wissenschaft Technologie**, v. 24, n. 2, p. 177-181, 1991.

MCCLEMENTS, D. J.; LI, Y. Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. **Food & Function**, v. 1, n. 1, p. 32-59, 2010.

MEREDITH, P.; POMERANZ, Y., **Sprouted Grain**. In *Advances in Cereal Science and Technology*, Pomeranz, Y., Ed.; AACC: St. Paul, v. 7, p. 239-320, 1985.

MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALLANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIEU, C.; CARRIERE, F.; BOUTROU, R.; CORREDIG, M.; DUPONT, D.; DUFOUR, C.; EGGER, L.;

GOLDING, M.; KARAKAYA, S.; KIRKHUS, B.; LE FEUNTEUN, S.; LESMES, U.; MACIERZANKA, A.; MACKIE, A.; MARZE, S.; MCCLEMENTS, D. J.; M'ENARD, O.; RECIO, I., SANTOS, C. N.; SINGH, R. P.; VEGARUD, G. E.; WICKHAM, M. S. J.; WEITSCHIES, W.; BRODKORB, A. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. **Food & Function**, v. 5, n. 6, p. 1113-1124, 2014.

MÓDENES, A.N.; SILVA, A.M. da; TRIGUEROS, D.E.G. Avaliação das propriedades reológicas do trigo armazenado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, p.508-512, 2009.

MOECKE, E. H. S.; DE FRANCISCO, A. **Curso de Microscopia – Introdução à Microscopia de Alimentos: Isolamento e Detecção de Substâncias Estranhas e Identificação de Microestruturas Vegetais**. Florianópolis, 1995. 57 p.

MORÓN, B.; CEBOLLA, A.; MANYANI H.; ÁLVAREZ-MAQUEDA, M.; MEGÍAS, M.; THOMAS, M. C.; LÓPEZ, M. C.; SOUSA, C. Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 2, p. 405-414, 2008.

MUIR, J.G.; O'DEA, K. Measurement of resistant starch: factors affecting the amount of starch escaping digestion *in vitro*. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.56, p.123-127, 1992.

MUNCK, L; DE FRANCISCO, A. **Fluorescence Analysis in Foods**. Longman Scientific & Technical, p.289, 1989.

MUNTZ, K.; BWLOZERSKY, M.A.; DUNAEVSKY, Y.E.; SCHLERETH, A.; TIEDEMANN, J. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 1741-1752, 2001.

MUSLIN, E. H.; KARPELENIA, C. B.; HENSON, C. A. The impact of thermostable α -glucosidase on the production of fermentable sugars

during mashing. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 61, n. 3, p. 142-145, 2003.

NARINA, S. S.; HAMAMA, A. A.; BHARDWAJ, H. L. Nutritional and mineral composition of flax sprouts. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 11, p. 60, 2012.

NESBITT, M.; SAMUEL, D. From staple crop to extinction? The archaeology and history of the hulled wheats. **Hulled wheats**, v. 4, p. 41-102, 1996.

NODA, T.; TAKIGAWA, S.; MATSUURA-ENDO, C.; SAITO, K.; TAKATA, K.; TABIKI, T.; WICKRAMAINGHE, H. A. M.; YAMAUCHI, H. The physicochemical properties of partially digested starch from sprouted wheat grain. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 3, p. 271-277, 2004.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination - still a mystery. **Plant Science**, v. 179, n. 6, p. 574-581, 2010.

OLAERTS, H.; ROYE, C.; DERDE, L. J.; SINNAEVE, G.; MEZA, W. R.; BODSON, B.; COURTIN, C. M. Impact of Preharvest Sprouting of Wheat (*Triticum aestivum*) in the Field on Starch, Protein, and Arabinoxylan Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 44, p. 8324-8332, 2016.

OLÁN, M. De la O.; RANGEL, E.E.; MIR, H.E.V.; GALÁN, J.D.M.; SÁNCHEZ, H.L.; VARELA, A.S.; BAUTISTA, R.J.P. Proteínas del gluten y reología de trigos harineros mexicanos influenciados por factores ambientales y genotípicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.989-996, 2010.

OSBORNE, T.B. **The Vegetable Proteins**. Longmans, Green And Co; London, 1924.

OSMAN, A.A., UHLIG, H.H.; VALDES, I.; AMIN, M.; MÉNDEZ, E.; MOTHES, T. A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 13, n. 10, p. 1189-1193, 2001.

PAJAK, P.; SOCHA, R.; GALKOWSKA, D.; ROZNOWSKI, J.; FORTUNA, T. Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. **Food Chemistry**, v. 143, p. 300-306, 2014.

PÉREZ, S.; BERTOFT, E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. **Starch-Stärke**, v. 62, n. 8, p. 389-420, 2010.

PESSOA, M.F.M. **Digestibilidade *in vitro* vs Digestibilidade *in vivo*: Aplicação a Regimes Alimentares de Monogástricos**. Tese de Doutorado - Universidade de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária, 2016, Portugal.

PETERSEN, G.; SEBERG, O.; YDE, M.; BERTHELSEN, K. Phylogenetic relationships of Triticum and Aegilops and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 39, n. 1, p. 70-82, 2006.

PLAZA, L.; DE ANCOS, B.; CANO, P. M. Nutritional and health-related compounds in sprouts and seeds of soybean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum*. L) and alfalfa (*Medicago sativa*) treated by a new drying method. **European Food Research and Technology**, v. 216, n. 2, p. 138-144, 2003.

POPPER, L.; SCHÄFER, W.; FREUND, W. (Ed.). **Future of Flour: A Compendium of Flour Improvement**. AgriMedia, 2006.

PRICE, T. V. Seed sprout production for human consumption - A review. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 21, n. 1, p. 57-65, 1988.

PUENTE, X.S.; SÁNCHEZ, L.M.; OVERALL, C.M.; LÓPEZ-ÓTIN, C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 7, p. 544-558, 2003.

QUAGLIA, G. **Ciencia y Tecnología de la Panificación**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1991. 485 p.

QUESADA, V.; ORDONEZ, G.R.; SANCHEZ, L.M.; PUENTE, X.S.; LÓPEZ-OTÍN, C. The Degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n.1, p. D239-D243, 2009.

RAWLINGS, N.D.; WALLER, M.; BARRETT, A.J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D503-D509, 2014.

REBELLO, C.J.; GREENWAY, F.L.; FINLEY, J.W. Whole grains and pulses: a comparison of the nutritional and health benefits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 29, p. 7029-7049, 2014.

REINIKAINEN, T.; LANTTO, R.; NIKU-PAAVOLA, M. L.; BUCHERT, J. Enzymes for cross-linking of cereal polymers. **Recent advances in enzymes in grain processing**, p. 91-99, 2003

RIZZA, D.M.; DELLAVALLE, P.D.; VAZQUEZ, D.; CASTRO, M. Improved resolution of nonsilica-based size-exclusion HPLC column for wheat flour protein analyses. **Cereal Chemistry**, v. 82, n. 3, p. 287-289, 2005.

SALAS-PÉREZ, L.; GAUCÍN-DELGADO, J. M.; PRECIADO-RANGEL, P.; FORTIS-HERNÁNDEZ, M.; VALENZUELA-GARCÍA, J. R.; AYALA-GARAY, A. V. Efecto del ácido benzoico en la capacidad antioxidante de germinados de trigo. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, n. 17, p. 3397-3404, 2016.

SANGRONIS, E.; MACHADO, C.J. Influence of germination on the nutritional quality of Phaseolus vulgaris and Cajanus cajan. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 116-120, 2007.

SAPONE, A.; BAI, J. C.; CIACCI, C.; DOLINSEK, J.; GREEN, P. H.; HADJIVASSILIOU, M.; ULLRICH, R. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. **BMC Medicine**, v. 10, n. 1, p. 13, 2012.

SCARDONE, D.; FORLANI, F.; CERLETTI, P. Aecessibility of Amino Groups in Gluten Proteins Studied by a Combination of Chemical

Labeling and Immunochemical Detection. **Cereal Chemistry**, v. 77, n. 5, p. 602-606, 2000.

SCHERF, K. A.; KOEHLER, P.; WIESER, H. Gluten and wheat sensitivities—an overview. **Journal of Cereal Science**, v. 67, p. 2-11, 2016.

SCHEUER, P. M. **Caracterização de cultivares brasileiras de trigo com indicação de aplicabilidade tecnológica**. Florianópolis, 2009. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

SCHEUER, P. M.; DE FRANCISCO, A.; MIRANDA, M.D.; LIMBERGER, V.M. Trigo: Características e utilização na panificação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 13, n. 2, p. 211-222, 2011.

SHAN, L.; MOLBERG, O.; PARROT, I.; HAUSCH, F.; FILIZ, F.; GRAY, G.M.; KHOSLA, C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. **Science**, v. 297, n. 5590, p. 2275-2279, 2002.

SHAO, Y. Y.; TSENG, Y. H.; CHANG, Y. H.; LIN, J. H.; LI, C. Y. Rheological properties of rice amylose gels and their relationships to the structures of amylose and its subfractions. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1324-1329, 2007.

SHEWRY, P. R.; CASEY, R. **Seed Protein**. Dordecht: Kluwer Academic Publ. p. 883, 1999.

SHEWRY, P. Wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 6, p. 1537-1553, 2009.

SHOTTON, D. M. Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens. **Journal of Cell Science**, v. 94, n. 2, p. 175-206, 1989.

SIBIAN, M.S.; SAXENA, D.C.; RIAR, C.S. Effect of germination on chemical, functional and nutritional characteristics of wheat, brown rice and triticale: A comparative study. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2017.

SIMSEK, S.; OHM, J. B.; LU, H.; RUGG, M.; BERZONSKY, W.; ALAMRI, M. S.; MERGOUM, M. Effect of pre-harvest sprouting on physicochemical changes of proteins in wheat. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 2, p. 205-212, 2014.

SUN, Z.; DUKE, S. H.; HENSON, C. A. The role of pea chloroplast [alpha]-glucosidase in transitory starch degradation. **Plant Physiology**, v. 108, n. 1, p. 211-217, 1995.

SUN, Z.; HENSON, C. A. A quantitative assessment of the importance of barley seed α -amylase, β -amylase, debranching enzyme, and α -glucosidase in starch degradation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 284, n. 2, p. 298-305, 1991.

SUN, Z.; HENSON, C. A. Degradation of native starch granules by barley α -glucosidases. **Plant Physiology**, v. 94, n. 1, p. 320-327, 1990.

SUTLIFF, T. D.; HUANG, N.; LITTS, J.C.; RODRIGUEZ, R.L. Characterization of an α -amylase multigene cluster in rice. **Plant Molecular Biology**, v. 16, n. 4, p. 579-591, 1991.

SWIECA, M.; DZIKI, D.; GAWLIK-DZIKI, U. Starch and protein analysis of wheat bread enriched with phenolics-rich sprouted wheat flour. **Food Chemistry**, v. 228, p. 643-648, 2017.

SWIECA, M.; GAWLIK-DZIKI, U.; KOWALCZYK, D.; ZLOTEK, U. Impact of germination time and type of illumination on the antioxidant compounds and antioxidant capacity of *Lens culinaris* sprouts. **Scientia Horticulturae**, v. 140, p. 87-95, 2012.

TOGNON, A. L. **Quantificação e avaliação da bioacessibilidade *in vitro* de micro e macroelementos em frutas, hortaliças e cereais**. São Paulo, 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Químicas). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

TORTORA, G.J.; DERRICKSON, B.H. **Principles of Anatomy and Physiology**. John Wiley & Sons, p. 922, 2008.

TROCCOLI, A.; BORRELLI, G.M.; DE VITA, P.; FARES, C.; DI FONZO, N. Mini review: durum wheat quality: a multidisciplinary concept. **Journal of Cereal Science**, v. 32, n. 2, p. 99-113, 2000.

USDA. 2014. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>>. Acesso em: 22 fevereiro de 2017.

