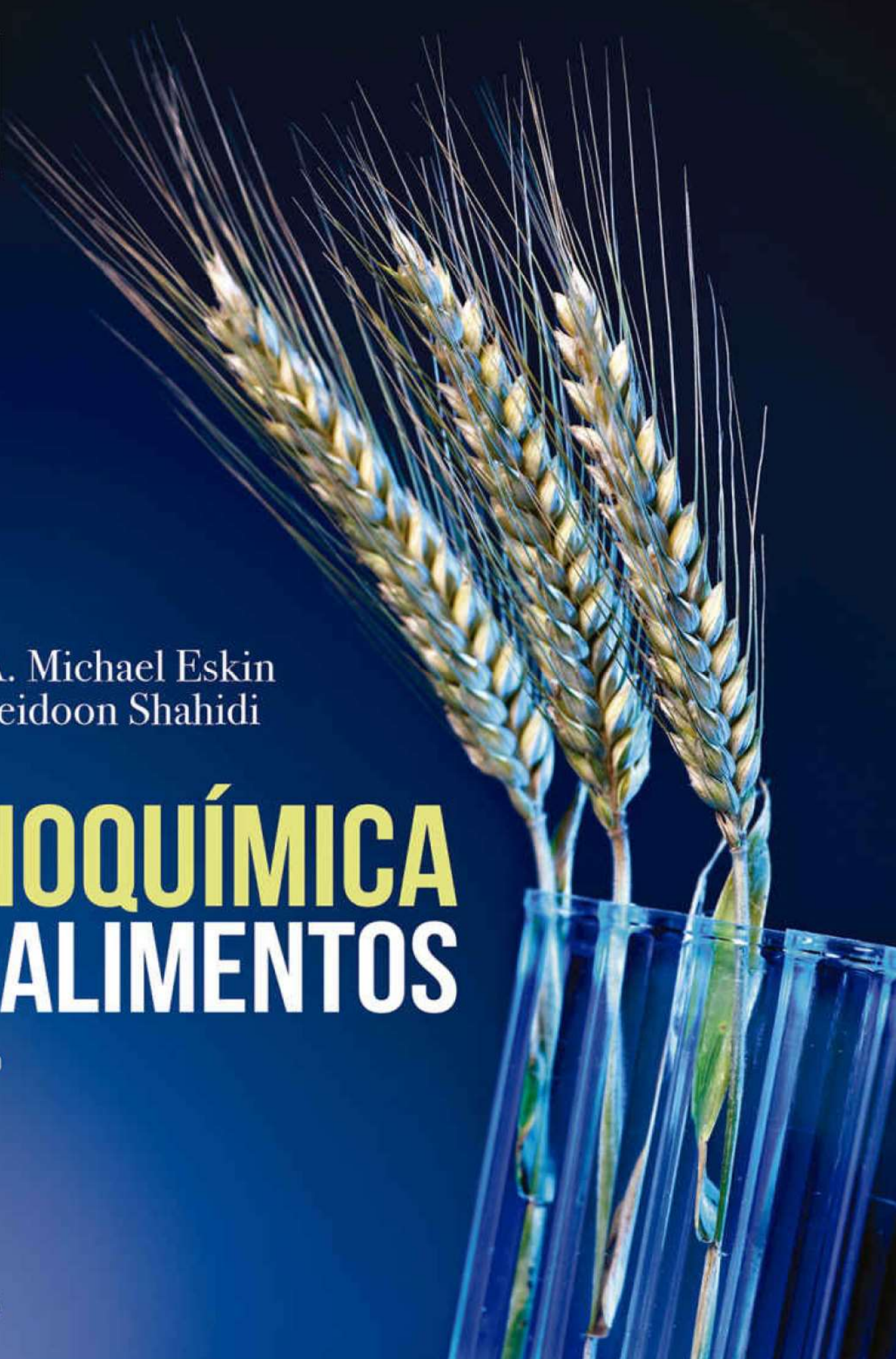


N.A. Michael Eskin
Fereidoon Shahidi

BIOQUÍMICA DE ALIMENTOS

3ª EDIÇÃO


CAMPUS



Cereais e leguminosas

Kequan Zhou,^{*} Margaret Slavin,[†] Herman Lutterodt,^{**} Monica Whent,^{**} N.A. Michael Eskin,[‡] Liangli Yu^{**}

PARTE I: CEREAIS

I. INTRODUÇÃO

Os cereais são membros da grande família das monocotiledôneas, as Gramíneas, que consistem principalmente em trigo, milho, cevada, arroz e sorgo (Anderson *et al.*, 2000). Alimentos ricos em cereais têm sido a base da alimentação para a população mundial por séculos. Os grãos de cereais contêm os macronutrientes (proteínas, gorduras e carboidratos) requeridos para o crescimento e o sustento da humanidade, contribuindo com cerca de 70% e 50% do total de calorias e proteínas, respectivamente (Topping, 2007). Grãos de cereais também são fontes de vitaminas e minerais importantes e de outros micronutrientes essenciais para uma ótima saúde. Eles ainda fornecem 20% de magnésio e zinco, 30% a 40% de carboidratos e ferro, 20% a 30% de riboflavina e niacina e mais de 40% de tiamina das dietas (Marston e Welsh, 1980). A produção mundial de cereais *per capita* alcançou cerca de 280 kg/ano na primeira metade do século XX, como pode ser visto na Figura 1.1 (Gilland, 2002). Estima-se que a produção mundial de cereais atinja 3.555 milhões de toneladas, com produção *per capita* de 378 kg (Gilland, 1998). Alimentos com base em cereais, especialmente grãos inteiros, têm demonstrado potencial para promover a saúde e reduzir o risco de várias doenças crônicas, como doenças coronarianas, diabetes tipo 2 e alguns tipos de câncer (Truswell, 2002; Montonen *et al.*, 2003; Slavin, 2000; Slavin *et al.*, 1999). Esses efeitos benéficos são atribuídos a numerosos compostos fitoquímicos contidos nos grãos. Este capítulo, portanto, vai discutir as alterações bioquímicas que ocorrem durante o desenvolvimento, a germinação e a estocagem de grãos de cereais, com foco especial no trigo.

II. ESTRUTURA DOS GRÃOS DE CEREAIS

Os diversos tecidos que constituem as sementes de cereais são geralmente descritos quanto a estrutura e origem do embrião (Evers *et al.*, 1999). A semente de cereais é composta de três tecidos principais: o embrião, o endosperma e a camada de aleurona (que envolve o endosperma de armazenamento). A ilustração do trigo na Figura 1.2 mostra essa estrutura, na qual o endosperma representa mais de 80% da massa do grão, enquanto as células de aleurona e o tecido do germe contendo o embrião e recoberto pelo escutelo correspondem a 15% e 3%, respectivamente. Os tecidos periféricos do grão que recobrem o endosperma amiláceo são constituídos, da superfície externa para a interna, de: pericarpo externo, pericarpo interno, casca da semente, camada de hialina e camada de aleurona (Barrona *et al.*, 2007). O germe é constituído de embrião e escutelo. As estruturas anatômicas de todos os grãos de cereais tendem a ser similares entre si, com algumas diferenças mínimas.

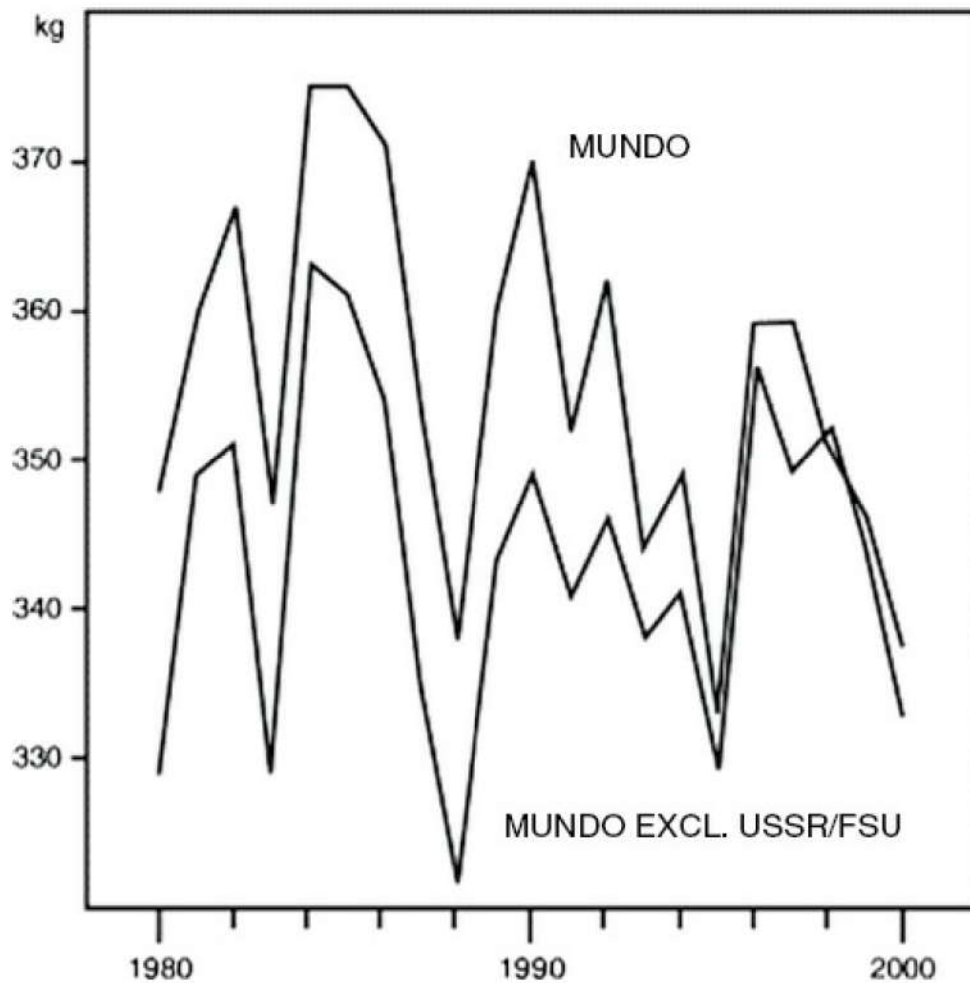


FIGURA 1.1 Produção de cereais *per capita* 1980–2000. Fontes: FAOSTAT; Escritório do Censo, Estados Unidos. Adaptado de Gilland (2002).

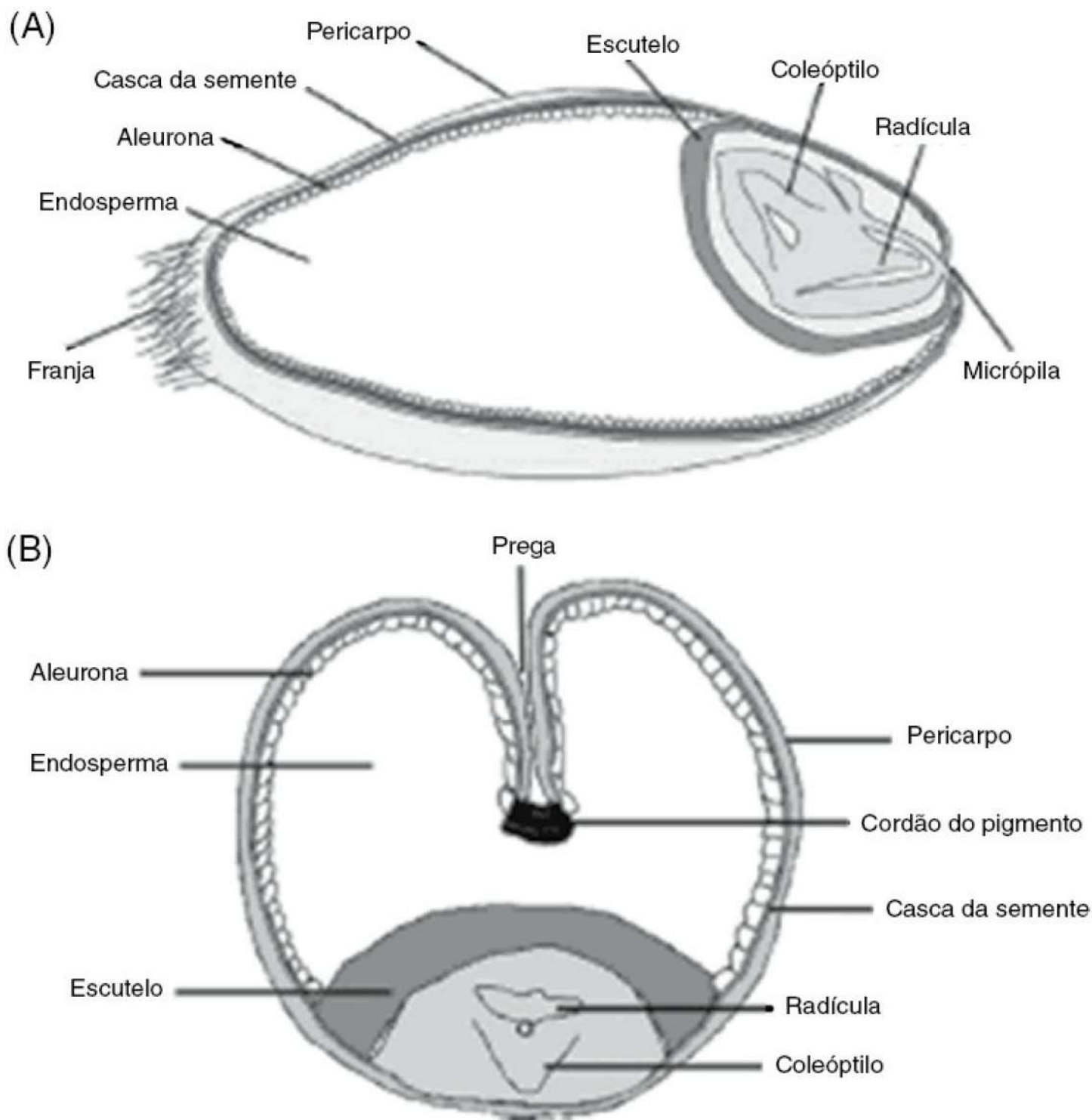


FIGURA 1.2 Diagrama do grão de trigo apresentando as estruturas principais em corte (A) longitudinal e (B) transversal. Rathjen *et al.* (2009); reprodução autorizada.

