



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ALEXANDRE VINCO PIMENTA

**COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL, QUALIDADE PROTEICA, BIOACESSIBILIDADE E
BIODISPONIBILIDADE DE CÁLCIO DE LINHAÇAS GERMINADAS MARROM E
DOURADA (*Linum usitatissimum* L.)**

ALEGRE – ES
JULHO – 2019

ALEXANDRE VINCO PIMENTA

**COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL, QUALIDADE PROTEICA, BIOACESSIBILIDADE E
BIODISPONIBILIDADE DE CÁLCIO DE LINHAÇAS GERMINADAS MARROM E
DOURADA (*Linum usitatissimum* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Vasconcelos Costa

Coorientadora: Profa. Dra. Neuza Maria Brunoro Costa

Coorientador: Prof. Dr. Joel Camilo Souza Carneiro

ALEGRE – ES

JULHO – 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

V767c Vinco Pimenta, Alexandre, 1992-
Composição nutricional, qualidade proteica, bioacessibilidade e biodisponibilidade de cálcio de linhaças germinadas marrom e dourada (*Linum usitatissimum* L.) / Alexandre Vinco Pimenta. - 2019.
110 f. : il.

Orientador: André Gustavo Vasconcelos Costa.
Coorientadores: Neuza Maria Brunoro Costa, Joel Camilo Souza Carneiro.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Germinação. 2. Linhaça. 3. Cálcio. I. Vasconcelos Costa, André Gustavo. II. Brunoro Costa, Neuza Maria. III. Souza Carneiro, Joel Camilo. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. V. Título.

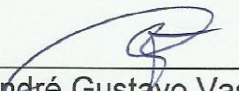
CDU: 664

ALEXANDRE VINCO PIMENTA

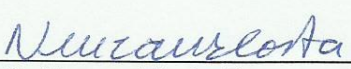
COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL, QUALIDADE PROTEICA,
BIOACESSIBILIDADE E BIODISPONIBILIDADE DE CÁLCIO DE
LINHAÇAS GERMINADAS MARROM E DOURADA (*LINUM
USITATISSIMUM L.*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

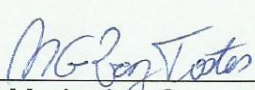
Aprovada em 18 de julho de 2019.



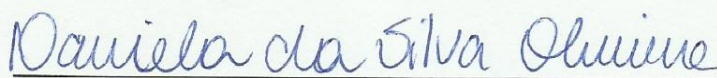
Prof. Dr. André Gustavo Vasconcelos Costa
Universidade Federal do Espírito Santo-UFES
Orientador



Profª. Drª. Neuza Maria Brunoro Costa
Universidade Federal do Espírito Santo-UFES
Coorientadora



Profª. Drª. Maria das Graças Vaz Tostes
Universidade Federal do Espírito Santo-UFES
Examinadora



Profª. Drª. Daniela da Silva Oliveira
Universidade Federal do Espírito Santo-UFES
Examinadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por toda sabedoria concedida e por sempre estar à minha frente me guiando pelos caminhos da vida.

À minha mãe e aos meus irmãos, por todo apoio desde quando comecei a graduação até os dias de hoje.

À Tainã Moulin, que me acompanha todos os dias lado a lado e muito me ajudou em todos os desafios enfrentados durante essa fase da minha vida.

Ao meu orientador, professor André Gustavo Vasconcelos Costa, pela amizade, confiança e por todos ensinamentos desde o início da graduação até aqui.

À minha coorientadora, professora Neuza Maria Brunoro Costa, que também me acompanha desde o início da graduação me orientando no meu TCC e agora como minha coorientadora no mestrado.

À Thaísa Agrizzi, uma grande amiga com quem convivi nos momentos de descontração e nos momentos sérios também, me ajudando sempre que precisei.

Aos técnicos de laboratório Eduardo Lorencetti, Mauricio Moraes e Letícia Bastos, por toda ajuda durante a realização das análises e por tornar os dias de laboratório mais descontraídos.

Ao Toninho, secretário do programa, por toda ajuda na parte burocrática.

Aos professores do programa, que contribuíram transmitindo seus conhecimentos me ajudando a estar preparado para este momento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo - FAPES, pelo apoio financeiro na concessão da bolsa de estudo.

À Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, por todos esses anos vividos nesse mundo acadêmico.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos / CCAE / UFES, pela oportunidade de realizar essa conquista.

Ao professor Sidney Zanetti e ao técnico de laboratório Alexandro Almeida, pela contribuição na realização das análises de cálcio por meio do Laboratório de Recursos Hídricos e Solos – LabHidros / CCAE / UFES.