USDA. 2018. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. World agricultural production. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/world-agricultural-production>>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2018.

VAN HUNG, P.; MAEDA, T.; MORITA, N. Improvement of nutritional composition and antioxidant capacity of high-amylose wheat during germination. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 6756-6762, 2015.

VAN HUNG, P.; MAEDA, T.; YAMAMOTO, S.; MORITA, N. Effects of germination on nutritional composition of waxy wheat. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 3, p. 667-672, 2012.
WALBOT, V. Overview of key steps in aleurone development. In: **The Maize Handbook**. Springer New York, 1994. p. 78-80.

WAN, Y.; SHEWRY, P. R.; HAWKESFORD, M. J. A novel family of γ -gliadin genes are highly regulated by nitrogen supply in developing wheat grain. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 1, p. 161-168, 2013.

WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 115-119, 2007.

WIESER, H.; KOEHLER, P. Detoxification of gluten by means of enzymatic treatment. **Journal of AOAC International**, v. 95, n. 2, p. 356-363, 2012.

WIESER, H.; KOEHLER, P. The biochemical basis of celiac disease. **Cereal Chemistry**, v. 85, n. 1, p. 1-13, 2008.

WILLIAMS, H. D.; ANBY, M. U.; SASSENE, P.; KLEBERG, K.; BAKALA-NGOMA, J. C.; CALDERONE, M.; PORTER, C. J. H. Toward the establishment of standardized *in vitro* tests for lipid-based formulations. 2. The effect of bile salt concentration and drug loading on the performance of type I, II, IIIA, IIIB, and IV formulations during *in vitro* digestion. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 11, p. 3286-3300, 2012.

YUE, P.; WARING, S. Resistant starch in food applications. **Cereal Food World**, v.43, n.9, p.690-695, 1998.

ZHANG, Y.; SHI, R.; REZAUL, K. M.; ZHANG, F.; ZOU, C. Iron and zinc concentrations in grain and flour of winter wheat as affected by foliar application. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 23, p. 12268-12274, 2010.

ZIEGLER, P. Cereal beta-amylases. **Journal of Cereal Science**, v. 29, p. 195-204, 1999.

ZILIĆ, S.; BASIĆ, Z.; HADŽI-TAŠKOVIĆ, Š. V.; MAKSIMOVIĆ, V.; JANKOVIĆ, M.; FILIPOVIĆ, M. Can the sprouting process applied to wheat improve the contents of vitamins and phenolic compounds and antioxidant capacity of the flour?, **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 4, p. 1040-1047, 2014.

ZILIC, S.; JANKOVIC, M.; BARAC, M.; PESIC, M.; KONIC-RISTIC, A.; SUKALOVIC, V. H. T. Effects of enzyme activities during steeping and sprouting on the solubility and composition of proteins, their bioactivity and relationship with the bread making quality of wheat flour. **Food & Function**, v. 7, n. 10, p. 4323-4331, 2016.

ZOBEL, H. F. Molecules to granules: a comprehensive starch review. **Starch-Stärke**, v. 40, n. 2, p. 44-50, 1988.

ZOU, C. Q.; RASHID, A.; RAM, H.; SAVASLI, E.; ARISOY, R. Z.; HASSAN, M. Biofortification of wheat with zinc through zinc fertilization in seven countries. **Plant and Soil**, v. 361, n. 1-2, p. 119-130, 2012.

CAPÍTULO 2 –
EFEITO DA GERMINAÇÃO NO AMIDO, PROTEÍNA E
DIGESTIBILIDADE DO TRIGO

RESUMO

As sementes de trigo foram submetidas ao processo de germinação em rolo de papel a 22 °C na ausência de luz. As raízes seminais, coleóptilo e radículas foram removidas e o grão analisado quanto ao conteúdo de amido e proteína. Durante as 60 h de germinação houve um aumento das enzimas amilases e consequente redução no teor de amido total. A degradação do amido foi iniciada no endosperma em direção ao pericarpo e a região do embrião preservada. O amido de trigo da variedade analisada apresentou boa digestibilidade quando submetido a digestão *in vitro*, porém, o tempo de germinação não alterou a digestibilidade do mesmo. Quanto a proteína total houve uma redução no processo germinativo, assim como glúten, que reduziu cerca de 50 %. A germinação em 6, 12 e 24 h foi eficaz no aumento da digestibilidade proteica em relação aos grãos não germinados.

Palavras-chave: Germinação. Cereal. Digestão *in vitro*. Enzimas hidrolíticas.

ABSTRACT

The seeds of wheat were submitted to the germination process in paper roll at 22 °C in the absence of light. Seminal, coleoptile and root roots were removed and the grain analyzed for starch and protein content. During the 60 hours of germination there was an increase of the amylases enzymes and consequent reduction in the total starch content. The degradation of the starch was initiated in the endosperm towards the pericarp and the region of the preserved embryo. The wheat starch of the analyzed variety showed good digestibility when submitted to *in vitro* digestion, however, the germination time did not alter the digestibility of the same. As for total protein there was a reduction in the germination process, as well as gluten, which reduced by about 50 %. Germination at 6, 12 and 24 hours was effective in increasing protein digestibility in relation to non-germinated grains.

Keywords: Sprout. Gluten. Cereal. Digestion *in vitro*. Hydrolytic enzymes.

1 INTRODUÇÃO

A palavra trigo vem do latim *triticum*, que pode ser utilizada para referir-se tanto à planta quanto às sementes (LÉON, 2007). O trigo pertence à família Poaceae (Gramineae) e é difundido mundialmente, sendo considerado um dos cereais mais importantes do mundo e utilizado por 30 % da população. Sua riqueza nutricional é proveniente das proteínas, carboidratos e minerais (MARCUSSEN et al., 2014; KHADKA, 2016).

O endosperma corresponde a maior parte botânica deste cereal, atingindo de 84 a 89 % do grão. É constituído de matriz proteica, com proteínas funcionais e nutricionais, e grande quantidade de grânulos de amido (QUAGLIA, 1991; HADDAD et al., 2001; EVERS; MILLAR, 2002; KHADKA, 2016). As proteínas são macromoléculas biológicas importantes do ponto de vista nutricional. Quando a quantidade proteica é alterada, as composições relativas devem ser avaliadas, a quantidade das proteínas fisiologicamente ativas (albuminas e globulinas) tendem a aumentar com o conteúdo proteico (HOSENEY, 1991).

A germinação é um processo onde há emergência de parte da planta em algum tipo de substrato ou quando parte do embrião emerge dentro dos envoltórios (FERREIRA; BORGHETTI, 2004). O desenvolvimento da semente acarreta divisão celular e expansão das células individuais, essas alterações são iniciadas com a presença de água, onde há ativação enzimática, transporte e solubilização de reservas (LABOURIAU, 1983; FILHO, 2005). No início da germinação as proteínas de reserva são utilizadas para o desenvolvimento da plântula, suprindo com os aminoácidos necessários, produzindo substâncias de substratos respiráveis ou participando de outros processos (LABOURIAU, 1983; FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

Durante o desenvolvimento das sementes a qualidade nutricional e nutracêutica aumentam devido as alterações que ocorrem no perfil químico dos grãos (DONKOR et al., 2012; SWIECA et al., 2012; PAJAK et al., 2014). Além dessas alterações químicas, a ingestão dos germinados de forma integral resulta em benefícios para a saúde, como prevenção de doenças crônicas, cardiovasculares, câncer de cólon e diabetes (BAZZANO et al., 2002; BINGHAM et al., 2003; ANDERSON et al., 2004).

Em países orientais e europeus o consumo de cereais germinados é crescente pelos seus benefícios à saúde, esse aumento no consumo de grãos germinados também é vinculado a tendência por alimentos

nutritivos e com propriedades funcionais (NARINA; HAMAMA; BHARDWAJ, 2012; SALAS-PÉREZ et al., 2014). Os componentes pró-saúde podem ser influenciados pelas características da produção, qualidade dos grãos e condições germinativas (FARDET, 2010; ANDERSEN; KOEHLER; SOMOZA, 2011; DZIKI et al., 2015).

A digestão humana é um processo onde os alimentos ingeridos são transformados em moléculas menores mediante a aplicação de força física e química (TORTORA; DERRICKSON, 2008). Essas moléculas são absorvidas pelas células e destinadas ao crescimento, manutenção das células e energia para o corpo (TORTORA; DERRICKSON, 2008; GUERRA et al., 2012). Para analisar as mudanças estruturais, biodisponibilidade e digestibilidade dos alimentos alguns pesquisadores vêm utilizando métodos de digestão *in vitro* (HUR et al., 2011).

Os métodos de digestão simulados podem conter a fase oral, gástrica, intestino delgado e intestino grosso. O objetivo dessas metodologias é simular as condições fisiológicas *in vivo*, considerando as enzimas digestivas e suas concentrações, pH, tempo de digestão, condições dos sais e outros fatores (MINEKUS et al., 2014). Com a digestão *in vitro* é possível avaliar parâmetros como bioacessibilidade de nutrientes e não nutrientes e a digestibilidade dos macronutrientes (MINEKUS et al., 2014). Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações químicas no amido e proteína durante diferentes tempos de germinação controlada do grão de trigo, relacionar essas alterações com as mudanças na estrutura do cereal e verificar a bioacessibilidade amilácea e proteica nos grãos germinados por meio da digestão *in vitro*.

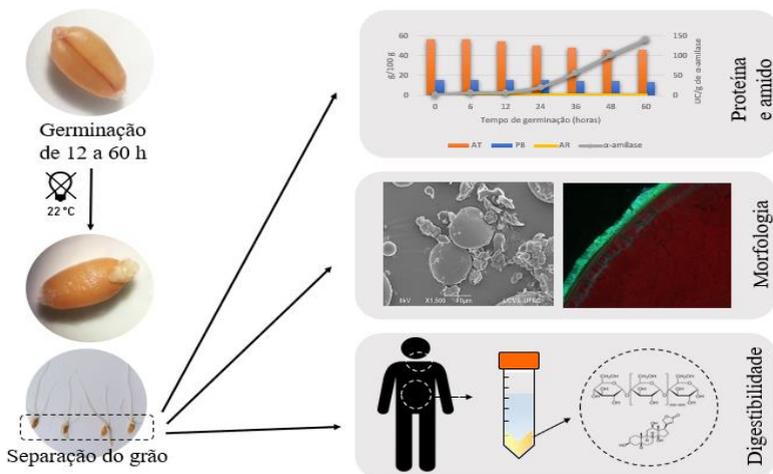
2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Para a realização do trabalho utilizou-se os grãos de trigo (*Triticum aestivum* L.) cultivar BRS Graúna, obtido através da Embrapa Londrina, Paraná, Brasil (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária).

Dentre os reagentes utilizados para o estudo, os kits enzimáticos para determinação de amido total, amido resistente e ceralpha, foram obtidos da Megazyme Internacional Ireland. Para a determinação de glúten foi utilizado o AgraQuant Gluten Assay (Romer Labs, Áustria). Para melhor visualização dos parâmetros avaliados neste estudo, criou-se um esquema apresentado na Figura 9.

Figura 9. Esquema representativo dos principais pontos abordados na pesquisa



Fonte: A autora (2018).

2.2 Métodos

2.2.1 Processo de germinação das sementes

As amostras de trigo foram armazenadas em temperatura ambiente antes da germinação. Todas as sementes quebradas e

danificadas foram removidas. As sementes de trigo selecionadas foram imersas em hipoclorito de sódio 1 % (v/v) durante 10 min, drenadas e lavadas sequencialmente com água destilada até pH neutro (SWIECA; DZIKI, 2015). A embebição ocorreu em água deionizada na proporção 1:10 (m/v) (PAJAK et al., 2014) por 6 horas (SWIECA; DZIKI, 2015). Os procedimentos para germinação foram realizados de acordo com Swieca e Dziki (2015).