Os grãos de trigo e milho, por exemplo, são envoltos por uma película ou pericarpo e casca da semente ou testa, conjunto denominado de cariopses. No caso de cevada, aveia e arroz, porém, é encontrada uma camada adicional, que envolve a cariopse ou o núcleo do grão.

III. COMPOSIÇÃO DOS GRÃOS DE CEREAIS

Grãos de cereais são altamente nutritivos e seus principais componentes são proteínas (entre 10% e 15%) e amido (aproximadamente 60% a 70% do grão), além de polissacarídeos não amiláceos derivados da parede celular e que

constituem 3% a 8% do total (Saulniera *et al.*, 2007). A composição dos cereais depende muito da variedade do grão, das condições de crescimento, do cultivo e infecções (Tester, 1995). O endosperma amiláceo constitui a maior parte da semente do cereal e fornece os nutrientes necessários para o desenvolvimento do embrião durante a germinação. Os nutrientes tornam-se disponíveis através da liberação de enzimas da camada de aleurona e do embrião que hidrolisam as reservas do endosperma contidas em estruturas de armazenamento identificadas como grânulos de amido e corpos proteicos. Estes componentes têm grandes efeitos na escolha dos cereais pelas suas propriedades físico-químicas na moagem e no processamento dos alimentos. É importante notar que os carboidratos não digeríveis dos grãos de cereais têm recebido atenção cada vez maior como importante fonte de fibras nas dietas e apresentam impacto na qualidade nutricional além de efeitos benéficos na saúde (Salmeron *et al.*, 1997). Além disso, os polissacarídeos dos cereais estão associados a muitas outras substâncias, principalmente proteínas, polifenóis e fitatos, que podem modificar as ligações dos minerais pelas fibras dietéticas (Vitali *et al.*, 2008).

A. Amiloplastos

Amiloplastos são plastídeos ou organelas responsáveis pelo armazenamento dos grânulos de amido. A taxa da síntese do amido encontrado em grãos de cereais é um dos fatores que afetam o tamanho do grão e sua produção (Kumar e Singh, 1980). No endosperma maduro do trigo, da cevada e do centeio, o amido é encontrado em duas frações distintas de acordo com o tamanho dos grânulos. Os grânulos de amido primário ou tipo-A variam de 20 μm a 45 μm de diâmetro, enquanto os grânulos do tipo secundário ou tipo-B raramente excedem 10 μm de diâmetro (Evers, 1973). A análise da distribuição dos tamanhos dos grânulos de amido do endosperma do trigo, realizada por Evers e Lindley (1977), demonstrou que grânulos com menos de 10 μm de diâmetro correspondem a cerca de um terço do peso total do amido. A presença dos dois tipos de grânulos no grão de trigo foi confirmada por Baruch *et al.* (1979). Os autores observaram que o tamanho dos grânulos de amido era afetado por mudanças sazonais, assim como ocorre na produção dos grãos e na concentração de proteínas. Os grânulos de amido ocupam somente uma pequena fração do plastídio total durante o desenvolvimento inicial do grão; porém, atingem quase 93% na maturidade (Briarty *et al.*, 1979). No endosperma maduro, os grânulos de amido do tipo-A equivalem a apenas 3% do número total de grânulos. No entanto, representam de 50% a 70% do peso total em função do maior tamanho (Evers e Lindley, 1977). Os grânulos menores do tipo-B constituem 97% do total de grânulos, mas equivalem a apenas 25% a 50% do peso total.

Os grânulos de amido isolados também contêm proteínas, sendo que a maior parte pode ser removida por meio de lavagens sucessivas com água. Uma pequena parte das proteínas, porém, permanece associada ao grânulo. Lowy *et al.* (1981) evidenciaram que essa fração de proteínas pode ser extraída rapidamente com uma solução salina e sugeriram estar associada à superfície do grânulo de amido. Essa fração que pode ser extraída equivale a 8% do total de proteínas do grânulo de amido. A fração maior de proteína apresentou massa molecular de cerca de 30.000 Da e é encontrada nos dois tipos de grânulos de amidos, A e B. Baseada nas análises de aminoácidos, esta proteína é muito diferente daquela encontrada no glúten do trigo. Uma fração adicional de proteínas foi extraída de grânulos de amido do tipo-A, mas somente após a gelatinização na presença de sulfato de dodecil de sódio. Essa fração era muito diferente e, baseada na análise por eletroforese, considerou-se ser parte de componentes internos do grânulo.

B. Grânulo de amido

Seu formato é característico e dependente do gênero e da espécie (Ellis, 1998). O formato e o tamanho dos grânulos de amido variam em diferentes cereais (Tabela 1.1). A distribuição de tamanhos dos grânulos de amido

nos amiloplastos, a composição e suas propriedades se alteram durante o desenvolvimento. Os grânulos de amido grandes tipo-A de trigo, cevada e centeio são lenticulares, enquanto os de tipo-B, menores, são esféricos ou poliédricos. Os grânulos de amido de arroz, aveia e milho são irregulares e poliédricos em seus formatos, sendo os de arroz comparáveis em seu tamanho aos grânulos de amido tipo-B do trigo e da cevada, enquanto os de milho são maiores (Ellis, 1998). O amido é composto de amilose e amilopectina, sendo que o teor de amilose varia de 20% a 30% para a maioria dos amidos de cereais (Katz *et al.*, 1993). No caso de algumas variedades de milho, cevada e arroz, o amido é composto, quase exclusivamente, de amilopectina e é chamado de amido ceroso. Amido de milho com alto teor de amilose também é encontrado.

TABELA 1.1 Estrutura e conteúdo de amilose de alguns grânulos de amido de cereais

Fonte	Formato do grânulo	Tamanho do grânulo (nm)	Conteúdo de amilose (%)
Trigo	Lenticular ou redondo	20-25	22
Milho	Redondo ou poliédrico	15	28
Milho ceroso	Redondo	15 (5-15)	1
Alto teor de amilose	Redondo ou formato de salsicha irregular	25	52
Cevada	Redondo ou elíptico	20-25	22
Arroz	Poligonal	3-8	17-19 ^a 21-23 ^b
Aveia	Poliédrico	3-10	23-24

^a Japônica

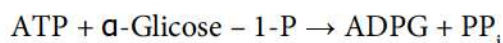
^b Indica

Fonte: Adaptado de Lineback (1984).

Parte da amilose no grânulo de amido está complexada com lisofosfolipídeos, como função do estágio de desenvolvimento do endosperma, durante o qual a amilose é formada (Morrison, 1993). Nos grânulos de amido do tipo-B esse processo dá-se mais tarde do que no desenvolvimento de grânulos do tipo-A. As proporções de amilose e de lisofosfolipídeos aumentaram tanto nos grânulos de amido de tipo-A quanto no tipo-B durante o desenvolvimento dos grãos de trigo e cevada (Morrison e Gadan, 1987; McDonald, 1991).

C. Biossíntese do amido

A sacarose é considerada a maior fonte de carbono na síntese do amido em endospermas de cereais e é convertida em amido por meio de uma série de reações catalisadas por enzimas (Duffus, 1993). A síntese do amido é obtida pela ação da amido sintase que utiliza adenosina difosfatoglicose (ADPG) ou uridina difosfatoglicose (UPDG) como substrato (Recondo e Leloir, 1961). A ADPG parece ser a doadora de glicosil mais ativa, e é formada pela ação de ADPG-pirofosforilase (Preiss e Levi, 1979).



A quantidade de pirofosfato inorgânico (PP_i) em grãos em desenvolvimento é controlada pela enzima alcalina pirofosfatase inorgânica (EC 3.6.1.1). Esta enzima, que limita o acúmulo de PP_i, era considerada o fator controlador da síntese do amido, uma vez que PP_i inibia a ADPG-pirofosforilase em milho doce (Amir e Cherry, 1972). As atividades do ADPG-pirofosforilase e da pirofosfatase alcalina foram estudadas por Kumar e Singh (1983) durante o desenvolvimento do grão de trigo. Os resultados, mostrados na Figura 1.3, indicam que ambas as enzimas aumentaram regularmente alcançando seu máximo 28 dias após a antese, mas, em seguida, declinaram até a maturidade. O aumento rápido na atividade de pirofosfatase alcalina 14 dias depois da antese correspondeu ao período de síntese rápida do amido. A inabilidade dos metabólitos intermediários da conversão sacarose-amido para inibir a atividade da pirofosfatase alcalina eliminou qualquer atividade regulatória possível desta enzima na

biossíntese do amido.

D. Conversão de amido em sacarose nos grãos em desenvolvimento

A quantidade de açúcares livres formados durante o desenvolvimento do trigo foi examinada por Kumar e Singh (1981), em função do tamanho do grão e do conteúdo de amido. Seus resultados, resumidos na Figura 1.4, indicam que a sacarose alcançou o nível máximo 14 dias após a antese, e, então, diminuiu e estabilizou após 28 dias.

A síntese do amido foi muito baixa após 7 dias, porém aumentou significativamente depois de 14 dias e a ascensão continuou até 35 dias depois da antese. O rápido declínio da sacarose e dos açúcares redutores depois que a síntese de amido começou sugere o envolvimento de enzimas hidrolíticas, incluindo a invertase. Kumar e Singh (1980) observaram que a atividade dessa enzima diminuiu para níveis negligenciáveis após 21 dias, comparado ao rápido aumento da sacarose-UDP glicosil transferase (Figura 1.5). Esta última enzima, também conhecida como sacarose sintetase, catalisa o primeiro passo na formação de amido a partir da sacarose, como será descrito nesta seção. As atividades paralelas da sacarose-UDP glicosil transferase e a síntese do amido indicaram que esta enzima teve uma participação maior na hidrólise da sucralose. Kumar e Singh (1984) sugeriram que a função inicial da invertase é fornecer substratos para as vias metabólicas que geram compostos ricos em energia necessários para sustentar a alta atividade de divisão celular.

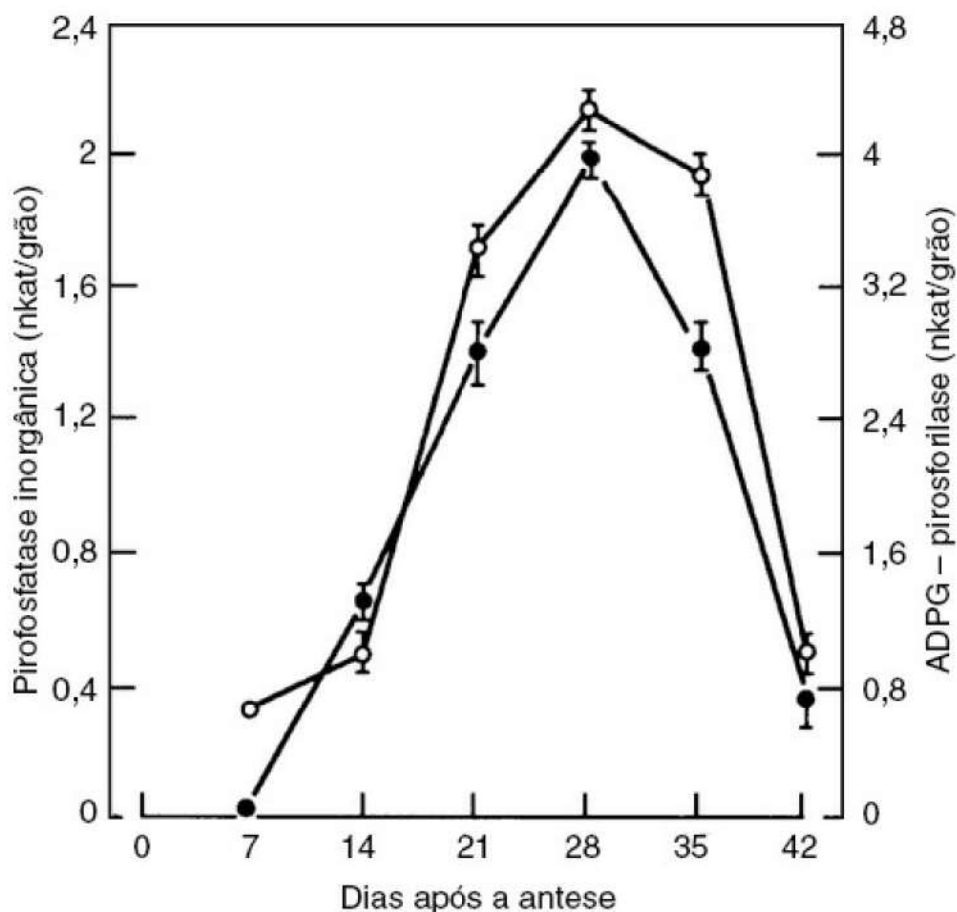


FIGURA 1.3 Atividade da pirofosfatase alcalina inorgânica (o) e ADGP-pirofosforilase (•) durante o desenvolvimento do grão de trigo. Kumar e Singh (1983).