E a todos familiares, amigos e colegas que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui, meu muito obrigado.

LISTA DE FIGURAS

Artigo de revisão

- Figura 1. Principais componentes nutricionais de sementes comestíveis que podem sofrer alterações no processo germinativo.....23
- Figura 2. Impactos da germinação em estudos *in vitro* e *in vivo*.41

Artigo original

- Figura 1. Registros digitais das linhaças dourada e marrom ao final do processo de germinação de 48 horas.....77
- Figura 2. Porcentagem de Ca bioacessível das farinhas de linhaça dourada e marrom germinada e não germinada após o processo de digestão *in vitro*.84
- Figura 3. Consumo alimentar semanal, consumo alimentar per capita diário, consumo calórico per capita diário, consumo de Ca per capita diário, peso semanal dos animais, ganho de peso total dos animais, CEA e CEC do experimento *in vivo*.86
- Figura 4. Consumo de dieta / dia, consumo de Ca / dia, Ca urinário / dia, Ca fecal / dia, balanço de Ca / dia e porcentagem de retenção do Ca do experimento *in vivo*.88
- Figura 5. Cálcio plasmático, fósforo plasmático, creatinina plasmática e fosfatase alcalina dos animais.91
- Figura 6. Distância entre as epífises, largura da diáfise, peso do fêmur, relação mg de Ca / peso total do fêmur, concentração de Ca no fêmur e percentual de retenção óssea do fêmur dos animais.95
- Figura 7. PER, NPR, PER relativo, NPR relativo e DV da análise de qualidade proteica.99

LISTA DE TABELAS

Artigo de revisão

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Estudos relacionando a germinação de sementes comestíveis com alterações na composição de carboidratos, proteínas e lipídios | 28 |
| Tabela 2 - Estudos relacionando a germinação de sementes com a composição de minerais e vitaminas..... | 33 |
| Tabela 3 - Estudos relacionando a germinação de sementes com a composição de compostos bioativos..... | 37 |
| Tabela 4 - Estudos relacionando a germinação de sementes com a concentração de fatores antinutricionais | 40 |
| Tabela 5 - Estudos <i>in vitro</i> relacionando a germinação de sementes com a bioacessibilidade de nutrientes | 45 |
| Tabela 6 - Estudos <i>in vivo</i> relacionando a germinação de sementes com a biodisponibilidade e efeitos fisiológicos dos nutrientes | 49 |

Artigo original

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Composição das dietas experimentais de biodisponibilidade de cálcio.... | 72 |
| Tabela 2 - Composição das dietas experimentais de qualidade proteica | 75 |
| Tabela 3 - Composição centesimal da farinha de linhaça dourada e marrom germinada e não germinada em base seca | 79 |
| Tabela 4 - Fatores antinutricionais da farinha de linhaça dourada e marrom germinada e não germinada em base seca | 81 |
| Tabela 5 - Razões molares de fitato e oxalato com o cálcio da farinha de linhaça dourada e marrom germinada e não germinada em base seca | 81 |

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------|-----|
| RESUMO..... | IX |
| ABSTRACT | XI |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 13 |
| 1.1 Referências bibliográficas | 16 |
| 2. OBJETIVOS | 18 |
| 2.1 Geral..... | 18 |
| 2.2 Específicos | 18 |
| 3. ARTIGO DE REVISÃO | 19 |
| 4. ARTIGO ORIGINAL..... | 64 |
| 5. CONCLUSÃO GERAL..... | 109 |
| 6. ANEXO A..... | 110 |

RESUMO

PIMENTA, Alexandre Vinco. **Composição nutricional, qualidade proteica, bioacessibilidade e biodisponibilidade de cálcio de linhaças germinadas marrom e dourada (*Linum usitatissimum* L.)**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre - ES. Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Vasconcelos Costa. Coorientadora: Profa. Dra. Neuza Maria Brunoro Costa. Coorientador: Prof. Dr. Joel Camilo Souza Carneiro.