A germinação foi realizada em rolo de papel Germitest previamente umedecido com água destilada 1:3 (m/v). Cada rolo foi composto por 150 sementes distribuídas em três substratos de papeis, totalizando cinco rolos por tempo de germinação pré-determinados. Sequencialmente as amostras foram inseridas em câmara de germinação (Mangelsdorf, De Leo) a temperatura de 22 °C na ausência de luz (BRASIL, 2009). As coletas foram realizadas a cada 12 horas no total de 60 horas, sendo que os cinco rolos de cada período de germinação foram misturados para melhor uniformização das amostras. Os procedimentos utilizados para a germinação estão representados na forma de esquema (Figura 10). As plântulas danificadas, deformadas ou deterioradas foram descartadas, plântulas com desenvolvimento satisfatório foram selecionadas para as análises.

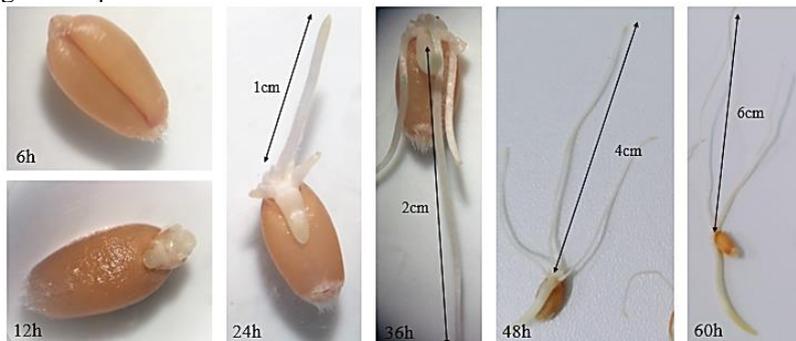
Figura 10. Representação dos procedimentos para germinação do trigo



Fonte: A autora (2018).

As amostras de trigo antes do embebibimento e germinação foram consideradas como controle, denominadas como 0h. Amostras após o período de embebibimento, 6h. Amostras coletadas após a técnica de germinação são mencionadas como 12h, 24h, 36h, 48h e 60h. O crescimento dos grãos pode ser observado na Figura 11.

Figura 11. Crescimento dos grãos de trigo BRS Graúna durante a germinação



Fonte: A autora (2018).

2.2.2 Secagem e armazenamento das amostras

As sementes foram secas em estufa a 80 °C até umidade de 14 % (SWIECA et al., 2017). As raízes seminais, coleótilo e radículas foram removidas por fricção (Figura 12) e as amostras trituradas em moinho modelo A11 Basic (IKA WORKS Inc., Staufen, Alemanha) e peneiradas em malha de 0,5 mm mesh e destinadas às análises, com exceção da microscopia de fluorescência e atividade de α -amilase, as quais não passaram pela secagem.

Figura 12. Separação do grão de trigo de suas raízes seminais, coleóptilo e radículas



Fonte: A autora (2018).

2.2.3 Digestão *in vitro*

A digestão *in vitro* foi realizada segundo protocolo descrito por Minekus et al. (2014). A digestão compreende três etapas: fase oral, fase gástrica e fase intestinal. Para cada uma destas etapas um fluido de solução eletrolítica é adicionado, sendo estes, fluido salivar simulado (SSF), fluido gástrico simulado (SGF) e fluido intestinal simulado (SIF) (Tabela 2). Todas as unidades enzimáticas descritas são baseadas na mistura final de cada etapa. As incubações foram feitas em banho maria Dubnhoff DI-921 (Dist, Santa Catarina, Brasil).

Na fase oral 5 g de trigo com diferentes tempos de germinação foram misturados a 3,5 mL de SSF pH 7,0 pré-aquecido a 37 °C, 0,5 mL de α -amilase salivar humana (EC 3.2.1.1) a 75 U/ mL (A0521, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 25 μ L de CaCl_2 0.3 mol L⁻¹ e 975 μ L de água. A mistura foi agitada durante 2 min a 37 °C simulando a fase bucal.

Para a fase gástrica 7,5 mL do SGF pré-aquecido foi adicionado a mistura anterior, 1,6 mL de pepsina da mucosa gástrica porcina (EC 3.4.23.1) 2000 U/ mL (P6887, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 5 μ L de CaCl_2 0.3 mol L⁻¹, 0,2 mL de HCL 1 mol L⁻¹ para redução em pH 3,0 e 0,695 μ L de água. A mistura permaneceu durante 120 min a 37 °C.

Simulando a fase intestinal 11 mL de SIF pré-aquecido foi adicionado a mistura, 5 mL de pancreatina do pâncreas porcino (P7545, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em 100 U/ mL da atividade da tripsina, 2,5 mL de sais biliares de bovino e ovino (B8381, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) de 10 mmol L⁻¹ na mistura final, 40 μ L de CaCl_2 0.3 mol

L^{-1} , ajuste para pH 7,0 com 0,15 mL de NaOH 1 M e 1,31 mL de água. A mistura foi incubada durante 120 min a 37 °C. Posteriormente o fluido foi inserido em um banho de gelo para cessar a reação.

As amostras foram centrifugadas a 4500 x g por 15 min (modelo NT-825, Nova Técnica, São Paulo, Brasil), sendo o sobrenadante considerado a fração digerida e o *pellet* a fração não digerida, usada para as determinações (MOTTA, 2015). A digestão *in vitro* foi realizada em duplicata, os precipitados (*pellets*) foram analisados quanto ao teor de proteína bruta, amido total e amido resistente conforme as metodologias descritas a seguir.

Tabela 2. Composição das soluções estoques e dos fluidos digestivos SSF, SGF e SIF calculados para um volume final de 500 mL

Sais	SSF pH 7				SGF pH 3		SIF pH 7	
	Estoque concentrado		Vol. do estoque	Conc. em em SSF	Vol. do estoque	Conc. em em SGF	Vol. do estoque	Conc. em em SIF
	g L ⁻¹	mol L ⁻¹	mL	mmol L ⁻¹	mL	mmol L ⁻¹	mL	mmol L ⁻¹
KCl	37,3	0,5	15,1	15,1	6,9	6,9	6,8	6,8
KH ₂ PO ₄	68	0,5	3,7	3,7	0,9	0,9	0,8	0,8
NaHCO ₃	84	1	6,8	13,6	12,5	25	42,5	85
NaCl	117	2	--	--	11,8	47,2	9,6	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30,5	0,15	0,5	0,15	0,4	0,1	1,1	0,33
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0,5	0,06	0,06	0,5	0,5	--	--

Legenda: SSF = Fluido salivar simulado, SGF = Fluido gástrico simulado e SIF = Fluido intestinal simulado.

Fonte: Minekus et al. (2014).

2.2.4 Determinação de amido total

O teor de amido total foi avaliado enzimaticamente, antes e após a digestão *in vitro*, de acordo com o método 76-13.01 da AACC (2000) e a leitura realizada em espectrofotômetro a 510 nm.

2.2.5 Amido Resistente

O amido resistente foi determinado antes e após a digestão *in vitro* de acordo com o método 32-40.01 (AACC, 2015). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 510 nm.

2.2.6. Digestibilidade amilácea *in vitro*

O cálculo da digestibilidade do amido foi de acordo com Swieca, Baraniak e Gawlik-Dziki (2013), com base no teor de amido total e amido resistente.

$$SD (\%) = 100 \% - \left(\frac{RS}{AT} \times 100 \% \right)$$

Sendo: SD a digestibilidade *in vitro* do amido, AT o amido total e RS o conteúdo de amido resistente.

2.2.7 Atividade de α -amilase

A atividade da α -amilase foi avaliada de acordo o método 22-02.01 (AACC, 2000). Os procedimentos para extração enzimática, análise e cálculos dos resultados foram de acordo com o protocolo Ceralpha® (Megazyme International Ireland, Bray, Irlanda). Alíquotas de 0,2 mL do extrato enzimático e da Amilase HR pré-equilibrados a 40 °C foram misturados e permaneceram na temperatura de 40 °C durante 10 min. A reação foi cessada com adição de 3,0 mL do reagente Stopping. As absorbâncias foram mensuradas em 400 nm (SP-22, Biospectro espectrofotômetro, São Paulo, Brasil). Os resultados estão expressos em Unidade Ceralpha (UC / g).

2.2.8 Determinação de proteína bruta

As sementes coletadas de 0 a 60 horas de germinação foram submetidas à análise por micro-Kjeldahl de acordo com o método 46-13.01 da AACC (2000). O teor de proteína foi calculado nas sementes germinadas e após a digestão *in vitro* utilizando o fator de conversão de 5,70 (MANDALARI, 2016; ZILIC et al., 2016).

2.2.9 Digestibilidade proteica *in vitro*

A digestibilidade proteica foi determinada conforme Swieca, Dziki e Gawlik-Dziki (2017), utilizando-se os teores de proteína bruta antes e após a digestão *in vitro*.

$$PD (\%) = 100 \% - \left(\frac{PBD}{PB} \times 100 \% \right)$$

Sendo: PD a digestibilidade *in vitro* da proteína, PB a proteína antes da digestão e PBD a proteína bruta após a digestão *in vitro*.

2.2.10 Teor de glúten

As amostras coletadas durante a germinação foram submetidas aos procedimentos para determinação imunoenzimática de glúten (ELISA). Foram realizadas duas extrações independentes para cada amostra com álcool 40 %. Os procedimentos de análise foram de acordo com o recomendado pelo fornecedor do kit utilizado, AgraQuant Gluten Assay (Romer Labs, Áustria). As absorvâncias foram mensuradas em 450 nm utilizando um leitor de microplacas (TP-Reader, Thermo Plate, Brasil). Os resultados são baseados na curva de calibração (0 – 120 ppm de glúten), o limite de quantificação do método é de 4 ppm e os resultados determinados em mg. kg⁻¹ e expressos em g.100 g⁻¹ em base seca.

2.2.11 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras previamente secas, moídas e homogeneizadas, foram fixadas em suportes de alumínio com o auxílio de fitas dupla-face de carbono. Sequencialmente cobertas com uma camada de ouro de 200 Å de espessura. As micrografias para análise morfológica e microestrutural foram obtidas por MEV modelo JEOL JSM-6390LV, 8 e 10 kV do LCME da UFSC.

2.2.12 Análises macro e microscópica de fluorescência

Foram utilizadas duas técnicas de fluorescência para auxiliar na compreensão das alterações durante a germinação, uma correspondente a atividade da lipase e outra para visualizar as alterações no amido e proteína durante o processo germinativo.

Quanto a atividade da lipase, o procedimento foi seguido conforme Jensen e Heltved (1982). As amostras secas divididas em meias sementes longitudinais foram coradas durante 1 a 2 min com uma solução de dibutirato de fluoresceína (FBD) em etanol 80 % seguido de submersão em água a 60 ° C por 1 a 2 min. O excesso de água foi removido e as sementes analisadas em um analisador de qualidade desenvolvido pela Carlsberg Research Laboratory equipado com duas lâmpadas UV, refletores e filtro amarelo de emissão LWP-520 nm. As sementes com atividade de germinação exibem fluorescência amarela, o método baseia-se na sensibilidade do FDB à lipase/esterase (JESSEN; MUNCK; KRUGER, 1984).

Para observar as alterações morfológicas durante a germinação, com ênfase no amido e proteína, as sementes, após a germinação, foram adicionadas de dimetilsulfóxido (DMSO) como agente crioprotetor para minimizar os danos pelos cristais de gelo e armazenadas em - 20 °C até a realização da análise (O'BRIEN; MCCULLY, 1981; MUNCK; DE FRANCISCO, 1989). As amostras pré-congeladas foram fixadas em *stubs* com o meio de montagem Tissue Tek O.C.T. (Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA) e os cortes longitudinais com 40 µm de espessura foram realizados em criostato Thermo Scientific HM 525 NX (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Germany) a - 30 °C. As amostras foram adicionadas de fucsina ácida (1 a 2 min) e calcofluor (30 a 60 s) e visualizadas em microscópio Leica DM5500 B (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) (MUNCK; DE FRANCISCO, 1989; AUTIO; SALMENKALLIO-MARTTILA, 2001).