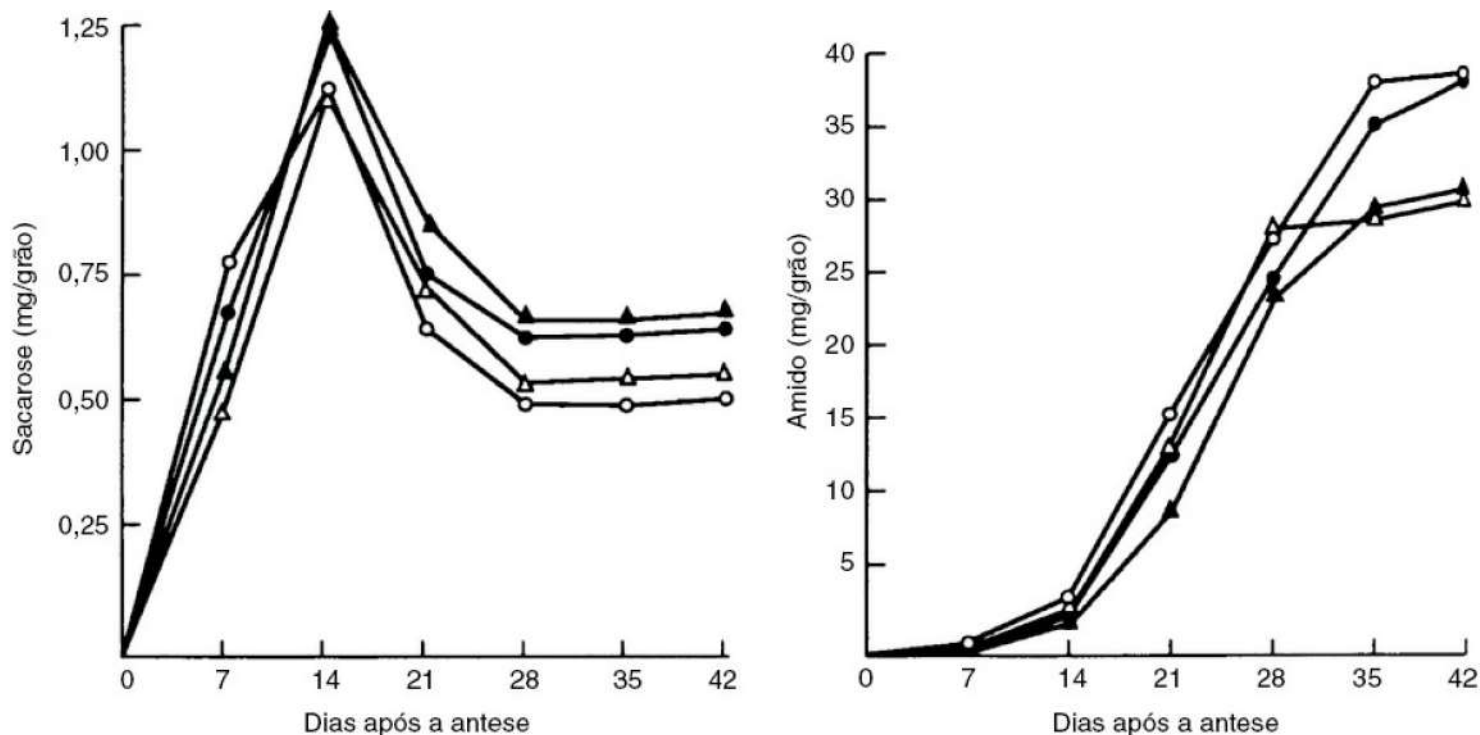


FIGURA 1.4 Alterações da sacarose e do amido (mg por grão) durante o desenvolvimento de quatro variedades de grãos de trigo. Kumar e Singh (1981).

Chevalier e Lingle (1983) relataram que a invertase insolúvel foi encontrada principalmente no pericarpo externo com pouca atividade no endosperma (Figura 1.6). Eles monitoraram a atividade da sacarose sintetase, localizada predominantemente no endosperma. Com núcleos de grãos inteiros de trigo, Kumar e Singh (1980) monitoraram a atividade de invertase nos estágios iniciais do desenvolvimento do grão, assim como a atividade da sacarose sintetase durante o amadurecimento do grão. Chevalier e Lingle (1983) localizaram um aumento de sacarose livre em núcleos de cevada e trigo maduros, resultado consistente com pesquisa anterior realizada com trigo (Cerning e Guilbot, 1973), cevada (Laberge *et al.*, 1973) e arroz (Singh e Juliano, 1977). O grande aumento da concentração de sacarose, observado por Lingle e Chevalier (1980), no fragmento de endosperma, foi acompanhado por uma diminuição da atividade de sacarose sintetase. Este declínio da atividade da sintetase foi considerado um fator importante no controle do conteúdo do grão, e parece ser responsável pelo acúmulo de sacarose em espaços extracelulares, como a cavidade do endosperma, uma vez que o endosperma encontrava-se incapacitado de utilizar a nova sacarose. O efeito geral era de evitar que mais sacarose entrasse no núcleo.

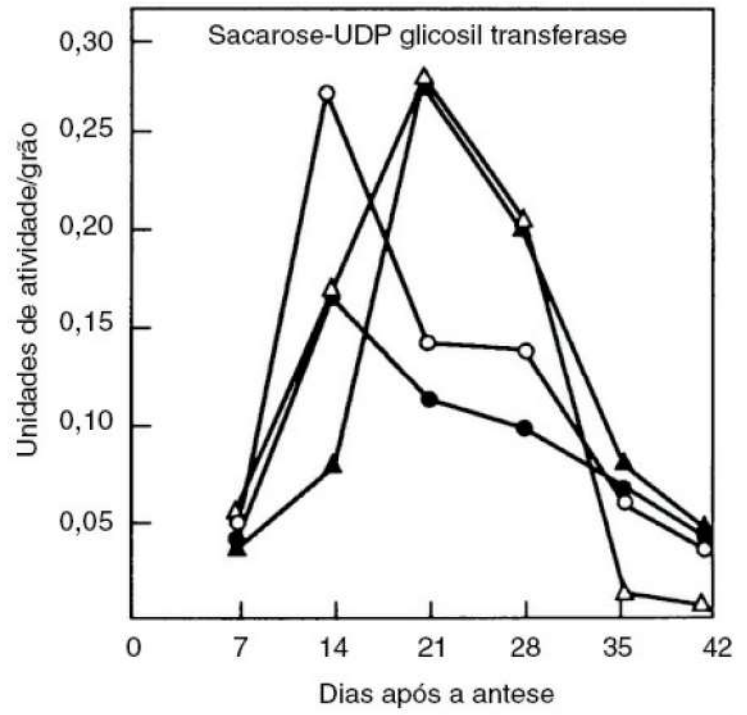
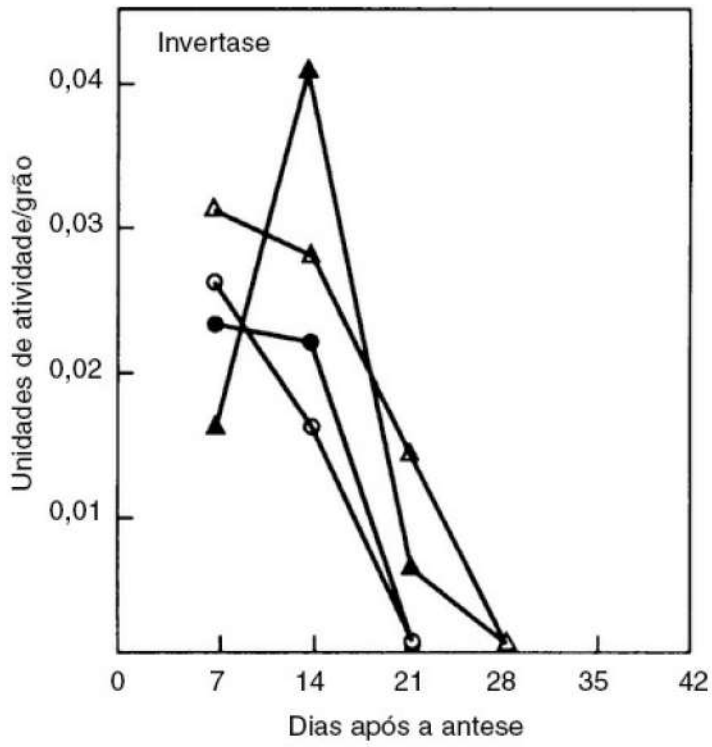


FIGURA 1.5 Alterações na invertase e sacarose-UDP glicosil transferase durante o desenvolvimento de grãos de trigo. *Kumar e Singh (1980)*.

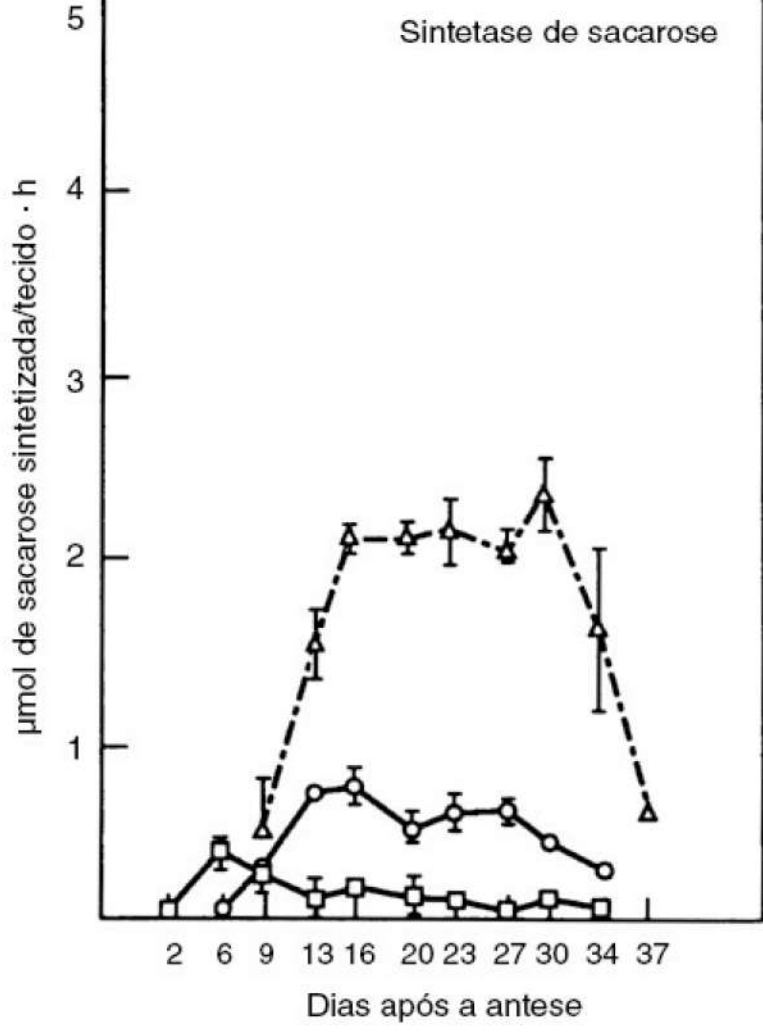
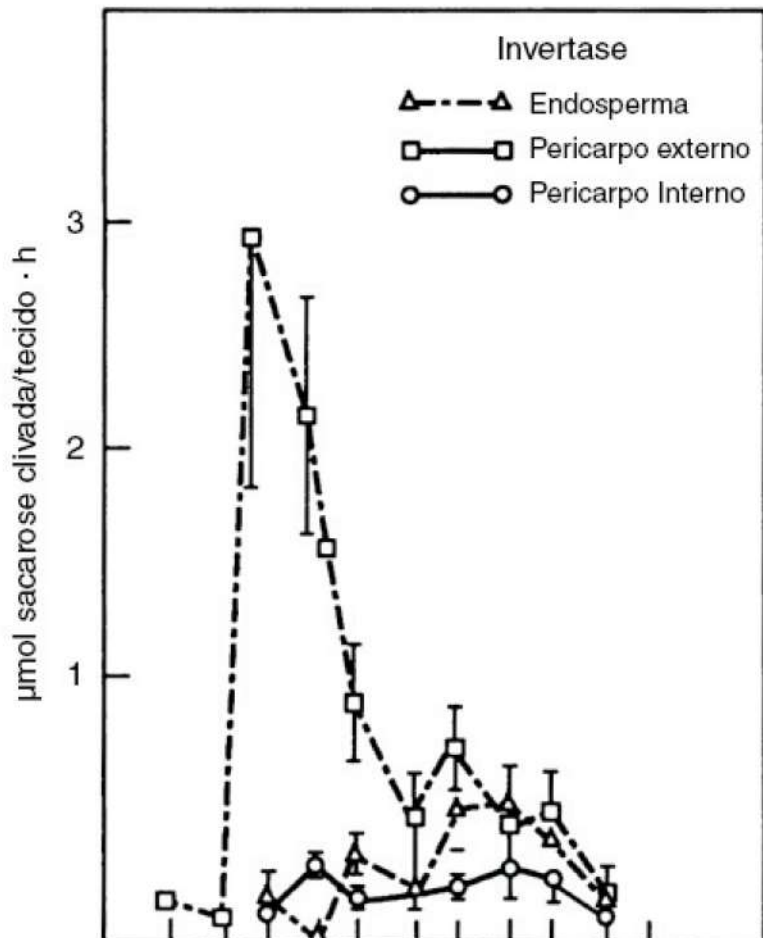
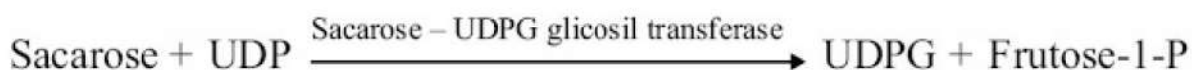


FIGURA 1.6 Distribuição das atividades da invertase e sacarose sintetase no endosperma e pericarpo de grãos de trigo em desenvolvimento. Reproduzida de Chevalier e Lingle (1983).

Kumar e Singh (1984) confirmaram o acúmulo de sacarose em até 14 dias após a antese, o que representa rápida realocação das partes fotossintéticas para o endosperma do trigo, seguido pela síntese ativa de amido. Trabalhos anteriores de Chevalier e Lingle (1983) haviam demonstrado o movimento da sacarose do floema ao endosperma durante o desenvolvimento dos núcleos do trigo e da cevada. Utilizando fatias de endosperma do trigo, Rijven e Gifford (1983) também observaram que a sacarose é o substrato preferido para a síntese de amido, já que não havia sido hidrolisado antes de ser absorvido pelo endosperma.

E. Síntese do amido

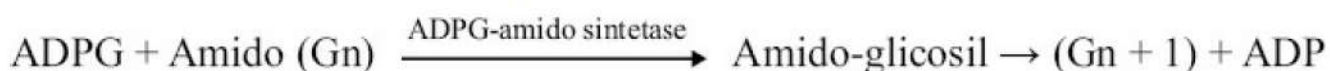
A síntese do amido *in vivo* envolve a enzima fosforilase ou a sintetase conduzindo à formação do polímero linear de amilose. Depois que a sacarose penetra no endosperma, ele se transforma no ponto de partida para a síntese da amilose. O primeiro passo envolve a conversão de UDPG pela sacarose sintetase (sacarose-UDP glicosil transferase):



Depois, a frutose-1-P é convertida em glicose-1-P pela fosfoglicoisomerase, hexoquinase e fosfoglicomutase. Glicose-1-P é metabolizada para ADPG por ADPG-pirofosforilase:



A ausência de PP_i detectável sugere que ele é rapidamente hidrolisado pela pirofosfatase, uma vez que, como já foi mencionado, ele é um potente inibidor de ADPG-fosforilase (Amir e Cherry, 1971). A síntese da amilose, como discutido anteriormente, pode ser diretamente mediada pela amido sintetase envolvendo o UPDG ou, de maneira indireta, pela ADPG amido-sintetase para ADPG por meio da glicose-1-P:



No entanto, parece que a reação que utiliza ADPG é a via preferencial para a biossíntese do amido em grãos de trigo em desenvolvimento (Kumar e Singh, 1984). Nesta reação, a glicose é repetidamente transferida do ADPG para uma pequena cadeia de glucana, até que uma cadeia alongada de amido seja formada. A quantidade extremamente pequena de glicose-1-P no grão em desenvolvimento sugere que ela é utilizada com rapidez e indica, portanto, uma possível função regulatória da fosfoglicomutase, a enzima responsável pela sua formação na biossíntese do amido. Kumar e Singh (1984) demonstraram definitivamente que o término do acúmulo de amido em grãos de trigo maduros ocorre em função da perda da capacidade de síntese do endosperma e não por falta de sacarose.

Joshi *et al.* (1980) tentaram explicar a regulação da biossíntese do amido no milho normal e no tipo Opaco-2 durante o desenvolvimento do endosperma. O milho do tipo Opaco-2 é muito superior em termos nutricionais, apesar de produzir menor quantidade de grãos e ter conteúdo de amido e proteína inferiores. Os pesquisadores monitoraram a atividade da sacarose-UDP glicosil transferase, glicose 6-fostato cetoisomerase e ADPG-amido glicosil transferase solúvel e ligada no desenvolvimento do endosperma durante 30 dias após a polinização. Exceto pela sacarose-UDP glicosil transferase, todas as outras enzimas estavam em menor concentração no milho Opaco-2, se comparado com o milho normal durante os últimos estágios do desenvolvimento do endosperma. A atividade mais baixa dessas enzimas foi responsável pela quantidade reduzida de amido no milho Opaco-2, que continha 15% menos amido no endosperma. Este processo foi acompanhado por diminuição da síntese proteica

no endosperma de milho tipo Opaco-2, fato que esclarece a reduzida atividade de síntese de enzimas durante os estágios posteriores do desenvolvimento do endosperma.

F. Síntese de amido: Amilopectina

A biossíntese da cadeia ramificada de amilopectina requer a formação de amilose via fosforilase ou sintetase, como descrito na seção anterior. Os pontos de ramificação na posição α -(1,6)-d-ligação glicosídica são introduzidos na amilopectina pela enzima ramificadora enzima-Q (EC 2.4.1.18). Borovsky *et al.* (1979) concluíram que a introdução dos pontos de ramificação em 1,6 é um processo randômico no qual a enzima-Q interage com duas cadeias de glucana 1,4 mantidas unidas na conformação de dupla hélice.

A amilose e a amilopectina são sintetizadas ao mesmo tempo na razão de 1:4 em amidos normais (Robyt, 1984). Muitas hipóteses foram desenvolvidas para esclarecer a simultaneidade da amilose e da amilopectina no grânulo de amido, apesar de nosso entendimento da biossíntese do amido permanecer incompleta (Erlander, 1958; Geddes e Greenwood, 1969; Marshal e Whelan, 1970). Uma das hipóteses sugere que um mecanismo opera para proteger o polímero linear da enzima ramificadora (Whela, 1958; 1963). A participação de fosfolipídeos na regulação da síntese da amilopectina foi formulada por Vieweg e De Fekete (1976), uma vez que os fosfolipídeos inibem a ação da enzima ramificadora. Assim, somente a amilose, sem fosfolipídeos agregados a ela, pode, teoricamente, ser convertida, apesar deste fato ainda não ser comprovado. Outra hipótese, já discutida, é a possível especificidade da enzima ramificadora pela conformação em dupla hélice envolver as cadeias de amilopectina mais curtas (Borovsky *et al.*, 1979; Robyt, 1984).

G. Corpos proteicos

Corpos de proteína são organelas unidas às membranas celulares, que contêm proteínas de reserva no endosperma amiláceo dos cereais (Pernollet, 1978; 1982). Eles também são encontrados na camada de aleurona, apesar de possuírem composição, estrutura e funções diferentes das anteriores. Enquanto os corpos de reserva de proteínas do endosperma exercem somente a função de armazenamento, os da camada de aleurona desempenham funções sintéticas e de secreção (Simmons e O'Brien, 1981). Os corpos de proteínas da camada de aleurona possuem diâmetro de 2 μm a 4 μm com inclusões globoides e cristalinas. Tais diferenças foram confirmadas em trigo, cevada, milho e arroz pelo exame de suas diferenças ultraestruturais, conforme indicado na Tabela 1.2.

Em tipos da espécie *Triticum*, corpos de proteínas desaparecem quando os grãos ficam maduros, como foi observado em sementes de trigo (Simmonds, 1972; Pernollet e Mossé, 1983) e em sementes de centeio (Parker, 1981). Tal fato resulta na conversão dos grânulos de proteínas esféricos em massas de proteínas com formatos irregulares que, por sua vez, dão origem à matriz proteica, que não estão mais unidas pela membrana que se encontrava entre os grânulos de amido.

H. Origem dos corpos proteicos

A origem dos corpos proteicos no endosperma ainda não foi esclarecida. A opinião da maioria dos pesquisadores é de que surgem do retículo endoplasmático rugoso (RER) (Campbell *et al.*, 1981; Mifflin *et al.*, 1981; Mifflin e Burgess, 1982; Parker e Hawes, 1982), apesar de Bechtel *et al.* (1982a; 1982b) afirmarem que são secreções de proteínas de reserva no trigo. Independente do mecanismo sugerido, a iniciação e a formação dos corpos proteicos envolvem uma ativa participação do Complexo de Golgi. Pernollet e Camilleri (1983) examinaram a formação e o desenvolvimento dos corpos proteicos no endosperma do trigo e descobriram que os polipeptídeos armazenados

em todos os corpos proteicos são similares. Em pesquisa anterior feita por Tanaka *et al.* (1980), há a sugestão de que somente um tipo de proteína era armazenado no endosperma do trigo.

A presença de todas as células de armazenagem de proteínas nos corpos proteicos, no entanto, indicava uma via de síntese comum em operação nas sementes de trigo. Os polipeptídeos nas estruturas de proteína eram similares àquelas presentes no retículo endoplasmático, sugerindo, assim, que as proteínas de reserva eram proteínas secretórias liberadas no retículo endoplasmático antes de serem deslocadas para os corpos proteicos. Este modelo entrava em conflito com o proposto por Bechtel *et al.* (1982a; 1982b) para a síntese de gliadina solúvel, entretanto era coerente com os estudos feitos por Greene (1981) e Donovan *et al.* (1982). Estes pesquisadores afirmavam que os RNAs do mensageiro que codificavam as moléculas de gliadina transformavam-se em polissomos ligados ao retículo endoplasmático.

Três estágios diferentes foram percebidos por Pernollet e Camilleri (1983) durante o desenvolvimento dos corpos proteicos do trigo. O estágio inicial envolveu a síntese das proteínas de estocagem e sua associação com pequenas vesículas em estruturas de 5-10 μm no primeiro mês após a antese. No segundo estágio, a formação de pequenos corpos proteicos diminuiu, e eles se juntaram e formaram corpos muito maiores (50-100 μm). A instabilidade da membrana dos grandes corpos proteicos e a pressão mecânica dos grânulos de amido em desenvolvimento provocaram o rompimento da membrana e a conseqüente liberação dos corpos proteicos para o interior da matriz de proteína. A perda dos corpos proteicos e a formação da matriz de proteínas caracterizam o estágio final de desenvolvimento do endosperma de trigo maduro. O modelo proposto por Pernollet e Camilleri (1983), na Figura 1.7, resume a seqüência de eventos que conduzem à formação de corpos proteicos no trigo e seu eventual rompimento.

TABELA 1.2 Diferenças ultraestruturais entre corpos proteicos da camada de aleurona e do endosperma amiláceo

Espécies	Camadas de aleurona		Endosperma	
	Diâmetro (μm)	Estruturas	Diâmetro (μm)	Estruturas
Trigo	2-3	Dois tipos de inclusões	0,1-8	Nenhuma inclusão; estrutura granular
	4-5	Um globoide e um cristalóide	1-2	Nenhuma inclusão; estrutura granular
Cevada	2-3	Dois tipos de inclusão	2	Nenhuma inclusão; estrutura lamelar
	4-5	Um globoide e um cristalóide	1-1	Nenhuma inclusão; homogênea
Arroz	1,5-4	Globoide	2-5	Nenhuma inclusão; homogênea
	1-3	Globoide	2-5	Nenhuma inclusão; homogênea
Milho			1-2	Nenhuma inclusão; homogênea

Adaptado de Pernollet (1978). Reimpresso com autorização. Copyright ©: Pergamon Press.

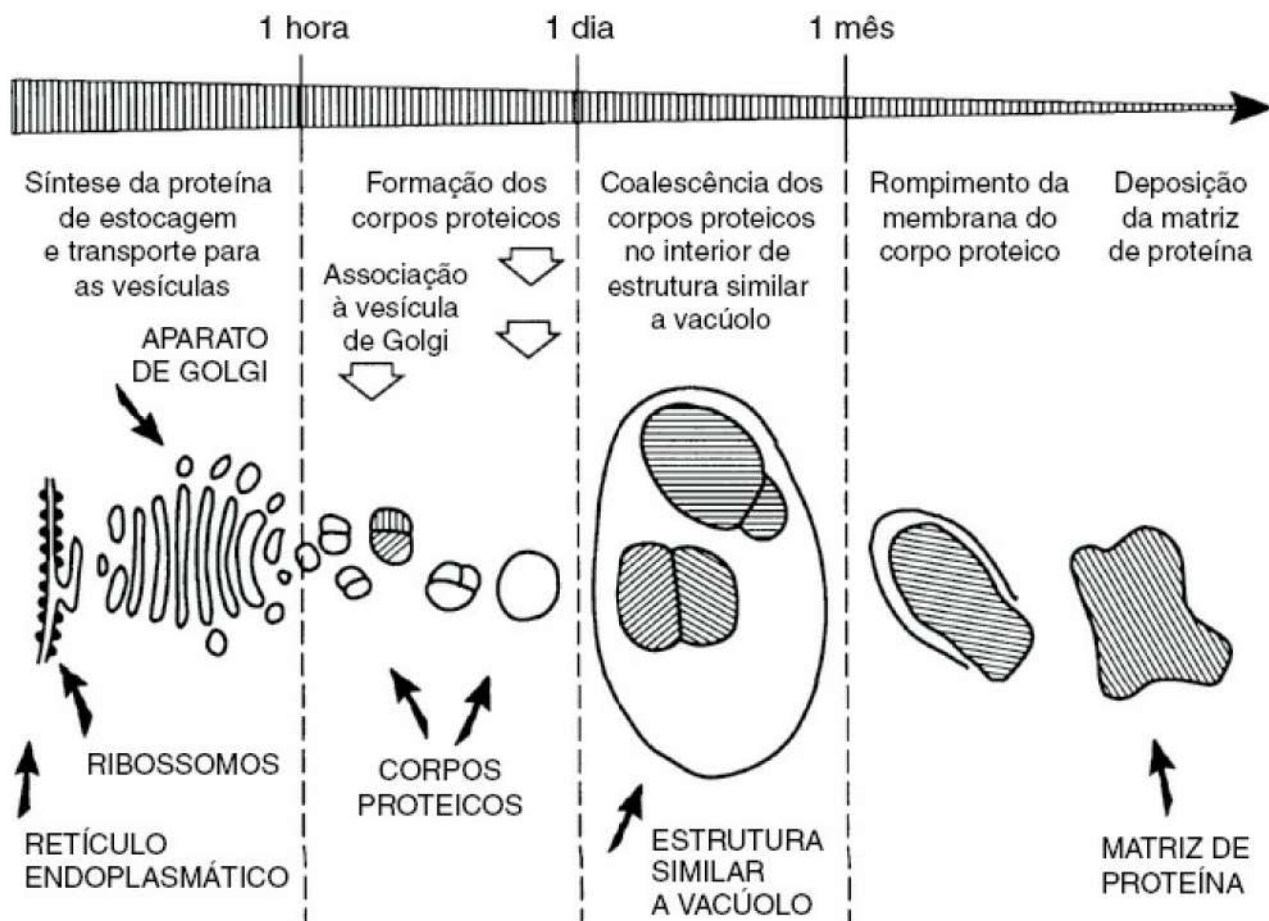
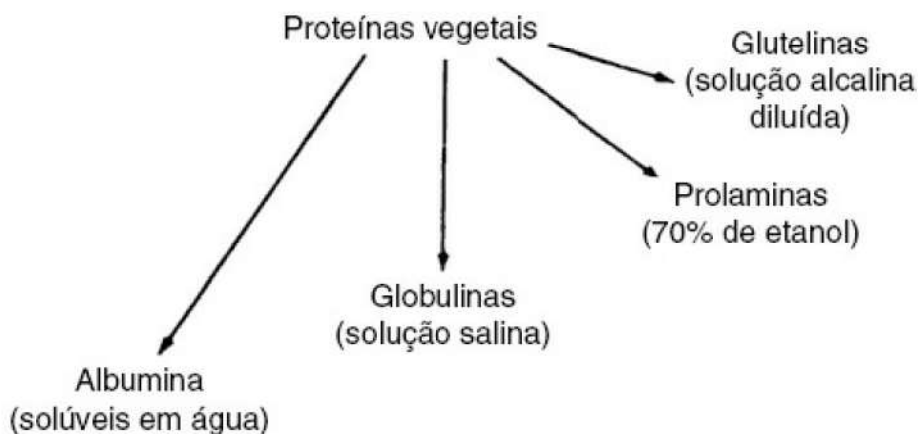


FIGURA 1.7 Diagrama esquemático da formação e evolução dos corpos proteicos do endosperma de trigo. Pernollet e Camilleri (1983).

Os corpos proteicos da cevada assemelham-se aos do trigo e diferem significativamente daqueles do milho, no qual a membrana tem origem no retículo endoplasmático que encobre por completo os corpos proteicos. Esta característica difere do trigo e da cevada, nos quais o retículo endoplasmático é rompido pelos agregados dos corpos proteicos, que não são totalmente encobertos por tal membrana. Oparka e Harris (1982) relataram que os corpos proteicos do arroz ficam envoltos por uma membrana derivada do retículo endoplasmático.