2.2.13 Análise estatística

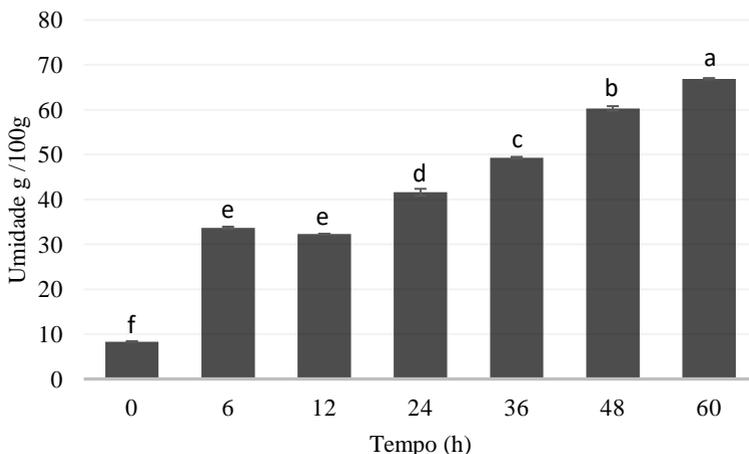
As análises quantitativas foram realizadas em triplicata, exceto a digestão *in vitro* e glúten (ELISA) que foram realizadas em duplicata. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância. O *software* estatístico utilizado foi o Statistica versão 13.0 (Statsoft, Tulsa, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da hidratação e alterações enzimáticas durante a germinação controlada

Os primeiros sinais de alterações no metabolismo das sementes ocorrem com a hidratação das células, gerando um aumento na atividade respiratória, liberação de energia para a germinação, ativação enzimática e síntese proteica (FILHO, 2005). A variação da umidade das sementes durante o processo germinativo está representada na Figura 13. Valores abaixo de 13 % são recomendados para conservar a qualidade dos grãos de trigo (BRASIL, 2001).

Figura 13. Absorção de água pelas sementes de trigo durante a germinação



* Letras diferentes diferem significativamente entre si ao nível de 5 % pelo Teste de Tukey

A partir da umidade inicial de $8,32 \pm 0,10 \text{ g.100 g}^{-1}$, durante as primeiras 6 h (processo de embebição) houve uma rápida absorção de água para os grãos, elevando a umidade para $33,67 \pm 0,26 \text{ g.100 g}^{-1}$. Após a embebição, as sementes foram transferidas para a câmara de germinação

e permaneceram durante 12 h, nesse período a umidade se manteve constante ($p > 0,05$).

Das 24 às 60 h de germinação as amostras apresentaram um aumento gradativo, diferindo estatisticamente a cada 12 h ($p < 0,05$). Um estudo realizado por McCaig e Li (2011) demonstrou uma relação entre a umidade e o percentual de grãos germinados na amostra, quanto mais longo o tempo de armazenamento, maior a absorção de água.

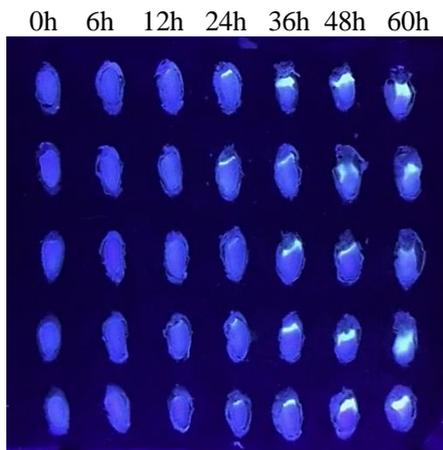
A estrutura anatômica do grão também tem influência sobre a absorção de água, um exemplo são as variedades de trigo mole e duro, que diferem na taxa de absorção da umidade sob as mesmas condições ambientais (SHAFQAT, 2013). Entre o embrião e o endosperma também há diferença quanto a absorção, e isto se deve às diferenças na composição química dos mesmos, já que as proteínas tendem a ter mais afinidade por água quando comparado ao amido (FILHO, 2005).

Com esse processo de hidratação das células, as enzimas hidrolíticas são sintetizadas, sendo as amilases, lipases, proteases e peptidases pertencentes a esse grupo (FILHO, 2005). O método FDB se baseia na hidrólise de dibutirado de fluoresceína à fluoresceína livre, substância altamente fluorescente. Esta hidrólise ocorre principalmente pela atividade da lipase (GUILBAULT; KRAMER, 1964).

Com as condições de germinação aplicadas neste trabalho, após 24 h a lipase já começa a se expressar e vai aumentando ao longo das 60 horas (Figura 14). A atividade hidrolítica é iniciada no escutelo e progressivamente difundida a região distal do endosperma (JENSEN; HELTVED, 1982).

Um estudo avaliando duas variedades de trigo observou fluorescência pelo método FDB somente após 24 h de germinação, e nessas mesmas amostras a atividade de α -amilase já havia aumentado em 16 h de germinação (JENSEN; MUNCK; KRUGER, 1984). No mesmo estudo verificaram que apesar da α -amilase ter uma taxa mais rápida do que a atividade da lipase, ambas aumentavam exponencialmente com a germinação.

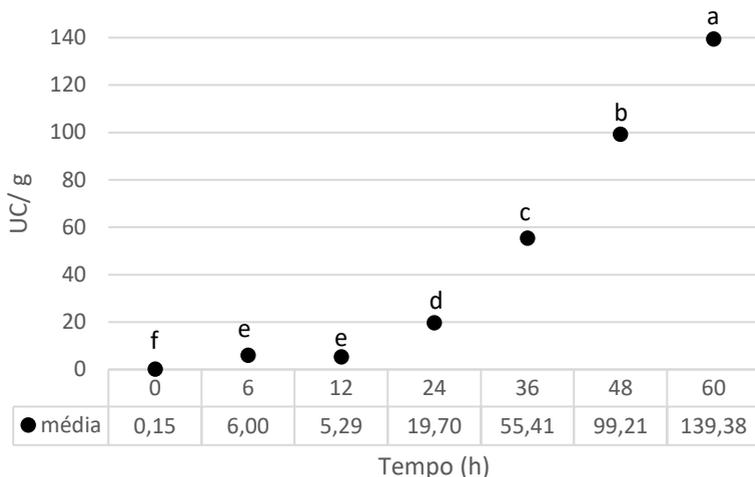
Figura 14. Representação da atividade da lipase/esterase, método FDB, com cinco repetições para cada tempo de desenvolvimento germinativo do trigo



A síntese de α -amilase ocorre na camada de aleurona e escutelo, e é ativada através da embebição do embrião, podendo ser observadas alterações a partir de 12 h (LOVEGROVE; HOOLEY, 2000; NAKAJIMA et al., 2006; XIE et al., 2007). No entanto, nas amostras analisadas, a síntese da α -amilase se manifestou no período de embebição dos grãos (6 h), passando de 0,14 (0 h) para 5,99 UC / g ($p < 0,05$) e elevando os níveis da α -amilase com o tempo de germinação (Figura 15).

Durante as 60 h de processo germinativo a produção de α -amilase não foi estagnada, exceto entre 6 h e 12 h ($p > 0,05$). Segundo Baranzelli (2017) que avaliou três momentos germinativos (24, 48 e 72 horas), um aumento da atividade amilolítica total e de α -amilase foi observado em 48 e 72 horas de germinação. Carvalho e Beleia (2015) ao avaliar 13 amostras em condições não controladas de germinação, todas selecionadas com *Falling Number* (FN) inferior a 200, secas e com a retirada do coleóptilo e radículas, encontraram resultados de 25 a 155,8 UC/g.

Figura 15. Atividade da enzima α -amilase dos grãos de trigo durante a germinação



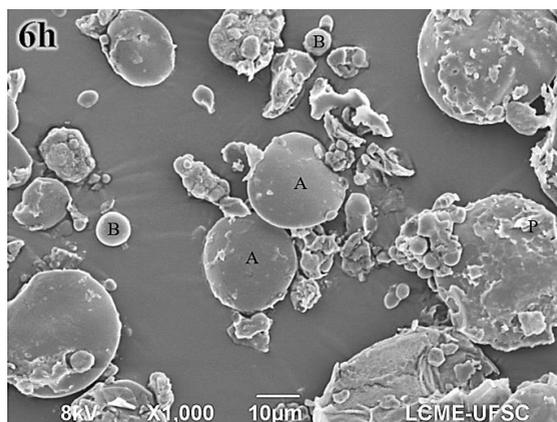
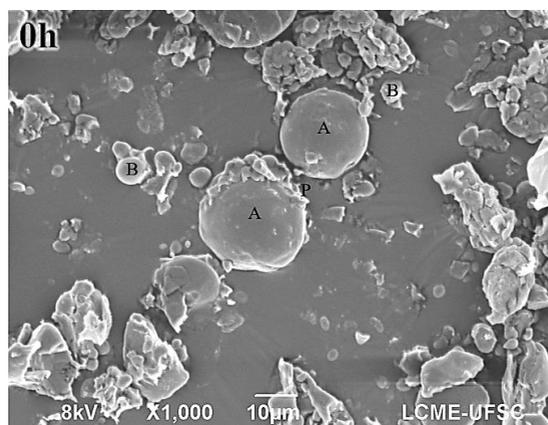
Simsek et al. (2014), ao avaliarem 24 amostras simulando condições de campo por cinco dias na temperatura de 18 a 20 °C , encontraram nas amostras sem germinar ente 0,08 a 0,18 CU/g, e 1,32 a 2,44 CU/g em amostras germinadas. No presente estudo, na amostra controle (0 h) os resultados foram similares aos encontrados por Simsek et al. (2014), porém, nas amostras germinadas os valores divergiram, sendo inferiores até mesmo a atividade de α -amilase encontrada nas primeiras 6 h da pesquisa.

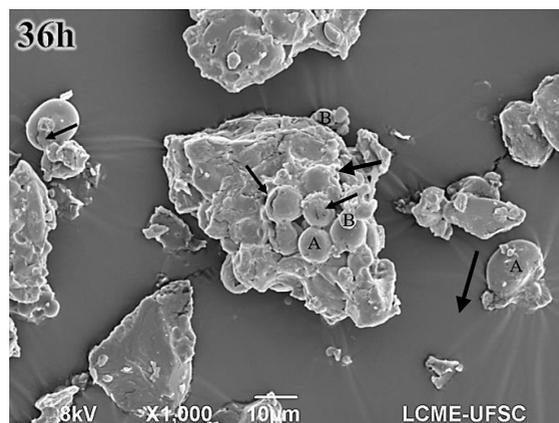
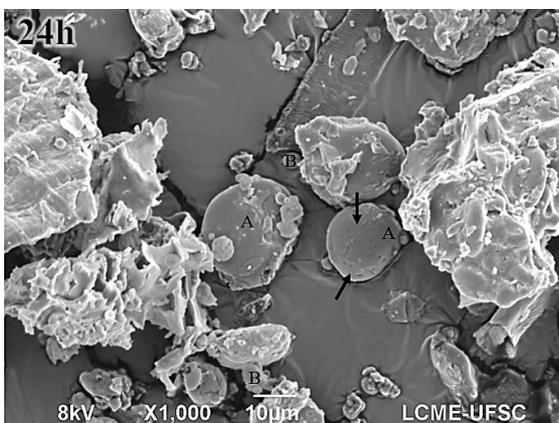
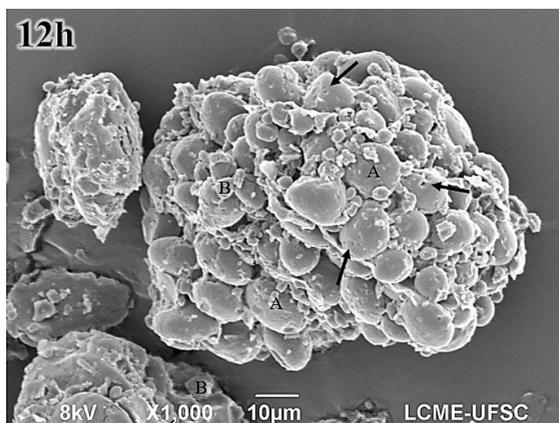
3.2 Morfologia dos grânulos de amido e rede proteica durante a germinação