I. Classificação das proteínas vegetais

As proteínas vegetais foram classificadas pela primeira vez por Osborne (1895) como albumina, globulina, prolamina e glutelina, com base em sua solubilidade em diversos solventes, como resumido no Esquema 1.1.



ESQUEMA 1.1

Várias modificações foram introduzidas desde então para melhorar a extração dessas frações. A prática mais comum envolve a extração da fração combinada de albumina-globulina como proteína solúvel em sal, enquanto as prolaminas são extraídas com solução aquosa de 1-propanol ou 2-propanol mais um agente redutor (Shewry *et al.*, 1980). Este método é apropriado para o estudo de genética básica dos produtos, mas é totalmente inapropriado do ponto de vista tecnológico, uma vez que agentes redutores resultam em novas ligações de dissulfeto que alteram a solubilidade das frações. Para evitar a desnaturação da fração de glutelina por extração alcalina, são utilizadas, como alternativa, soluções tampão contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) com pH igual a 10 (Moreaux e Landry, 1968). As proporções relativas das frações de proteínas nas sementes de trigo, cevada, milho e centeio, de acordo com Osborne, estão resumidas na Tabela 1.3.

TABELA 1.3 Proporções relativas (%) das frações de proteína nas sementes de cereais, de acordo com Osborne

Cereal	N Não-proteico	Albuminas	Globulinas	Prolaminas	Glutelinas	Resíduos
Cevada ^a	11,6		15,6	45,2	18,0	5,0
Trigo ^b		33,1		60,7		6,2
Milho ^a	4,4	0,9	1,5	55,4	22,9	-
Arroz ^c		15,7		6,7	61,5	15,4
Aveia ^d	11		56	9	23	-

^a% Total de sementes N (%)

^b% Sementes recuperadas N (%)

^c% Total de proteínas (%)

^d% Proteínas recuperadas (%)

Fonte: Bright e Shewry (1983); com permissão.

J. Prolaminas

As principais proteínas de armazenamento presentes no endosperma amiláceo do trigo, cevada e milho são as prolaminas, solúveis em álcool. Elas representam de 30% a 60% do total de nitrogênio do grão, dependendo da espécie, do estado nutricional e genótipo da planta (Bright e Shewry, 1983; Shewry *et al.*, 1981). As frações de prolamina identificadas nas diferentes espécies de cereais estão descritas na Tabela 1.4.

A denominação prolamina deriva de seu alto conteúdo, não usual, de prolina e de nitrogênio amida (glutamina). Ela é deficiente do aminoácido essencial lisina. Aveia e arroz diferem substancialmente de outros cereais por possuírem pouca prolamina (5% a 10%), e apresentam maior quantidade de globulina e de proteína similar à glutelina, respectivamente. Estes cereais, portanto, possuem maior quantidade de lisina, o que os torna superiores em termos nutricionais. Uma separação por eletroforese das diferentes frações de prolamina, baseada em seu tamanho molecular, é feita por eletroforese com gel de acrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Este método permite a identificação de diferentes perfis de polipeptídeos nas prolaminas, que variam significativamente entre diferentes cultivares da mesma espécie. PAGE é uma técnica muito utilizada na identificação da diversidade de sementes de trigo e cevada. Quando as diferenças são mínimas, a focalização isoeletrica bidimensional (IEF) e a PAGE podem ser aplicadas de modo efetivo.

Utilizando os procedimentos supracitados, os polipeptídeos identificados para frações de prolamina no trigo, cevada e milho estão resumidos na Tabela 1.5.

TABELA 1.4 Frações de prolamina em grãos de cereais

Espécies	Nome trivial
Trigo	Gliadina
Milho	Zeina

Cevada	Ordeína
Aveia	Aveninas

TABELA 1.5 Frações de prolamina do trigo, cevada e milho

Trigo	MM	Cevada	MM	Milho	MM
α -Gliadina	32.000	b-hordeína	35.000-46.000	20K	20.000-21.000
β -Gliadina	40.000	c-hordeína	45.000-72.000	22K	22.000-23.000
ω -Gliadina	40.000-72.000	d-hordeína	100.000	9K	9.000-10.000
Subunidades HMM	95.000-136.000			14K	13.000-14.000

MM: Massa molecular; HMM: Alta massa molecular

As gliadinas do milho estão classificadas em dois grupos, segundo sua mobilidade eletroforética em baixo pH. O primeiro grupo inclui a fração mais rápida, a α -gliadina, seguido pela β - e ω -gliadinas, enquanto o segundo grupo, com uma massa molecular aparente muito maior (95-136.000), é chamado de unidade de alta massa molecular (HMM). Todas as frações de gliadina são deficientes em lisina e treonina. Três grupos de proteína hordeína foram separados da cevada por SDS-PAGE e designados como B, C e D. Eles diferem entre si quanto à massa molecular aparente e à composição de aminoácidos (Mifflin e Shewry, 1977). A fração C contém apenas traços de aminoácidos sulfurados, ao passo que a fração D é rica em glicina (13%). O conteúdo de lisina é particularmente baixo em todas as frações de proteína hordeína (< 1%), enquanto as hordeínas B e C também são deficientes em treonina.

O componente zeína da proteína do milho, apesar de não estar bem definido, é composto de duas frações maiores e de duas menores. As duas frações maiores têm massa molecular aparente equivalente a 20.000-21.000 e 22.000-23.000, enquanto as frações menores têm de 9.000-10.000 e de 13.000-14.000 e são designadas como zeína de 22K, 9K e 14K, respectivamente. Todas são deficientes em lisina. Ao contrário dos outros grãos de cereais, a maior quantidade de proteínas de estocagem da aveia está nas globulinas 12S e 7S, sendo que as prolaminas correspondem a menos de 15% do total de nitrogênio do grão (Peterson e Smith, 1976). Burgess e Mifflin (1985) demonstraram que a globulina 7S é encontrada principalmente no embrião, enquanto a globulina 12S, a fração maior, é predominante no endosperma. Com base na SDS-PAGE, parece que as frações de globulina e de prolamina estão localizadas em diferentes corpos proteicos.

K. Síntese de proteína

O desenvolvimento da semente do cereal e a síntese da proteína estão associados a pelo menos três fases. A primeira fase é caracterizada por uma rápida divisão das células, na qual a síntese da proteína permanece muito baixa. Quando a divisão de células cessa, há aumento do RER e acúmulo de nucleotídeos solúveis (Briarty *et al.*, 1979; Jenner, 1968), resultando em uma síntese rápida de proteínas de estocagem relacionada com a iniciação e a síntese do RNA mensageiro (mRNA) assim como com a eficiência da tradução do mRNA. O acúmulo de mRNA em sementes de trigo em desenvolvimento foi correlacionado com a síntese de proteína por Greene (1983). Usando uridina [5-³H] e leucina L-[³H] marcadas, o autor estudou a síntese, o funcionamento e a estabilidade dos RNAs das proteínas de estocagem. Três fases de desenvolvimento foram identificadas:

1. Mudança da síntese de proteína de não estocagem, da semente, para proteína de estocagem.
2. Aumento da taxa de acúmulo de poli(A)+RNA.
3. Aumento do nível de transcrição de mRNA.

Uma relação direta entre níveis de mRNA e taxa de síntese proteica pode ser vista na Figura 1.8. A síntese do peptídeo gliadina foi predominante a partir do 15º até o 25º dia após a floração e acompanhou o aumento de poli(A)+RNA. Assim, a expressão do gene da proteína de estocagem, no endosperma do trigo, é um processo

mRNA-limitante, baseado na quantidade de proteína de estocagem que o mRNA sintetizou perto do final da divisão das células de endosperma. Okita e Greene (1982) haviam identificado previamente mRNA, em trigo Cheyenne, responsáveis pela síntese de gliadina 20 a 25 dias depois da antese. Para uma revisão mais detalhada das proteínas de cereais, recomenda-se a leitura do artigo de Laszity (1984).

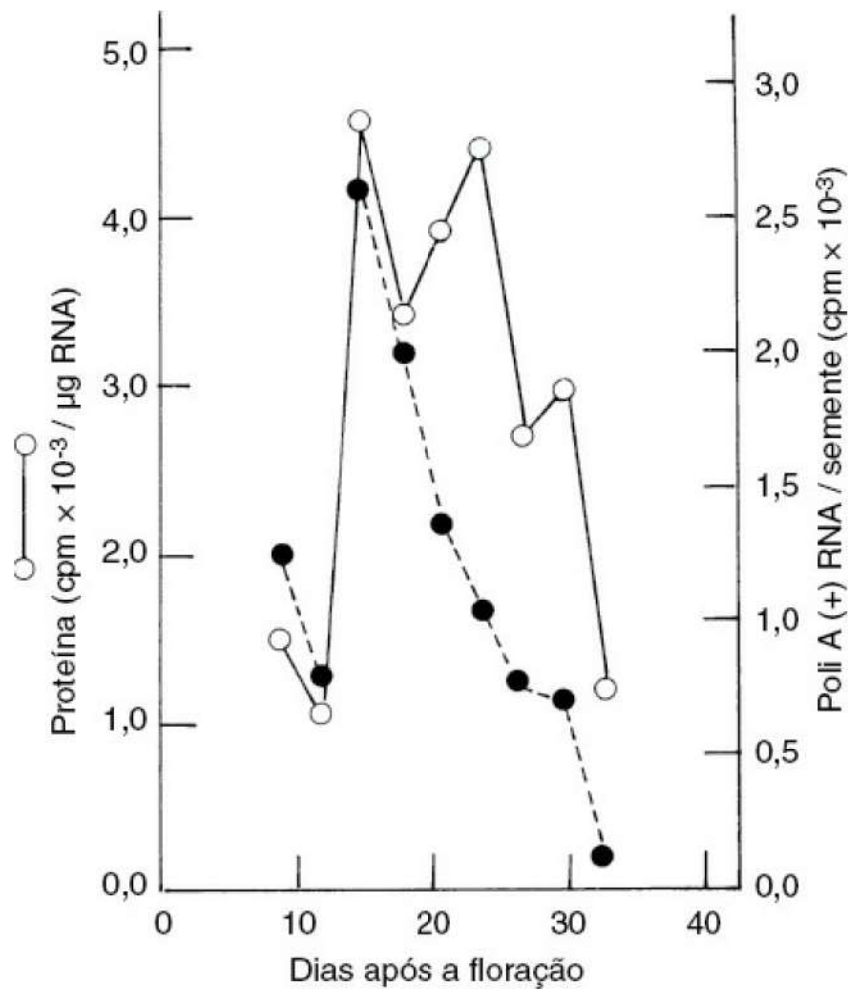


FIGURA 1.8 Perfis do desenvolvimento do acúmulo de poli(A) + RNA e da capacidade de síntese de proteínas *in vitro* do trigo. Greene (1983).

L. Lipídeos

Os lipídeos são distribuídos por todo o grão de cereal como parte das membranas intracelulares e esferosomas. Eles são estocados como gotículas ricas em triglicerídeos nos esferosomas da camada de aleurona que ficam agrupados ao redor da aleurona dos grãos ou no plasmalema (Buttrose, 1971; Chamura, 1975; Morrison *et al.*, 1975; Morrison, 1978). Os esferosomas também estão presentes no embrião, no escutelo e no coleóptilo (Buttrose e Soeffly, 1973; Jelseman *et al.*, 1974). Os lipídeos também são encontrados nos grânulos de amido, predominantemente como monoacil lisofosfatidil etanolamina e lisofosfatidicolina e também como complexos de inclusão com amilose no interior do grânulo. Aparentemente há uma correlação entre o conteúdo de amilose e de lipídeos nos cereais; por exemplo, o milho ceroso contém pouco conteúdo de lipídeos enquanto o amido com alto teor de amilose possui maior quantidade de lipídeos do que o amido no milho comum (Acker e Becker, 1971). A distribuição de lipídeos em grãos de cereais maduros pode ser verificada na Tabela 1.6.

Os principais ácidos graxos presentes em grãos com alto teor de lipídeos são os ácidos linoleico, oleico, palmítico e linolênico, em ordem de conteúdo decrescente (Price e Parsons, 1975). Os lipídeos de cereais podem ser separados em lipídeos polares e não polares por fracionamento com solvente. No caso de trigo vermelho duro,

Waldron, por exemplo, os lipídeos polares e não polares correspondiam a 49,6% e 50,4% do total de lipídeos, respectivamente (Hargin e Morrison, 1980). A distribuição das frações de lipídeos no interior dos tecidos de trigo é mostrada na Tabela 1.7.

Os germes contêm um terço do total de lipídeos do trigo, 80% dos quais são triglicerídeos neutros. Os lipídeos da aleurona, no entanto, representam um quarto do total de lipídeos, dos quais 80% são de natureza não polar. O endosperma, porém, contém quase a metade dos lipídeos dos grãos inteiros. O amido do endosperma é associado a 15,6% do total de lipídeos, dos quais 96% são fosfolipídeos. O fosfolipídeo associado ao amido, predominante no endosperma, é lisofosfatidil-colina (Hargin e Morrison, 1980).

TABELA 1.6 Conteúdo de lipídeos em grãos de cereais inteiros

Cereal	Lipídeos (%)
Trigo	1,8
Milho	0,4-1,7
Cevada	3,3-4,6
Aveia	5,4
Arroz	1,9-3,1

TABELA 1.7 Distribuição de lipídeos do trigo no interior dos tecidos^{a,b}

Lipídeos totais				Endosperma (44,8%)			
Germe (30,4%)		Camada de aleurona (24,8%)		Frações não associadas com amido (29,2%)		Amido (15,6%)	
Lipídeos não polares (24,1%)	Lipídeos polares (6,3%)	Lipídeos não polares (17,9%)	Lipídeos polares (6,9%)	Lipídeos não polares (9,7%)	Lipídeos polares (19,5%)	Lipídeos não polares (0,7%)	Lipídeos polares (14%)

^a Adaptado de Hargin e Morrison (1980).

^b Calculado e adaptado a partir de dados de Hargin e Morrison (1980). Os dados foram calculados como porcentagem do total de lipídeos.

A biossíntese de lipídeos inicia-se com a formação de ácidos graxos em um processo de múltiplas etapas, que envolve um complexo enzimático, a proteína carreadora de acil (ACP) ácido graxo sintetase. Assim que são sintetizados, são esterificados com glicerol formando triglicerídeos, os quais são uma fonte de energia importante durante a germinação dos cereais. Os lipídeos são responsáveis pela manutenção do embrião e da camada de aleurona nos estágios iniciais da germinação até que açúcares comecem a ser supridos pelo amido do endosperma.