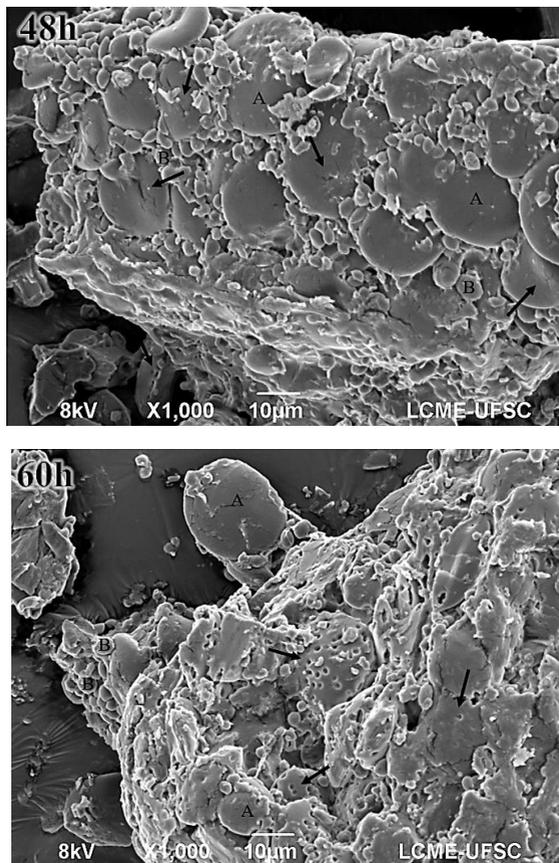
Os grânulos de amido apresentaram-se predominantemente no formato lenticular e esférico, havendo grânulos grandes do tipo A e pequenos tipo B (A e B apresentados na Figura 16 - 0h). O formato e tamanho dos grânulos de amido podem estar relacionados à digestibilidade, conteúdo de amilose, solubilidade, capacidade de absorção de água, e outros fatores (RILEY; WHEATLEY; ASEMOTA, 2006).

Com 12 e 24 h de germinação pode-se observar pequenas depressões na superfície dos grânulos de amido (seta), a partir das 36 h algumas fissuras (setas) estavam em evidência e no último período de germinação, 60 h, alguns grânulos de amidos apresentavam-se amorfos e com orifícios. Essas características de ataque ao grânulo de amido são decorrentes da α e β -amilase, as enzimas podem atuar na superfície dos grânulos ou hidrolisar internamente, formando orifícios (PENFIELD; CAMPBELL, 1990; ZHANG; OATES,1999).

Figura 16. Micrografia eletrônica de varredura de trigo triturado em diferentes estágios de germinação (0 a 60 h). Grânulos de amido representado por A e B e setas indicando o ataque enzimático

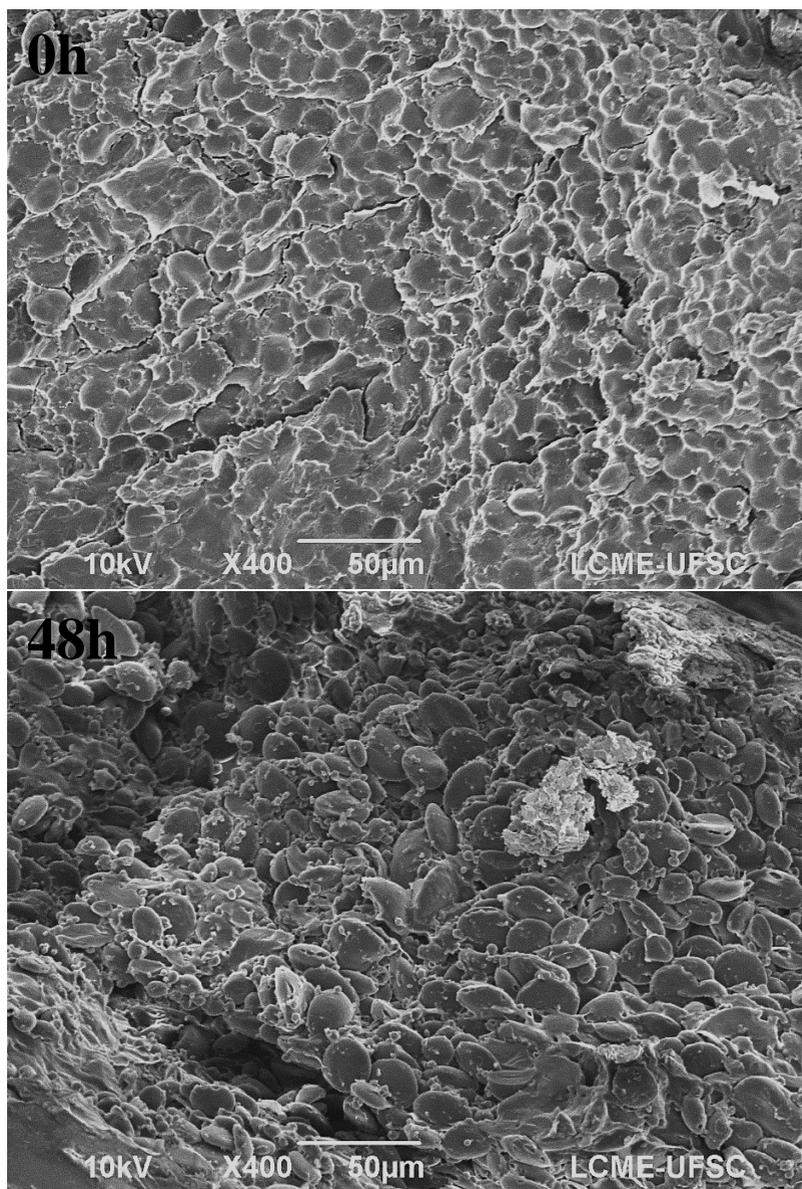






Em alguns estudos pode ser observado ausência da matriz proteica nos grãos germinados devido às enzimas proteolíticas, sem a matriz proteica os grânulos de amido tendem a ficar mais expostos, facilitando a ação da α -amilase (HUANG, 1979; SIMSEK et al., 2014). Na variedade estudada, a matriz proteica antes da germinação também se encontrava mais íntegra, envolvendo os grânulos de amido completamente. Na Figura 17 pode-se observar que após a germinação e ataque das proteases, os grânulos de amido aparentam estar mais livres e com a superfície mais exposta que o controle.

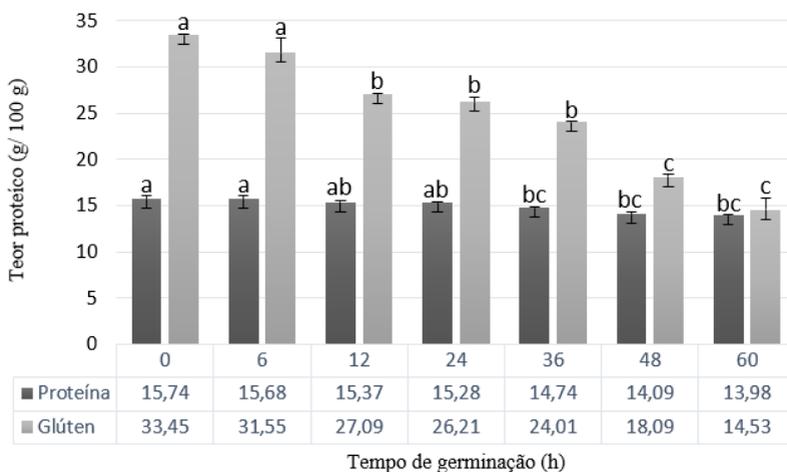
Figura 17. Micrografia eletrônica de varredura de grão de trigo sem germinar (0 h) e após 48 horas de germinação



3.3 Conteúdo proteico do trigo durante a germinação

Os cereais quando germinados sofrem alterações que intervêm em suas propriedades. Quanto à composição química do trigo, o amido tende a reduzir, os açúcares a aumentar, e há modificação na quantidade e propriedades das proteínas (SIMSEK et al., 2014; KERPES et al., 2016; OLAERTS et al., 2016). A variedade analisada apresentou alta quantidade de proteína (15,74 g.100 g⁻¹) antes da germinação, sendo considerado um trigo duro e com boa qualidade na panificação, a proteína está fortemente aderida ao amido. No presente estudo, ao avaliar a proteína bruta e o teor de glúten durante a germinação, foi verificado uma redução em ambos resultados (Figura 18).

Figura 18. Proteína bruta e glúten durante os períodos de germinação do trigo expressos em g. 100 g⁻¹ em base seca



* Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna denotam diferenças significativas ao nível de 5 % pelo Teste de Tukey

Os valores de proteína bruta tiveram uma redução significativa nas condições de germinação estabelecidas neste estudo, alterando gradativamente de 15,74 para 13,98 % após 60 h de germinação. Abbas (2014) utilizando condições similares de germinação (embebimento de 6

h, germinação a 30 °C por 6 dias), observou um aumento na proteína em duas variedades estudadas, uma das variedades aumentando de 14,8 para 20,53 % e a outra de 13,76 para 17,87 %.

Outros autores também relataram um aumento proteico em diferentes condições de embebição e germinação, para trigo com alto teor de amilose os resultados foram 20,5 para 21,3 g. 100g⁻¹ e em outra variedade, de 15,4 para 15,7 g. 100g⁻¹, esses resultados são referentes a 48 h de germinação (VAN HUNG et al., 2012; VAN HUNG; MAEDA e MORITA, 2015).

Considerando que os estudos citados também avaliaram proteína bruta pela mesma metodologia, estudando variedades diferentes de trigo submetidos a condições distintas de germinação, pressupõe-se que a redução da proteína bruta neste estudo esteja relacionada ao processo de remoção das raízes seminais, coleóptilo e radículas.

Shafquat (2013) fez o mesmo procedimento de remoção das radículas em duas variedades de trigo. Em uma variedade, com testes de embebição de 24 h e germinação a 12 e a 20 °C houve aumento proteico, com embebição de 3 h e germinação a 20 °C, redução da proteína. Na segunda variedade analisada, nos 3 testes (12 °C/ 24 h, 20 °C/24 h e 20 °C/3 h) a proteína reduziu. Desta forma, a redução proteica pode estar associada tanto às condições de germinação quanto a remoção do coleóptilo e radículas. Ressalta-se que com uma das variedades, houve uma redução da proteína mesmo alternando as condições de germinação.

A análise de glúten apontou o conteúdo de gliadina e glutenina superior ao teor de proteína bruta. Segundo Hajas et al., (2018) algumas variedades de trigo têm níveis elevados dos epítomos alvos nas análises por ELISA, o que resulta em uma superestimação do conteúdo de glúten. Resultados similares foram observados por Gelinas e McKinnon (2016), dentre muitas variedades estudadas, uma amostra com 14,6 % de proteína apresentou 25,7 % de glúten, e outra com 11,6 % de proteína apresentou 60,3 % de glúten.

Outro fator associado é que a medição por ELISA, apesar de ser mais sensível que pelo método Kjeldahl, é indicada para teores entre 4 e 120 mg.kg⁻¹ de glúten, fazendo-se necessário diluições sucessivas para amostras de trigo, acarretando maior erro analítico. Ainda assim, na análise de glúten a redução foi de 57 % após 60 h de germinação

($p < 0,05$), essa diminuição da toxicidade pode estar ligada ao uso das proteínas que compõe o glúten durante o processo germinativo.

3.4 Alteração do amido durante processo germinativo

Os percentuais de amido total diminuíram durante o processo germinativo (Tabela 3). Nos dois períodos iniciais (0 h e 6 h) e nos últimos períodos avaliados (48 h e 60 h) não houve diferenças significativas.

Tabela 3. Amido total e resistente em trigo germinado, expressos em g. 100 g⁻¹ (Base seca)

Amostras	Amido total	Amido resistente
0 h	56,43 ± 0,48 ^a	0,21 ± 0,05 ^a
6 h	55,69 ± 0,14 ^a	0,22 ± 0,05 ^a
12 h	53,96 ± 0,30 ^b	0,28 ± 0,06 ^a
24 h	49,30 ± 0,26 ^c	0,30 ± 0,09 ^a
36 h	47,79 ± 0,28 ^d	0,23 ± 0,00 ^a
48 h	45,99 ± 0,55 ^e	0,22 ± 0,02 ^a
60 h	45,40 ± 0,54 ^e	0,23 ± 0,10 ^a

* Letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente entre si ao nível de 5 % pelo Teste de Tukey

Alguns estudos também relataram a redução do amido em distintas condições germinativas, como Marti et al. (2017) que avaliaram o trigo entre 72 e 90 h de germinação, a 20 ° C, após embebedimento entre 12 e 24 h. Van Hung et al. (2012) analisaram a amostra após 30 min de embebedimento, a 3 ° C, em até 48 h de germinação, também obteve redução de 62,4 para 60,9 g.100g⁻¹ de amido total.

As alterações no processo germinativo ocorrem devido às altas atividades enzimáticas, no caso dos carboidratos de reserva, os amidos são transformados em glicídios pela ação das amilases (FILHO, 2005). Marti et al. (2017) constataram um aumento dos açúcares totais após germinação, isso evidencia a mobilização de reservas nutricionais, resultando como produtos da digestão do amido a sacarose e ATP como fonte de energia para o crescimento do embrião (FILHO, 2005). A

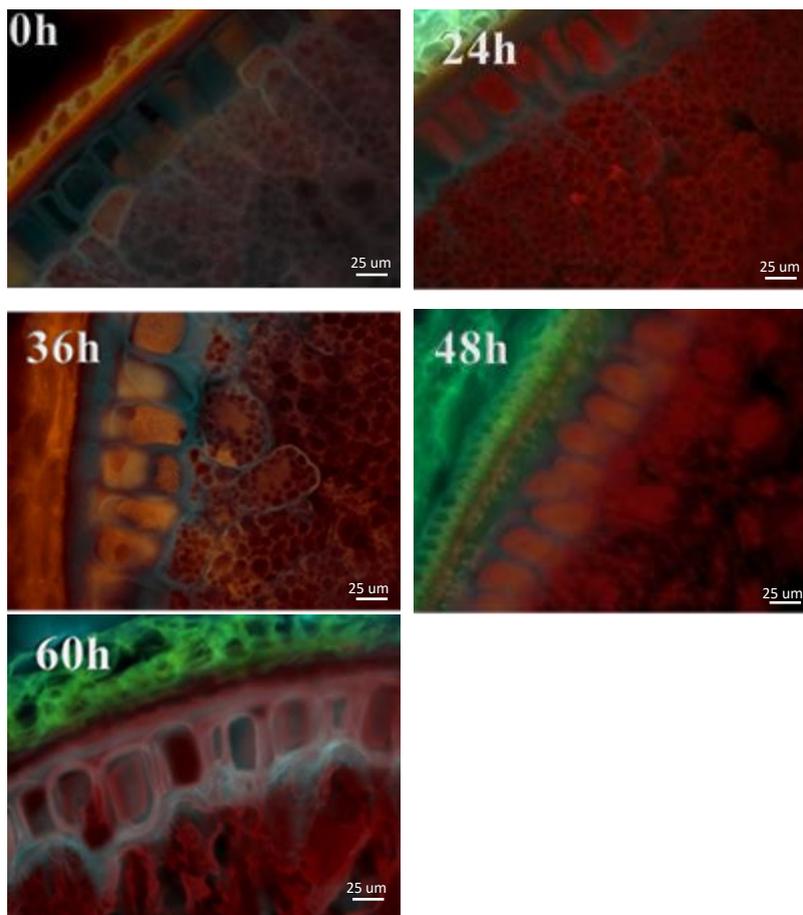
redução de amido total corrobora com as alterações morfológicas encontradas nos grânulos de amido através da MEV.

Em relação ao teor de amido resistente, não houve diferença significativa durante a germinação. De acordo com Menezes e Lajolo (2000), ao reunirem alguns resultados de amido resistente encontrados no trigo, constataram valores de $0,5 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ em trigo integral, $1,16 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ em outra variedade e $0,3 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ em farinha de trigo, este último se assemelhando mais aos resultados encontrados.

3.5 Microscopia de fluorescência

Os grânulos de amido (preto) apresentam-se visivelmente cercados por uma matriz proteica (vermelho), como indicado também por MEV. Até as 36 horas de germinação os grânulos de amido apresentaram-se em formato característico, com 48 e 60 horas de germinação a matriz é alterada, perdendo a conformação (Figura 19). Esses resultados são condizentes com o teor de amido discutido anteriormente, que em 48 e 60 h se mostraram semelhantes estatisticamente entre si. Dentro da camada de aleurona a proteína é o componente predominante (EVERS; BETCHEL, 1988).

Figura 19. Alterações morfológicas mais representativas durante a germinação de trigo com cortes de 40 μm , fluorocromos fucsina ácida e calcofluor e captura de imagens com sobreposição de filtros (40 X)

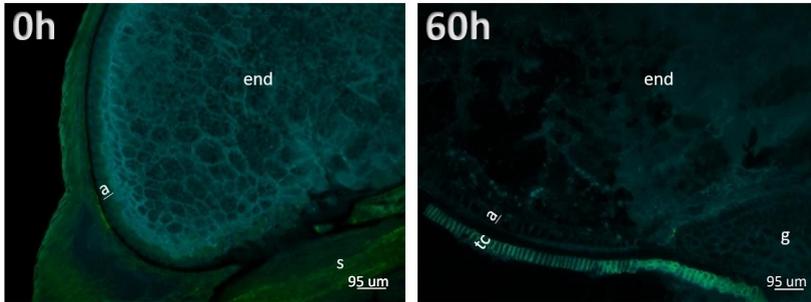


Legenda: Pericarpio em verde, parede celular primária em azul, proteína em vermelho e amido em preto.

Na Figura 20 observa-se que as paredes do endosperma após 60 horas de germinação já se encontram degradadas, e essas mesmas células ainda se mantêm na camada de aleurona, porém com menor intensidade quando comparado a 0 h. Após 60 h de germinação a região do gérmen

se encontra íntegra, apontando que alguns nutrientes degradados tenham amparado o crescimento da nova plântula.

Figura 20. Micrografia de fluorescência da seção transversal (40 μm) do trigo em 0 e 60 h de germinação com adição dos fluorocromos fucsina ácida e calcofluor e filtros UV e azul sobrepostos (10x)



Legenda: End = endosperma, a = aleurona, tc = células tubulares, g = gérmen, s = sulco. Em verde as paredes primárias, em verde o pericarpo

3.6 Digestibilidade do amido e proteína durante germinação do trigo

Durante a germinação ocorre uma reativação do metabolismo da semente dando progresso à hidrólise de carboidratos e proteínas de armazenamento para a síntese de metabólitos benéficos à saúde (CÁCERES et al., 2014). Durante esse processo, as proteínas e carboidratos tornam-se mais biodisponíveis e bioacessíveis (CEVALLOS-CASALS; CISNEROS-ZEVALLOS, 2010; SWIECA et al., 2012). Os resultados de amido total e amido resistente após a digestão *in vitro* foram utilizados como parâmetros de verificação da metodologia utilizada (Tabela 4).

Os resultados de amido total antes da digestão *in vitro* variaram de 45,40 a 56,43 $\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$, após a digestão, em todos os períodos de germinação foram inferiores a 0,5 $\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$, ou seja, todo o amido foi degradado durante esse processo. Durante a fase oral ocorre a hidrólise do amido por ação da α -amilase salivar, em alguns estudos foram observados que durante essa fase ocorre quebra de 50 e 25 % do amido em pão e espagete, respectivamente. Na fase intestinal a atividade da pancreatina é baseada principalmente na protease, lipase e amilase, assim,

os valores de amido total estão dentro do esperado (MINEKUS et al., 2014).

Tabela 4. Amido total e amido resistente após digestão *in vitro* de trigo germinado, em base seca e expressos em g.100 g⁻¹

Amostras	Amido total	Amido resistente
0 h	< 0,5	0,11 ± 0,01 ^b
6 h	< 0,5	0,21 ± 0,00 ^{ab}
12 h	< 0,5	0,28 ± 0,05 ^{ab}
24 h	< 0,5	0,33 ± 0,03 ^a
36 h	< 0,5	0,25 ± 0,06 ^{ab}
48 h	< 0,5	0,22 ± 0,01 ^{ab}
60 h	< 0,5	0,26 ± 0,01 ^{ab}

* Letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente entre si ao nível de 5 % pelo Teste de Tukey

Quanto ao amido resistente, seu comportamento se assemelha a fibra alimentar, não sendo digerido no trato gastrointestinal, podendo ser fermentado no intestino grosso e resultando em uma ação prebiótica (PEREIRA, 2007). Após a digestão *in vitro*, mesmo havendo poucas quantidades de amido resistente no trigo, os valores se mantiveram semelhantes aos resultados antes da digestão, presumivelmente se mantendo intacto.

A interação entre amido e proteína ocorre naturalmente nos grãos de cereais (SINGH; DARTOIS; KAUR, 2010). A matriz proteica em volta dos grânulos de amido pode atuar como uma barreira na digestão do amido (LÓPEZ-BARÓN et al., 2017). Logo, a matriz proteica tem influência na taxa de digestão do amido, quanto maior o conteúdo proteico, mais rígida se torna a matriz, dificultando o ataque enzimático no amido (KIM et al., 2008; HAGER et al., 2013). Com relação aos períodos de germinação, não foi evidenciado diferenças significativas quanto à digestibilidade do amido (Tabela 5).

Tabela 5. Influência do tempo de germinação sobre a digestibilidade do amido e proteína do trigo

Amostras	SD %	PD %
0 h	99,62 ± 0,52 ^a	61,54 ± 0,51 ^a
6 h	99,60 ± 0,20 ^a	64,94 ± 0,45 ^b
12 h	99,47 ± 0,36 ^a	62,77 ± 0,14 ^{ab}
24 h	99,38 ± 0,35 ^a	62,73 ± 0,24 ^{ab}
36 h	99,52 ± 0,28 ^a	62,04 ± 0,53 ^a
48 h	99,51 ± 0,58 ^a	61,74 ± 0,49 ^a
60 h	99,49 ± 0,64 ^a	62,54 ± 0,23 ^a

* Letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente entre si ao nível de 5 % pelo Teste de Tukey. Legenda: SD % = Digestibilidade amilácea *in vitro*; PD % = Digestibilidade proteica *in vitro*.

Apesar do controle apresentar uma matriz proteica íntegra, como demonstrado por MEV, os valores de digestibilidade do amido não foram afetados. Algumas modificações no amido como secagem ou cozimento, podem afetar a degradação do amido durante a digestão (DE ZORZI et al., 2007; STUKNYTE et al., 2014). No caso da germinação, as condições em que os grãos foram expostos podem afetar os valores do amido, como tempo, temperatura e elicitores (GAWLIK-DZIKI; SWIECA; SUGIER, 2012; SWIECA et al., 2012).