IV. GERMINAÇÃO DE CEREAIS

A germinação de cereais é importante na indústria do malte, dependente de certo grau de degradação do amido. Na preparação de produtos de panificação, porém, é importante que a maioria dos grânulos se mantenha intacta. Assim, a germinação ou brotação de grãos de cereais afeta a classificação dos grãos de trigo e cereais em função dos danos causados. Segundo o *Grain Grading Primer* (US Department of Agriculture, 1957), a germinação de trigo é definida como “grãos que possuem a extremidade do germe rompido pela germinação ou grãos que tiveram os brotos removidos”. Tal circunstância ocorre com maior frequência em tempo úmido, em decorrência da elevação do conteúdo de umidade. A germinação do trigo anterior à colheita reduz o rendimento dos grãos e a qualidade da farinha, o que desencadeia efeito adverso nas propriedades de panificação da farinha, em função do aumento da hidrólise do amido da massa pela α -amilase (Buchanan e Nicholas, 1980). Se a atividade da α -amilase é excessiva, o pão produzido apresenta miolo úmido e pegajoso.

A. Mobilização de amidos de cereais por α -amilase

O grânulo de amido intacto do trigo é atacado por certas isoenzimas da α -amilase. Duas classes foram identificadas por Sargeant (1979) durante a germinação do trigo, sendo que uma delas hidrolisou os grânulos de amidos. Halmer (1985) considerou que desde que a hidrólise de amidos ocorre normalmente com grânulos de amidos solúveis e não em grânulos intactos, torna-se difícil relacionar a atividade amilolítica total, medida em laboratório, com a atividade de degradação dos grânulos dos grãos de cereal *in vivo*. A hidrólise de amidos por α -amilase é caracterizada pela endoclivagem de amilose e amilopectina (Abbott e Matheson, 1972).

B. Biossíntese da α -amilase durante a germinação

A importância da atividade de α -amilase em produtos de panificação e na indústria cervejeira tem exigido atenção redobrada na fase da secreção desta enzima durante a germinação. A maior controvérsia é se a biossíntese da α -amilase ocorre no escutelo ou na camada aleurona (Akazawa e Hara-Nashimura, 1985). No caso dos grãos de cevada, a formação de α -amilase *de novo* foi relatada como ocorrida em ambos, escutelo e camada de aleurona (Briggs, 1963; 1964; Chrispeels e Varner, 1967).

A biossíntese e a secreção desta enzima parecem envolver o hormônio vegetal giberelina GA_3 , o qual é produzido pelo embrião e desencadeia a produção de α -amilase assim como outras enzimas hidrolíticas na camada de aleurona (Briggs *et al.*, 1981). O aumento da atividade enzimática foi atribuído à elevação da quantidade de mRNA que codifica a α -amilase (Bernal-Lugo *et al.*, 1981; Higgins *et al.*, 1976). No caso do trigo, a camada de aleurona também se torna alvo de enzimas induzidas por hormônios, incluindo o aumento da síntese de α -amilase (Filmer e Varner, 1967; Melcher e Varner, 1971). Varty *et al.* (1982) descobriram que o hormônio vegetal ácido abscísico inibe a transcrição e a tradução do mRNA da α -amilase em tecidos de aleurona isolados de trigo, o que explica a capacidade de tal ácido de inibir a indução da α -amilase por GA_3 (Chrispeels e Varner, 1967). Estudos feitos por Raynes e Briggs (1985) apontaram aumento da produção de α -amilase em grãos de cevada descascados em grãos germinados com ou sem ácido giberélico. Seus resultados, mostrados na Figura 1.9, indicam que a produção e a atividade enzimática foram afetadas por GA_3 e K_2SO_4 . A presença de K_2SO_4 adiaria a destruição de α -amilase (Briggs, 1968). Baseadas nas pesquisas com o escutelo do arroz, o cálcio parece também ter um papel na biossíntese e na secreção de α -amilase, com possível intervenção de calmodulina (Mitsui *et al.*, 1984).

Alguns pesquisadores relataram que a isoenzima da α -amilase é a principal enzima encontrada em grãos maduros germinados ou em tecido de aleurona incubado com GA_3 e α -AMY1 (MacGregor, 1983; Marchylo *et al.*, 1981; Sargeant, 1979; 1980), o que difere da produção de α -amilase em tecidos de embriões prematuros removidos e do escutelo, no qual a α -AMY2 foi a isoenzima predominante formada até na presença de GA_3 . Normalmente, este tecido produz pouca atividade de α -amilase em grãos de trigo prematuros; porém, após sua remoção da caropsis, ele começa a sintetizar α -amilase e conduzir às mudanças citológicas características associadas à germinação. Cornford *et al.* (1987) examinaram a produção de α -amilase em tecidos de embriões e escutelos de trigo prematuro e descobriram que ela é influenciada pela idade do embrião. Enquanto as formas α -AMY1 e α -AMY2 foram detectadas por *rocket-line* imunoeletoforese, na presença de GA_3 , a produção de α -AMY2 foi estimulada pela adição de tal fator de crescimento. O ácido abscísico inibiu a produção de α -AMY1 e de muitas bandas de α -AMY2, apesar de quatro bandas de α -AMY2 ativas terem sido detectadas. A alteração do modo de desenvolvimento para germinativo pelos embriões excisados, em termos da produção de α -amilase, pode ocorrer em função da perda do ácido abscísico pelo embrião (Triplett e Quatrano, 1982).

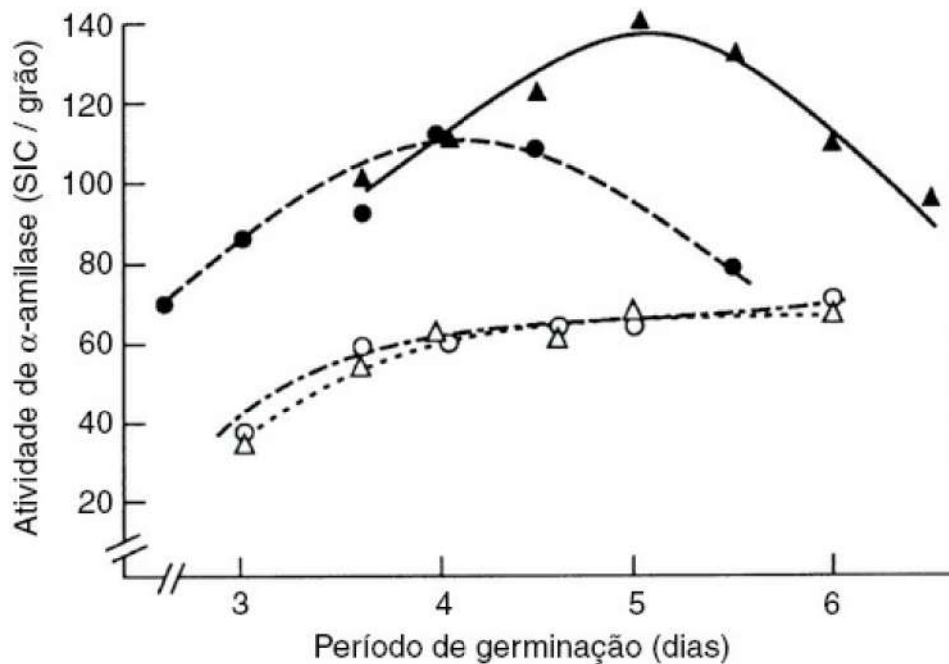


FIGURA 1.9 Atividade de α -amilase em cevada descascada germinada em K_2SO_4 e GA_3 . Sem aditivos (o); K_2SO_4 (50mM) (Δ); e GA_3 (50 μ g/mL) (\bullet); GA_3 (50 μ g/mL) e K_2SO_4 (50mM) (\blacktriangle)

). Raynes e Briggs (1985).

MacGregor e Matsuo (1982) desenvolveram uma pesquisa detalhada sobre a degradação inicial do amido durante a germinação em endospermas de grãos de cevada e de trigo. Os grãos examinados foram cortados longitudinalmente pelo sulco, sem distorcer nenhum de seus aspectos estruturais (Figura 1.10). Com a utilização de microscópios eletrônicos de escaneamento, foram evidenciadas mudanças físicas similares em ambos os grãos de cevada e de trigo durante as fases iniciais. A degradação do amido pareceu ter início na junção endosperma-embrião e continuou ao longo da borda dorsal do grão. Este efeito foi observado somente após a ocorrência de extensa degradação do material da parede celular e da matriz de proteína no endosperma. Os resultados foram consistentes com trabalhos anteriores, que mostraram que a síntese de α -amilase durante a germinação teve início no embrião (Gibbons, 1979; 1980; Okamoto *et al.*, 1980). Independente do local em que a α -amilase é sintetizada, no final, ela é liberada no endosperma, ocorrendo a hidrólise do amido.

C. Atividade da α -amilase em cereais germinados

Durante o processo de germinação, o amido é degradado por α -amilases e açúcares simples são liberados (Kruger, 1972 a; 1972b). Lineback e Ponpipom (1977) monitoraram a degradação do amido durante a germinação de cereais, incluindo o trigo e a cevada. Os autores descobriram que a elevação na atividade de α -amilase foi acompanhada pelo aumento dos açúcares em todos os cereais pesquisados. A quantidade de α -amilase produzida refletia o grau de amido danificado na farinha moída produzida pelas sementes germinadas. Apesar do alto teor de atividade da α -amilase ter sido associado com o trigo germinado, a degradação do amido foi menor do que em outros cereais. A degradação do amido do trigo foi evidenciada pela erosão da superfície do grânulo e do sulco equatorial. O grânulo de amido da aveia tem maior resistência ao ataque das enzimas, porém apresenta baixo teor de amido danificado na farinha moída.

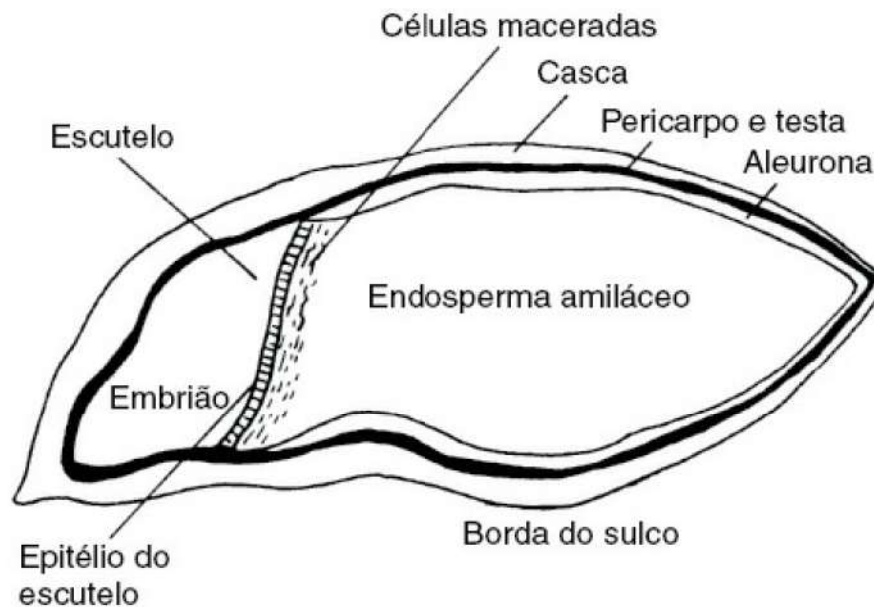


FIGURA 1.10 Seção longitudinal do grão da cevada aberta por meio da borda do sulco. MacGregor e Matsuo (1982).

Estudos feitos sobre a germinação de cinco cultivares de trigo, realizados por Reddy *et al.* (1984a), mostraram que o desenvolvimento da α -amilase é dependente da temperatura. Grãos de trigo germinados em câmaras de crescimento a 15,5°C desenvolveram a taxa de atividade enzimática mais alta quando comparada aos grãos crescidos no campo a 20°C. A atividade não aumentou significativamente até o terceiro dia da germinação, mas subiu de maneira acentuada depois do sexto dia.

D. Efeito da germinação na qualidade da farinha

Lukow e Bushuk (1984) estudaram o efeito da germinação na qualidade da farinha de trigo. Utilizando farinha de dois cultivares do trigo *Canadian hard red spring* verificaram que a atividade da α -amilase era muito baixa mas aumentou para 1.600- e 3.000 vezes durante a germinação. O aumento marcante na atividade enzimática foi acompanhado por um acréscimo nos açúcares redutores, o que explica as características de panificação inferiores das farinhas de trigo germinadas. O maior efeito da atividade da α -amilase foi a redução da propriedade da farinha em absorver água em decorrência da degradação do amido gelatinizado. O resultado geral foi a produção de pão com miolo úmido e pegajoso (Jongh, 1967; Thomas e Lukow, 1969).

Kruger e Matsuo (1982) pesquisaram o efeito da brotação pré-colheita na qualidade do trigo durum para preparo da massa para macarrão. A atividade de α -amilase aumentou de 155 a 320 vezes depois de 72 e 120 horas de germinação, respectivamente. No resfriamento durante a produção de semolina e espaguete, a atividade da α -amilase decresceu mas não destruiu as enzimas de imediato. Os pesquisadores notaram que a α -amilase ainda estava ativa durante os primeiros 6 minutos de cozimento do espaguete e foi responsável pela produção de açúcares redutores, uma substancial perda de elementos sólidos e efeito danoso à qualidade do espaguete.