As diferenças da digestibilidade *in vitro* de amido nativo tem sido determinada pela fonte amilácea, tamanho dos grânulos, relação amilose e amilopectina, ligação amilose-lipídios, antinutrientes e outros fatores (HOOVER; ZHOU, 2003). O grau de degradação do amido está vinculado ao índice glicêmico dos alimentos, modulando a quebra amilácea a absorção dos açúcares (TAKACS et al., 2018). Swieca e Dziki (2015) relataram que quanto maior a digestibilidade do amido, menor o teor de amido resistente. Com resultados próximos a 50 g.100 g⁻¹ de amido total, a digestibilidade ficou em torno de 60 %, isso pois o teor de amido resistente no trigo estava próximo a 40 % (SWIECA; DZIKI, 2015). No presente estudo os valores de amido resistente oscilaram de 0,21 a 0,30 g.100 g⁻¹, resultando em uma alta digestibilidade amilácea.

O amido é responsável por fornecer nutrientes e energia para o organismo (DEWETTINCK et al., 2008), logo, mesmo não havendo diferença significativa com relação ao tempo de germinação, a variedade

estudada pode ser considerada uma boa matriz energética quando avaliada a digestibilidade amilácea.

Quanto à digestibilidade das proteínas, é considerada a percentagem hidrolisada pelas enzimas digestivas e absorvidas durante a digestão, seja na forma de aminoácidos ou qualquer composto nitrogenado (SGARBIERI, 1987). As amostras referentes à embebição (6 h), 12 e 24 h de germinação manifestaram maior digestibilidade proteica, diferindo ($p < 0,05$) do controle e demais tempos avaliados.

Essas ligações peptídicas que não são quebradas durante a digestão, ou é excretada no bolo fecal ou usadas pelos microorganismos do intestino grosso para geração de produtos metabólicos (SGARBIERI, 1987). Segundo alguns autores, a degradação da proteína de armazenamento durante a germinação pode aumentar a digestibilidade da proteína pois torna-se mais disponível para a hidrólise da pepsina (MBITHI-MWIKYA et al., 2000; SEGHGAL; KAWATRA, 2001).

Em pesquisa realizada por Swieca e Dziki (2015), apenas uma amostra das quatro condições avaliadas tiveram digestibilidade proteica semelhantes a encontrada neste trabalho (em torno de 60 %). A baixa digestibilidade das proteínas após 2 e 4 dias de germinação pode estar relacionada ao aumento de fenólicos, e estes interagem com a matriz alimentar, com as enzimas durante a digestão ou outras proteínas, que de forma direta ou não, reduzem a bioacessibilidade dos nutrientes (KROLL; RAWEL; ROHN, 2003; LABUCKAS et al., 2008; DZIKI et al., 2015; SE CZYK; SWIECA; GAWLIK-DZIKI, 2015).

Pelos benefícios nutricionais e sensoriais dos grãos germinados, a sua utilização em formulações vem crescendo, representando uma tendência ao consumo de alimentos saudáveis (SINGH et al., 2015; MARTI et al., 2017). Alguns autores relataram que a germinação aumenta a digestibilidade das proteínas e carboidratos, torna vitamínicos e atividade antioxidante mais biodisponíveis, fornece alto teor de fitoquímicos, sendo aliados a dietas funcionais e promotoras de saúde (DONKOR et al., 2012; ABORUS et al., 2018).

Segundo Swieca e Dziki (2015), a digestibilidade do amido e proteína em brotos de trigo é influenciada pelas condições de germinação. Assim, neste estudo, com a variedade de trigo analisada e nas condições pré-determinadas de germinação, a digestibilidade do amido não foi alterada pelo tempo de germinação, e a proteína apresentou-se mais biodisponível em 6, 12 e 24 horas de germinação.

CONCLUSÃO

Os resultados do estudo indicaram redução no amido total e proteína, que podem estar relacionados às condições de germinação, aumento de atividade enzimática e a retirada das raízes seminais, coleóptilo e radícula

A partir de 12 horas de germinação foi observado através da MEV, alterações no amido devido a atividade das amilases, sendo que em 60 horas de germinação os grânulos apresentavam-se majoritariamente amorfos.

A degradação do amido e proteína ocorre inicialmente no endosperma do grão em direção do pericarpo, porém o embrião se mantém intacto, sugerindo o transporte de nutrientes para essa região. Apesar de evidenciado que a matriz proteica estava mais íntegra na amostra sem germinar, a digestibilidade do amido não foi afetada, apresentando uma alta digestibilidade do amido, possivelmente pelo baixo teor de amido resistente. Em 6, 12 e 24 horas de germinação houve maior digestibilidade proteica.

REFERÊNCIAS

AACC INTERNATIONAL. **Approved Methods of Analysis**, 10 ed. St. Paul: American Association of Cereal Chemist, 2000.

ABBAS, T. A. Effect of germination on chemical composition of two wheat cultivars. **Journal of Genetic and Environmental Resources Conservation**, v. 2, n. 2, p. 231-235, 2014.

ABORUS, N. E.; ŠAPONJAC, V. T.; ČANADANOVIĆ-BRUNET, J.; ČETKOVIĆ, G.; HIDALGO, A.; VULIĆ, J.; ŠEREGELJ, V. Sprouted and freeze-dried wheat and oat seeds-phytochemical profile and *in vitro* biological activities. **Chemistry & Biodiversity**, 2018.

ANDERSEN, G.; KOEHLER, P.; SOMOZA, V. Metabolic effects of bread fortified with wheat sprouts and bioavailability of ferulic acid from wheat bran. **Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention**, p. 507-517, 2011.

ANDERSON, J. W.; RANGLES, K. M.; KENDALL, C. W.; JENKINS, D. J. Carbohydrate and fiber recommendations for individuals with diabetes: a quantitative assessment and meta-analysis of the evidence. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 1, p. 5-17, 2004.

AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of AOAC International**. 18 ed. Gaithersburg, MD: AOAC International, 2005.

AUTIO, K.; SALMENKALLIO-MARTTILA, M. Light microscopic investigations of cereal grains, doughs and breads. **LWT-Food Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 18-22, 2001.

BARANZELLI, J. **Germinação pré-colheita e induzida de trigo: atividade enzimática, propriedades físico-químicas, reológicas, de panificação e teor de ácido γ -aminobutírico**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas.

BAZZANO, L. A.; HE, J.; OGDEN, L. G.; LORIA, C. M.; VUPPUTURI, S.; MYERS, L.; WHELTON, P. K. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 1, p. 93-99, 2002.

BINGHAM, S. A.; DAY, N. E.; LUBEN, R.; FERRARI, P.; SLIMANI, N.; NORAT, T.; TJONNELAND, A. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. **The Lancet**, v. 361, n. 9368, p. 1496-1501, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº7, de 15 de agosto de 2001. **Regulamento Técnico de Identidade e de Qualidade do Trigo**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 2001. 33 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p.

CÁCERES, P. J.; MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; AMIGO, L.; FRIAS, J. Maximising the phytochemical content and antioxidant activity of Ecuadorian brown rice sprouts through optimal germination conditions. **Food Chemistry**, v. 152, p. 407-414, 2014.

CARVALHO, P. T.; BELEIA, A.P. Physicochemical changes and enzymatic activity of pre-harvest sprouting wheat. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 3, p. 524-531, 2015.

CEVALLOS-CASALS, B. A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Impact of germination on phenolic content and antioxidant activity of 13 edible seed species. **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1485-1490, 2010.

DA MOTTA, C. A. F. A. **Pseudocereais como ingredientes de formulações destinadas a uma alimentação especial**. Porto, 2015. 256 f. Tese (Doutorado em Nutrição Clínica). Faculdade de Ciências da Nutrição, Universidade do Porto.

DE ZORZI, M.; CURIONI, A.; SIMONATO, B.; GIANNATTASIO, M.; PASINI, G. Effect of pasta drying temperature on gastrointestinal digestibility and allergenicity of durum wheat proteins. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 353-363, 2007.

DELCOUR, J. A.; HOSENEY, R. C. Dry milling. **Principles of Cereal Science and Technology**, 3 ed. AACC International, St. Paul, 2010.

DEWETTINCK, K.; VAN BOCKSTAELE, F.; KÜHNE, B.; VAN DE WALLE, D.; COURTENS, T. M.; GELLYNCK, X. Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction and consumer perception. **Journal of Cereal Science**, v. 48, n. 2, p. 243-257, 2008.

DONKOR, O. N.; STOJANOVSKA, L.; GINN, P.; ASHTON, J.; VASILJEVIC, T. Germinated grains—sources of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 950-959, 2012.

DZIKI, D.; GAWLIK-DZIKI, U.; KORDOWSKA-WIATER, M.; DOMAN-PYTKA, M. Influence of elicitation and germination conditions on biological activity of wheat sprouts. **Journal of Chemistry**, v. 2015, 2015.

DZIKI, D.; GAWLIK-DZIKI, U.; KORDOWSKA-WIATER, M.; DOMAN-PYTKA, M. Influence of elicitation and germination conditions on biological activity of wheat sprouts. **Journal of Chemistry**, v. 2015, 2015.

EVERS, A. D.; BECHTEL, D. B. Microscopic structure of the wheat grain. **Wheat: Chemistry and Technology**, v. 1, p. 47-95, 1988.

EVERS, T.; MILLAR, S. Cereal grain structure and development: some implications for quality. **Journal of Cereal Science**, v. 36, n. 3, p. 261-284, 2002.

FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação, do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p. 323, 2004.

FILHO, J. M. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Fealq, 2005.

FULCHER, R. G.; O'BRIEN, T. P.; LEE, J. W. Studies on the aleurone layer I. Conventional and fluorescence microscopy of the cell wall with emphasis on phenol-carbohydrate complexes in wheat. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 1, p. 23-34, 1972.

GAWLIK-DZIKI, U.; ŚWIECA, M.; SUGIER, D. Enhancement of antioxidant abilities and the lipoxygenase and xanthine oxidase inhibitory activity of broccoli sprouts by biotic elicitors. **Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus**, v. 11, n. 1, p. 13-25, 2012.

GÉLINAS, P.; MCKINNON, C. Gluten weight in ancient and modern wheat and the reactivity of epitopes towards R5 and G12 monoclonal antibodies. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 51, n. 8, p. 1801-1810, 2016.

GUERRA, A.; ETIENNE-MESMIN, L.; LIVRELLI, V.; DENIS, S.; BLANQUET-DIOT, S.; ALRIC, M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 591–600, 2012.

GUILBAULT, G. G.; KRAMER, D. N. Fluorometric Determination of lipase, acylase, alpha-, and gamma-chymotrypsin and inhibitors of these enzymes. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 2, p. 409-412, 1964.

HADDAD, Y.; BENET, J. C.; DELENNE, J. Y.; MERMET, A.; ABECASSIS, J. Rheological behaviour of wheat endosperm—proposal for classification based on the rheological characteristics of endosperm test samples. **Journal of Cereal Science**, v. 34, n.1, p. 105-113, 2001.

HAGER, A. S.; CZERNY, M.; BEZ, J.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Starch properties, *in vitro* digestibility and sensory evaluation of fresh egg pasta produced from oat, teff and wheat flour. **Journal of Cereal Science**, v. 58, n. 1, p. 156-163, 2013.

HAJAS, L.; SCHERF, K. A.; TÖRÖK, K.; BUGYI, Z.; SCHALL, E.; POMS, R. E.; KOEHLER, P.; TÖMÖSKÖZI, S. Variation in protein composition among wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to identify cultivars suitable as reference material for wheat gluten analysis. **Food Chemistry**, v. 267, p. 387-394, 2018.

HOOVER, R.; ZHOU, Y. *In vitro* and *in vivo* hydrolysis of legume starches by α -amylase and resistant starch formation in legumes - a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 401-417, 2003.

HOSENEY, R.C. **Principios de Ciencia y Tecnología de los Cereales**. Zaragoza: Acribia, 1991. IX, 321p. ISBN 842000703X (Broch.).

HUANG, G.R. **A Study of Alpha Amylase Activity in Kansas Hard White Wheats**. Dissertação de mestrado, Kansas State University, Manhattan, NY, USA, 1979.

HUR, S.J.; LIM, B.O.; DECKER, E.A.; MCCLEMENTS, D.J. *In vitro* human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 1-12, 2011.

JENSEN, S. A.; HELTVED, F. Visualization of enzyme activity in germinating cereal seeds using a lipase sensitive fluorochrome. **Carlsberg Research Communications**, v. 47, n. 5, p. 297, 1982.

JENSEN, S. A.; MUNCK, L.; KRUGER, J.E. Um método de fluorescência rápida para avaliação de brotação pré-colheita de grãos de cereais. **Journal of Cereal Science**, v. 2, n. 3, p. 187-201, 1984.

KERPES, R.; KNORR, V.; PROCOPIO, S.; KOEHLER, P.; BECKER, T. Gluten-specific peptidase activity of barley as affected by germination and its impact on gluten degradation. **Journal of Cereal Science**, v. 68, p. 93-99, 2016.

KHADKA, P. **Proteomics Study of Pre-Harvest Sprouting in Wheat**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – South Dakota State University, EUA, 2016.

KIM, E. H. J.; PETRIE, J. R.; MOTOI, L.; MORGENSTERN, M. P.; SUTTON, K. H.; MISHRA, S.; SIMMONS, L. D. Effect of structural and physicochemical characteristics of the protein matrix in pasta on *in vitro* starch digestibility. **Food Biophysics**, v. 3, n. 2, p. 229-234, 2008.

KROLL, J.; RAWEL, H. M.; ROHN, S. Reactions of plant phenolics with food proteins and enzymes under special consideration of covalent

bonds. **Food Science and Technology Research**, v. 9, n. 3, p. 205-218, 2003.

LABORIAU, L. G. A germinação das sementes: programa regional de desenvolvimento científico e tecnológico. **Washington: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos**, 1983.

LABUCKAS, D. O.; MAESTRI, D. M.; PERELLO, M.; MARTÍNEZ, M. L.; LAMARQUE, A. L. Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: Antioxidant activity and interactions with proteins. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 607-612, 2008.

LARROQUE, O. R.; BEKES, F. Rapid size-exclusion chromatography analysis of molecular size distribution for wheat endosperm protein. **Cereal chemistry**, v. 77, n. 4, p. 451-453, 2000.

LÉON, A. E. **De Tales Harinas, Tales Panes: Granos, Harinas y Productos de Panificación em Iberoamérica**. Córdoba: Hugo Báez, 2007, 473p.

LÓPEZ-BARÓN, N.; GU, Y.; VASANTHAN, T.; HOOVER, R. Plant proteins mitigate *in vitro* wheat starch digestibility. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 19-27, 2017.

LOVEGROVE, A.; HOOLEY, R. Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 3, p. 102-110, 2000.

MANDALARI, G.; MERALI, Z.; RYDEN, P.; CHESSA, S.; BISIGNANO, C.; BARRECA, D.; WALDRON, K.W. Durum wheat particle size affects starch and protein digestion *in vitro*. **European Journal of Nutrition**, p. 1-7, 2016.

MARCUSSEN, T.; SANDVE, S.R.; HEIER, L.; WULFF, B.B.; STEUERNAGELL, B.; MAYER, K.F.; OLSEN, O.A. A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. **Science**, v. 345, p. 1250092-1250092, 2014.

MARTI, A.; CARDONE, G.; NICOLODI, A.; QUAGLIA, L.; PAGANI, M. A. Sprouted wheat as an alternative to conventional flour improvers in bread-making. **LWT-Food Science and Technology**, v. 80, p. 230-236, 2017.

MATSUOKA, M.; YAMAGUCHI, I. Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. **The Plant Journal**, v. 46, n. 5, p. 880-889, 2006.

MBITHI-MWIKYA, S.; VAN CAMP, J.; YIRU, Y.; HUYGHEBAERT. Nutrient and antinutrient changes in finger millet (*Eleusine coracana*) during sprouting. **LWT-Food Science and Technology**, v. 33, n. 1, p. 9-14, 2000.

MCCAIG, R.; LI, Y. Effect of pre-harvest sprouting damage on the storability and malting quality of 2009 crop AC Metcalfe, CDC Copeland and CDC Kendall barley. **Technical Report/CMBTC**, 45 p., 2011.

MENEZES, E.W.; LAJOLO, FM. (Eds.). Contenido en fibra dietética y almidón resistente en alimentos y productos iberoamericanos. Proyecto CYTED XI.6: Obtención y caracterización de fibra dietética para su aplicación en regímenes especiales. CYTED/ CNPq. São Paulo, 2000. 121p.

MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALLANCE, S.; BOHN, T.; BOURLIEU, C.; CARRIERE, F.; BOUTROU, R.; CORREDIG, M.; DUPONT, D.; DUFOUR, C.; EGGER, L.; GOLDING, M.; KARAKAYA, S.; KIRKHUS, B.; LE FEUNTEUN, S.; LESMES, U.; MACIERZANKA, A.; MACKIE, A.; MARZE, S.; MCCLEMENTS, D. J.; M'ENARD, O.; RECIO, I.; SANTOS, C. N.; SINGH, R. P.; VEGARUD, G. E.; WICKHAM, M. S. J.; WEITSCHIES, W.; BRODKORB, A. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. **Food & Function**, v. 5, n. 6, p. 1113-1124, 2014.

MUNCK, L; DE FRANCISCO, A. **Fluorescence Analysis in Foods**. Longman Scientific & Technical, p.289, 1989.

NAKAJIMA, M.; SHIMADA, A.; TAKASHI, Y.; KIM, Y. C.; PARK, S. H.; UEGUCHI-TANAKA, M.; SUZUKI, H.; KATOH, E.; LUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; MAEDA, T.; NARINA, S. S.; HAMAMA, A. A.; BHARDWAJ, H. L. Nutritional and mineral composition of flax sprouts. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 11, p. 60, 2012.

O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. The study of plant structure: principles and selected methods. **Melbourne, Termarcarphi Pty. Ltd**, 1981.

OLAERTS, H.; ROYE, C.; DERDE, L. J.; SINNAEVE, G.; MEZA, W. R.; BODSON, B.; COURTIN, C. M. Impact of preharvest sprouting of wheat (*Triticum aestivum*) in the field on starch, protein, and arabinoxylan properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 44, p. 8324-8332, 2016.

PAJAK, P.; SOCHA, R.; GALKOWSKA, D.; ROZNOWSKI, J.; FORTUNA, T. Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. **Food Chemistry**, v. 143, p. 300-306, 2014.

PENFIELD, M.P.; CAMPBELL, A.N. **Experimental Food Science**. 3rd ed. San Diego: Californica Academic Press, 1990, p.541.

PEREIRA, K.D. Amido resistente, a última geração no controle de energia e digestão saudável. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, 2007.

QUAGLIA, G. **Ciencia y Tecnología de la Panificación**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1991. 485 p.

RILEY, C. K.; WHEATLEY, A. O.; ASEMOTA, H. N. Full length research paper isolation and characterization of starches from eight *Dioscorea alata* cultivars grwn in Jamaica. **African Journal of Biotechnology**, v.5, n.17, 2006.

SALAS-PÉREZ, L.; GAUCÍN-DELGADO, J. M.; PRECIADO-RANGEL, P.; FORTIS-HERNÁNDEZ, M.; VALENZUELA-GARCÍA, J. R.; AYALA-GARAY, A. V. Efecto del ácido benzoico en la

capacidade antioxidante de germinados de trigo. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, n. 17, p. 3397-3404, 2016.

SE CZYK, L. S.; SWIECA, M.; GAWLIK-DZIKI, U. Nutritional and health-promoting properties of bean paste fortified with onion skin in the light of phenolic–food matrix interactions. **Food & function**, v. 6, n. 11, p. 3560-3566, 2015.

SEHGAL, S.; KAWATRA, A. *In vitro* protein and starch digestibility of pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) as affected by processing techniques. **Food/Nahrung**, v. 45, n. 1, p. 25-27, 2001.

SGARBIERI, V.C. Métodos de avaliação da qualidade nutricional dos alimentos. In: SGARBIERI, V.C. Alimentação e Nutrição - Fator de Saúde e Desenvolvimento. São Paulo, Almed, p. 250-261, 1987.

SHAFQAT, S. **Effect of different sprouting conditions on alpha amylase activity, functional properties of wheat flour and on shelf-life of bread supplemented with sprouted wheat**. 2013. Thesis (Master of Food Science) – The University of Guelph.

SIMSEK, S.; OHM, J. B.; LU, H.; RUGG, M.; BERZONSKY, W.; ALAMRI, M. S.; MERGOUM, M. Effect of pre-harvest sprouting on physicochemical changes of proteins in wheat. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 2, p. 205-212, 2014.

SINGH, A. K.; REHAL, J.; KAUR, A.; JYOT, G. Enhancement of attributes of cereals by germination and fermentation: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 11, p. 1575-1589, 2015.

SINGH, J.; DARTOIS, A.; KAUR, L. Starch digestibility in food matrix: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 4, p. 168-180, 2010.

STUKNYTE, M.; CATTANEO, S.; PAGANI, M. A.; MARTI, A.; MICARD, V.; HOGENBOOM, J.; DE NONI, I. Spaghetti from durum wheat: Effect of drying conditions on heat damage, ultrastructure and *in vitro* digestibility. **Food Chemistry**, v. 149, p. 40-46, 2014.

ŚWIECA, M.; BARANIAK, B.; GAWLIK-DZIKI, U. *In vitro* digestibility and starch content, predicted glycemic index and potential *in vitro* antidiabetic effect of lentil sprouts obtained by different germination techniques. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 1414-1420, 2013.

ŚWIECA, M.; DZIKI, D. Improvement in sprouted wheat flour functionality: effect of time, temperature and elicitation. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 9, p. 2135-2142, 2015.

SWIECA, M.; DZIKI, D.; GAWLIK-DZIKI, U. Starch and protein analysis of wheat bread enriched with phenolics-rich sprouted wheat flour. **Food Chemistry**, v. 228, p. 643-648, 2017.

SWIECA, M.; GAWLIK-DZIKI, U.; KOWALCZYK, D.; ZLOTEK, U. Impact of germination time and type of illumination on the antioxidant compounds and antioxidant capacity of *Lens culinaris* sprouts. **Scientia Horticulturae**, v. 140, p. 87-95, 2012.

TAKÁCS, K.; WICZKOWSKI, W.; CATTANEO, S.; SZERDAHELYI, E.; STUKNYTÈ, M.; CASIRAGHI, M. C.; EL NEHIR, S.; DE NONI, I. Occurrence of targeted nutrients and potentially bioactive compounds during *in vitro* digestion of wheat spaghetti. **Journal of Functional Foods**, v. 44, p. 118-126, 2018.

TORTORA, G.J.; DERRICKSON, B.H. **Principles of Anatomy and Physiology**. John Wiley & Sons, p. 922, 2008.

VAN HUNG, P. MAEDA, T.; MORITA, N. Improvement of nutritional composition and antioxidant capacity of high-amylose wheat during germination. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 6756-6762, 2015.

VAN HUNG, P.; MAEDA, T.; YAMAMOTO, S.; MORITA, N. Effects of germination on nutritional composition of waxy wheat. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 3, p. 667-672, 2012.

XIE Z.; ZHANG, S.; HANZLIK, E.; SHEN Q. J.; Salicylic acid inhibits gibberellin induced alpha-amylase expression and seed germination via

a pathway involving an abscisic-acid-inducible WRKY gene. **Plant Molecular Biology**, v.64, p. 293-303, 2007.

ZHANG, T.; OATES, C. G. Relationship between α -amylase degradation and physico-chemical properties of sweet potato starches. **Food Chemistry**, v. 65, n. 2, p. 157-163, 1999.

ZILIC, S.; JANKOVIC, M.; BARAC, M.; PESIC, M.; KONIC-RISTIC, A.; SUKALOVIC, V. H. T. Effects of enzyme activities during steeping and sprouting on the solubility and composition of proteins, their bioactivity and relationship with the bread making quality of wheat flour. **Food & Function**, v. 7, n. 10, p. 4323-4331, 2016.