E. Tratamento do grão germinado: redução da α -amilase

A germinação de grãos de trigo tem início no período de colheita e apresenta efeito adverso na qualidade (Meredith e Pomeranz, 1985). O maior culpado é a atividade da α -amilase, que aumenta durante a germinação, enquanto a atividade da β -amilase permanece a mesma. Vários métodos foram examinados para melhorar as propriedades do grão brotado. Já que a fração de amido do trigo brotado tem boa qualidade, os esforços foram direcionados para a inibição da α -amilase com a utilização de calor ou agentes químicos (Bean *et al.*, 1974; Cawley

e Mitchell, 1968; McDermott e Elton, 1971; Westermarck-Rosendahl *et al.*, 1979). Em pesquisa anterior, descrita por Schultz e Stephan (1960), foi observado, por exemplo, uma melhoria na qualidade quando o trigo é tratado com ácidos. Fuller *et al.* (1970) usaram ácido hidrocloreídrico seguido de neutralização com o uso de amônia para reduzir a atividade da α -amilase, mas seu método mostrou-se impraticável. Muitos inibidores de α -amilase foram examinados por Westermarck-Rosendahl *et al.* (1979) para melhorar as qualidades de panificação do trigo germinado. Os agentes mais promissores foram: fosfato trissódico, fosfato dissódico, polifosfato de sódio, SDS, estearoil lactilato de cálcio e ácido cítrico. As avaliações foram baseadas nos valores dos testes de *Falling Number* das amostras de grãos nos quais o nível ótimo para a farinha de panificação era de cerca de 200 segundos (Greenaway, 1969). Estes inibidores de α -amilase causaram aumento nos valores *Falling Number* muito acima de 200 segundos, como demonstrado na Tabela 1.8 com polifosfato de sódio.

Os testes de *Falling Number* medem o tempo que o pistão leva para mergulhar livremente em uma suspensão de farinha e água e o efeito da degradação amilolítica do amido na viscosidade da pasta de farinha e água. Quanto mais rápida a diminuição da viscosidade da pasta de farinha, menor o valor de *Falling Number*. Outras pesquisas realizadas por Westermarck-Rosendahl *et al.* (1980) demonstraram que entre os 23 inibidores de enzimas testados os mais promissores foram o fosfato trissódico e o fosfato dissódico, os quais foram especialmente eficazes na redução da viscosidade, problema associado com as farinhas de trigo germinado, assim como melhoraram as características do miolo. Soluções alternativas debatidas por Meredith e Pomeranz (1985) incluíram a eliminação de variedades de trigo suscetíveis a brotamento mediante programas de criação e seleção.

TABELA 1.8 Efeito do polifosfato de sódio no valor de *Falling Number* de trigo germinado danificado

Agente químico	Concentração ^a (%)	<i>Falling Number</i>
Polifosfato de sódio	0,1	147 ^b
	0,5	175 ^b
	1,0	250 ^c

^a Baseado na quantidade de farinha (conteúdo de umidade 15%)

^b Diferença significativa a 5%

^c Diferença significativa a 1%

Adaptado de Westermarck *et al.* (1979).

F. Mobilização das proteínas durante a germinação

Aminoácidos essenciais aumentam durante a germinação ou a brotação de grãos de cereais (Dalby e Tsai, 1976; Tsai *et al.*, 1975). Por exemplo, lisina e triptofano aumentaram durante a germinação do trigo, da cevada, da aveia e do arroz. A dimensão do aumento estava diretamente relacionada com a diminuição do conteúdo de prolamina no grão. Uma elevação substancial de 50% de lisina foi observada no trigo, comparada com um aumento pequeno na aveia (Figura 1.11). O teor de prolamina na aveia, porém, é muito mais baixo do que no trigo. Jones e Tsai (1977) relataram aumento no conteúdo de lisina e triptofano no embrião do milho normal e decréscimo correspondente no endosperma. Um teor mais alto de lisina é necessário para o crescimento e desenvolvimento do embrião, como já havia sido observado por Singh e Axtell (1973) nas pesquisas com proteínas de embriões de cevada e do endosperma. Os precursores da biossíntese da lisina no milho podem ser obtidos pela mobilização das reservas de zeína no endosperma.

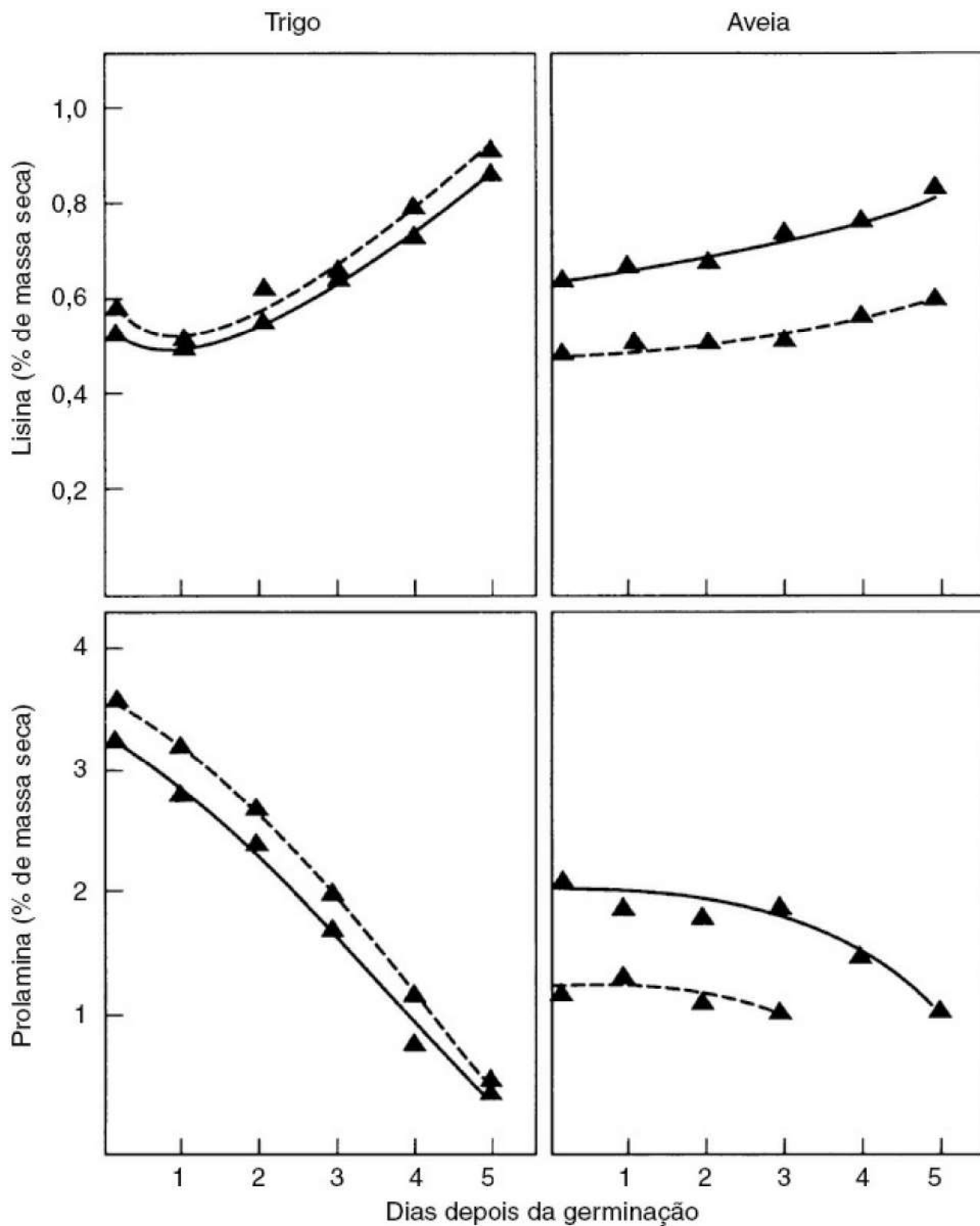


FIGURA 1.11 Alterações no conteúdo de proteína e prolamina durante a germinação do trigo e aveia. Adaptado de Dalby e Tsai (1976).

TABELA 1.9 Efeito da germinação de trigo cv "Neepawa" a 16,5°C na produção de aminoácidos livres

Aminoácido ($\mu\text{mol/g N}$)	Período de germinação (horas)	
	0	122
Triptofano	47	50
Lisina	5,7	63
Histidina	2,2	72
Ácido glutâmico	64	95

Metionina	2,4	27
Isoleucina	5,1	140
Leucina	6,0	170
Tirosina	4,5	72
Fenilalanina	4,2	150
Prolina	7,8	790
Glutamina	12	920

Adaptado de Tkachuk (1979).

A liberação de aminoácidos durante a germinação do trigo foi investigada por Tkachuk (1979). Após 122 horas de germinação, a uma temperatura de 16,5°C, o conteúdo de prolina e de glutamina aumentou 100 e 80 vezes, respectivamente, enquanto a lisina aumentou somente 12 vezes (Tabela 1.9). Estes resultados representam as alterações que surgem nos grãos de trigo inteiros e talvez não demonstrem as mudanças que ocorreriam no embrião e na camada de aleurona. Apesar disso, ilustram a ocorrência de proteólise considerável durante a germinação, o qual poderia se tornar um método para avaliar a extensão da germinação.

Kruger (1984), utilizando cromatografia líquida de alto desempenho e coluna de permeação do gel, monitorou os perfis de massas moleculares das proteínas solúveis em tampão (tampão de fosfato de sódio 0,5 M, pH 7,0, contendo 0,5 M de cloreto de sódio) em grãos de trigo sadios e germinados. Dos grupos de proteínas de massa molecular examinados observou-se maior alteração nos peptídeos de baixa massa molecular e aminoácidos, evidenciando aumento do nitrogênio amino solúvel, especialmente os aminoácidos, durante a germinação. Poucas alterações ocorreram durante os primeiros dois dias de germinação quando comparados aos posteriores seis dias. Em seguida, Kruger e Marchylo (1985) examinaram a mobilização de proteínas durante a germinação de cinco cultivares de trigo. Seis componentes principais das proteínas foram eluídos, dos quais apenas as espécies de baixa massa molecular tiveram alterações significativas durante a germinação. Estes resultados confirmaram pesquisas anteriores feitas por Kruger (1984) e Lukow e Bushuk (1984), que evidenciaram a ocorrência de uma hidrólise muito rápida das proteínas do endosperma do trigo, seguida de atividade limitada de endopeptidase, durante o período inicial de germinação.

Maior liberação de aminoácidos livres durante a germinação sugere extensa mobilização das proteínas de estocagem. O mecanismo que controla este processo permanece inexplicado. Algumas proteases foram encontradas no grão de trigo, incluindo endopeptidases, carboxipeptidases e aminopeptidases (Grant e Wang, 1972; Kruger, 1973; Preston e Kruger, 1976a; 1976b; 1977; Kruger e Preston, 1978). Entre elas, a carboxipeptidase é predominante no endosperma, representando um quarto do total da atividade da endopeptidase (Preston e Kruger, 1976a). Tais enzimas apresentam efeito negligenciável nas reservas do endosperma durante os dois primeiros dias de germinação, provavelmente por causa de sua compartimentalização, presença de inibidores da protease ou insolubilidade do substrato. Durante a fase de germinação, há uma atividade limitada de endopeptidase, resultando na formação de produtos intermediários que são, em seguida, degradados pela carboxipeptidase, para aminoácidos (Kruger e Marchylo, 1985). Apenas uma fração das proteínas de estocagem é afetada durante a germinação, fato que explica a similaridade dos perfis de proteína em sementes brotadas e maduras.

G. Mobilização de lipídeos durante a germinação

A germinação e a brotação de grãos de cereais são acompanhadas de aumento do teor total de lipídeos (Lorenz, 1980; Rahnotra *et al.*, 1977). A presença de lipase em sementes de trigo e de cevada não germinadas é muito pequena, mas aumenta assim que a germinação começa (Huang e Moreau, 1978; Taverner e Laidman, 1972). Um grande contraste entre os cereais é o fato de a aveia ser rica em atividade de lipase (Matlashewski *et al.*, 1982). Lipase (triacilglicerol lipase, EC 3.1.1.30) hidrolisa triacilgliceróis, diacilgliceróis e possivelmente

monoacilgliceróis, e produz ácidos graxos. A maior dificuldade para medir a atividade da lipase deve-se à insolubilidade do substrato em solução aquosa. Tal entrave foi parcialmente superado utilizando-se substratos solúveis em água, como *p*-nitrofenil acetato (PNPA) ou butirato ou preparação de emulsão estável com óleo de oliva. Um método específico para quantificar a lipase foi desenvolvido por Matlashewski *et al.* (1982) e utiliza triacilgliceróis radioativos, marcando a metade dos ácidos graxos. Utilizando este método, Baxter (1984) determinou a atividade da lipase em cevada germinada e não germinada. A Figura 1.12 ilustra que a atividade da lipase aumentou lentamente durante os primeiros dois dias de germinação, mas cresceu rapidamente após três dias. Foram separadas duas frações distintas de lipase com massas moleculares semelhantes (na faixa de 400.000 Da), mas com propriedades iônicas diferentes. A maior fração (I) foi associada ao embrião enquanto a menor fração de lipase (II) foi localizada no endosperma. Taverner e Laidman (1972) encontraram lipase no embrião e no endosperma do trigo, cada uma induzida por fatores diversos. Urquardt *et al.* (1984) separaram embriões de aveia do restante do grão e monitoraram as alterações na atividade da lipase durante a germinação. O aumento inicial da atividade da lipase ocorreu primariamente na camada do farelo, com pouca ou nenhuma atividade no endosperma (Urquardt *et al.*, 1983). Enquanto o papel principal da lipase é a hidrólise de triacilgliceróis de estocagem, sua função fisiológica permanece obscura.

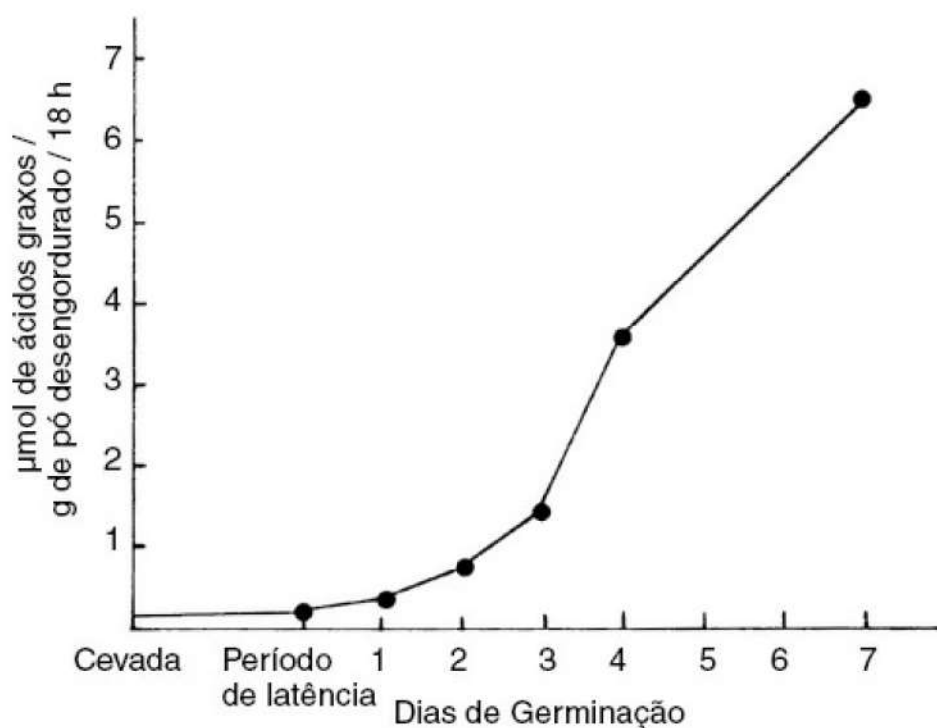


FIGURA 1.12 Atividade da lipase em extrato aquoso de cevada (variedade Sonja) durante germinação. Baxter (1984).

V. ESTOCAGEM DE GRÃOS

Depois da colheita, os grãos de cereais, como o trigo, são estocados em sacos ou silos de grandes dimensões. Estes grãos são tradicionalmente reconhecidos por manter sua qualidade, que é afetada pela umidade, temperatura, invasão de roedores, insetos, bactérias e fungos. A perda mundial de grãos pós-colheita parece ser em torno de 3% a 10%, podendo atingir até 15% dependendo das condições dos locais e recursos disponíveis (Harris, 1984). Esta parte vai abordar os efeitos da umidade e da temperatura na qualidade dos grãos.

A. Respiração

Quando os grãos de cereais estão secos ocorre pouca respiração. Se o conteúdo de umidade das sementes atinge valores acima de 14%, a respiração aumenta até que um nível crítico de umidade seja atingido. Neste ponto, a respiração se acelera rapidamente e ocorre aquecimento do grão. Este aumento significativo da respiração é atribuído, em parte, à germinação e ao crescimento de fungos, como o *Aspergillus* e o *Penicillium*. A respiração do grão é afetada pela umidade, temperatura e tensão de oxigênio, apesar do teor de umidade ser de enorme importância na estocagem comercial de grãos de cereal.

1. Efeito do teor de umidade

A exposição do grão faz com que a captação de umidade ocorra até atingir o equilíbrio com o vapor de água na atmosfera. O conteúdo de umidade do grão, portanto, é controlado pela umidade relativa na atmosfera, o que, em termos de estocagem de grãos, é de natureza intersticial. Quando exposto a uma atmosfera de umidade relativa uniforme e temperatura constante, a umidade relativa do grão estocado atinge um equilíbrio denominado equilíbrio de umidade relativa (ERH). A relação entre a umidade relativa e o conteúdo de umidade é definida pela sorção isotérmica, cuja forma é sigmoide. Isto ocorre em função do maior conteúdo de umidade no equilíbrio durante a dessorção comparada com a adsorção em um determinado ERH. A Figura 1.13 mostra a isoterma de umidade obtida a 30°C para milho com a curva sigmoide característica, resultante de um conteúdo maior de água da isoterma de dessorção (Denloye e Ade-John, 1985).

O equilíbrio do conteúdo de umidade é muito baixo em grãos. Apenas depois da isoterma atingir 80% de umidade relativa, o conteúdo de umidade aumenta exponencialmente com a umidade relativa (Oxley, 1948). O conteúdo de umidade considerado seguro para os grãos é quando o equilíbrio é atingido com 70% de umidade relativa (Pixton e Warburton, 1971). O crescimento microbiano ocorre somente com umidade relativa acima de 75% e tem por consequência uma extensa deterioração do grão.

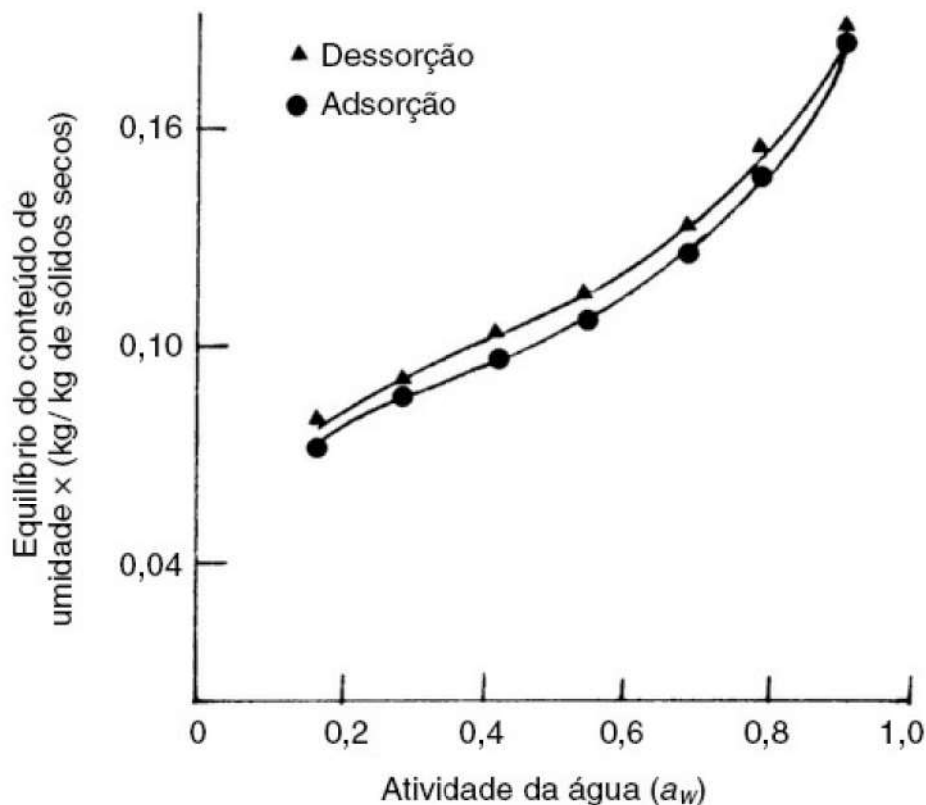


FIGURA 1.13 Isoterma de adsorção de umidade para milho (30°C). Impresso com autorização de Denloye e Ade-John (1985). © Pergamon Press.

Em condições extremamente úmidas, o grão pode ser colhido com um conteúdo de umidade excessivamente alto para uma estocagem segura. Em tal caso, é necessário o uso de secagem para reduzir o conteúdo de umidade do grão, que pode ser estocado com perda mínima da viabilidade das sementes, valor nutritivo e propriedades de panificação (Bushuk, 1978). Spillane e Pelhate (1982) estudaram excluir a etapa de secagem, armazenando grãos de cevada colhidos com grande conteúdo de umidade (> 30%) em condições de ventilação. Caso o aumento da temperatura do grão, em função de sua respiração, não seja controlado, ocorre um crescimento intenso de leveduras e bactérias. Isto pode ser evitado ventilando-se o silo continuamente durante um mês, processo que remove grande parte do calor gerado pela respiração e, assim, reduz a temperatura final do grão abaixo do ponto crítico de 16°C. O conteúdo de umidade do grão foi reduzido para 16% e a umidade relativa do ambiente em torno do grão foi cerca de 80% ao final do período de estocagem. Nestas condições, o crescimento de leveduras e bactérias foi suprimido e os fatores de qualidade do grão permaneceram intactos.

2. Efeito da temperatura

O ERH é pouco afetado por alterações na temperatura. Ayerst (1965) relatou que aumento ou queda de 10°C levou à alteração de 3% no ERH, com base em uma umidade relativa variando de 40% a 90%. Com umidade relativa mais alta, a alteração nunca excedeu 1% (Pixton e Warburton, 1975). Utilizando trigo de tipo Manitoba, Pixton (1968) demonstrou que com um conteúdo de umidade de 10% o ERH teve um aumento de 6%, quando aquecido a 70°C, comparado a apenas 2%, quando o conteúdo de umidade baixou para 14%. Prolongando o aquecimento por mais de uma hora foram observadas alterações posteriores. Denloye e Ade-John (1985) notaram um decréscimo no equilíbrio do conteúdo de umidade para milho mantido a umidade relativa constante na faixa de temperatura de 30°C a 50°C (Figura 1.14).

Desde que o grão é estocado em grande quantidade, o movimento do calor e da umidade no grão estocado é extremamente importante. Anderson *et al.* (1943) mostraram, pela primeira vez, que o movimento da umidade ocorre na forma de gradiente de temperatura alta para baixa. Este processo foi extremamente lento e envolveu difusão com alguma corrente de convexão. O principal efeito do aquecimento estaria relacionado com a translocação da umidade transportada pelo gradiente de temperatura no grão.

B. Armazenagem prolongada de grãos e farinha

Pixton *et al.* (1975) pesquisaram as alterações na qualidade do grão de trigo estocado durante 16 anos em baixa temperatura (4,5°C-0,5°C) e baixa concentração de oxigênio (< 2% por volume). Duas espécies de trigo diferentes (Manitoba e Cappelle), livres de contaminação microbiana e secos, com teores de umidade de, respectivamente, 11,9% e 12,6%, foram estocados em silos de uma tonelada cada um. A umidade não sofreu alterações significativas durante o período. A concentração de proteína bruta, assim como a solúvel em sal, permaneceram sem alterações em ambas as espécies de trigo, independente das condições de estocagem. Um pequeno aumento de 0,5% na concentração de lipídeos totais foi observado nas duas variedades de trigo e foi atribuído ao metabolismo de carboidratos durante o longo período de estocagem. Esta hipótese foi baseada na pequena redução na concentração de açúcares totais observada nas amostras de trigo monitoradas por Pixton e Hill (1967) após oito anos de estocagem, embora a concentração de maltose e sacarose tenha sofrido pouca variação durante todo o período de estocagem.

Observou-se que grãos de trigo apresentaram alta qualidade quando estocados a 4,5°C (96% de umidade relativa), comparado a lotes armazenados em temperatura ambiente durante o mesmo período, que perderam 70% da viabilidade. Se o grão de trigo permanece protegido da umidade atmosférica, de rápidas variações de temperatura e ataque de insetos, a qualidade de processamento permanece intacta, apesar da adição de α -amilase

fúngica ter sido necessária.

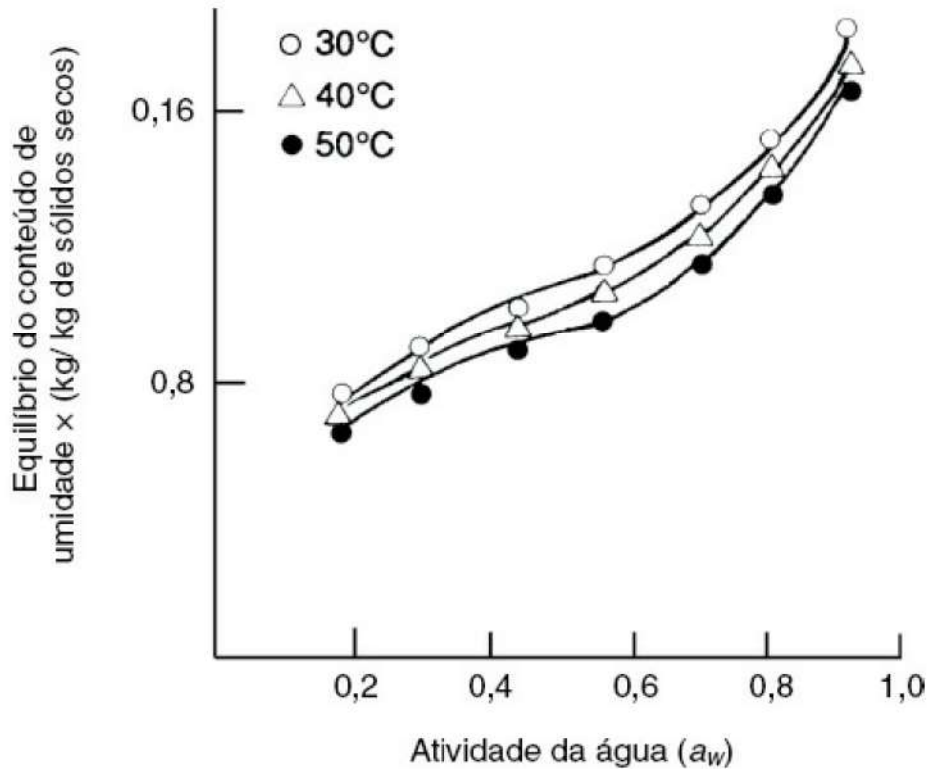


FIGURA 1.14 Isoterma de dessorção de milho a diferentes temperaturas. Reimpresso com autorização de Denloye e Ade-John (1985). © Pergamon Press.

PARTE II: LEGUMINOSAS

I. INTRODUÇÃO

O termo legume engloba mais de treze mil espécies diferentes, todas da família das Leguminosas. As leguminosas têm uma função importante na dieta dos seres humanos em todo o mundo. Entre as milhares de espécies conhecidas, apenas algumas poucas são cultivadas comercialmente: soja, amendoim, feijões, ervilhas, favas, grão-de-bico e lentilhas. Das sete mencionadas, a soja é, de longe, a mais cultivada. Muitas outras espécies de leguminosas têm um papel importante nas produções locais em vários lugares do mundo, mas são excessivamente numerosas para serem discutidas neste capítulo. As leguminosas são muito conhecidas por seu alto teor de proteína vegetal, que ocorre pela capacidade de fixação de nitrogênio em função de sua relação simbiótica com as bactérias no solo. A Tabela 1.10 mostra a estimativa da FAO (Organização de Alimentos e Agricultura) para a produção mundial das principais leguminosas para o ano de 2007. Este capítulo enfoca a composição das sementes de leguminosas e as alterações bioquímicas que ocorrem durante o desenvolvimento das sementes, sua germinação, estocagem e fermentação.

II. ESTRUTURA DAS SEMENTES DAS LEGUMINOSAS

Apesar da grande variação na composição de macronutrientes das leguminosas, sua estrutura básica é a mesma. As sementes maduras contêm três componentes principais: a casca da semente (testa), o embrião e o endosperma. A maioria das sementes de leguminosas, porém, passa a possuir pouco endosperma quando atinge a maturidade,