A germinação de sementes promove alterações na sua composição, proporcionando potenciais benefícios nutritivos e de saúde em comparação com as sementes não germinadas. O presente estudo teve por objetivo verificar a influência da germinação nas características físico-químicas, na qualidade proteica, na bioacessibilidade e na biodisponibilidade de cálcio das linhaças marrom e dourada (*Linum usitatissimum* L.), por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*. A germinação das linhaças, variedades marrom e dourada, foi realizada por 48 horas, a $26 \pm 2^\circ$ C. Após, foi elaborada a farinha das variedades de linhaças germinadas e não germinadas, as quais foram analisadas quanto à composição centesimal, determinação de cálcio, oxalato, fitato e tanino. No estudo *in vitro*, as farinhas foram submetidas a um processo de digestão gastrointestinal simulado por enzimas, para avaliar a bioacessibilidade do cálcio. Para o estudo *in vivo* de biodisponibilidade de cálcio, foram utilizados 40 ratos machos Wistar divididos em cinco grupos: Controle (CT), Linhaça Dourada (LD), Linhaça Marrom (LM), Linhaça Dourada Germinada (LDG) e Linhaça Marrom Germinada (LMG). O estudo ocorreu durante seis semanas, sendo realizado balanço de cálcio na sexta semana para avaliação da sua biodisponibilidade. Ao final do tempo experimental, os animais foram eutanasiados, sendo coletadas amostras de sangue para análises bioquímicas e tecido ósseo femoral para análise de cálcio. Para o estudo *in vivo* de qualidade proteica, foram utilizados 48 ratos machos Wistar divididos em seis grupos: Aproveito (AP), CT, LD, LM, LDG e LMG. O estudo ocorreu durante duas semanas, sendo realizado balanço nitrogenado na segunda semana para avaliação da qualidade proteica. Para as análises estatísticas, foi empregado a Análise de Variância (ANOVA) “two-way” para os dados de caracterização físico-química, fatores antinutricionais e estudo *in vitro* de bioacessibilidade de cálcio, sendo que em casos de interação aplicou-se o teste de Tukey. Os estudos *in vivo* foram analisados por meio da ANOVA “one-way”, acompanhada pelo teste de Tukey. Os resultados foram apresentados em média \pm desvio padrão, sendo utilizado $p \leq 0,05$. A germinação

proporcionou aumento no teor de lipídios e de proteínas e, redução no teor de carboidratos das linhaças. A concentração de cálcio apresenta-se superior na variedade dourada em relação à marrom. O teor de tanino não apresentou diferença estatística entre os grupos, ao passo que os teores de fitato e oxalato apresentaram redução significativa após a germinação. A germinação promoveu redução da razão molar fitato:cálcio e oxalato:cálcio, sendo que na linhaça marrom essas relações foram superiores à variedade dourada. No estudo *in vitro*, as linhaças germinadas apresentaram um percentual de cálcio bioacessível estatisticamente superior às respectivas amostras não germinadas. Ainda, a biodisponibilidade de cálcio foi influenciada pela variedade, sendo superior na linhaça dourada. Em relação ao estudo *in vivo*, verificou-se que o consumo alimentar, consumo calórico, consumo de cálcio, coeficiente de eficiência alimentar e coeficiente de eficiência calórica; bem como o peso semanal e ganho de peso total foram semelhantes para todos os grupos. Não foram observadas diferenças na ingestão, excreção (urinária e fecal) e retenção de cálcio. A germinação não influenciou o balanço de cálcio, porém a linhaça marrom germinada apresentou-se inferior ao grupo controle. Não foram observadas diferenças estatísticas nos níveis plasmáticos de cálcio, fósforo, creatinina e fosfatase alcalina. O presente estudo não evidenciou alterações na morfologia e conteúdo de cálcio dos fêmures dos animais. Os valores do Coeficiente de Eficiência Proteica (PER) não apresentaram diferença entre os grupos. No entanto, a germinação promoveu redução do Quociente de Eficiência Líquida da Proteína (NPR) e no PER e NPR relativos, ao passo que para a Digestibilidade Verdadeira (DV), apenas a linhaça marrom melhorou a digestibilidade após a germinação. Em conclusão, a germinação das linhaças promoveu aumento do conteúdo lipídico e proteico, bem como redução dos níveis de fitato e oxalato. O estudo *in vitro* evidenciou que a germinação aumentou a bioacessibilidade de cálcio, enquanto o estudo *in vivo* não influenciou na biodisponibilidade de cálcio, embora tenha apresentado efeito negativo sobre a qualidade proteica. O uso da linhaça germinada, independente da variedade, pode contribuir para aumentar o valor nutricional da dieta, sem prejuízos na homeostase de cálcio.

Palavras-chave: linhaça, germinação, qualidade proteica, metabolismo de cálcio, bioacessibilidade, biodisponibilidade.

ABSTRACT

Seed germination promotes changes in its composition, providing potential health and nutritional benefits compared to non-germinated seeds. The aim of the present study was to verify the influence of germination on physicochemical characteristics, protein quality, bioaccessibility and bioavailability of brown and golden flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) flaxseed by *in vitro* and *in vivo* studies. Flaxseed germination, brown and golden varieties, was performed for 48 hours at $26 \pm 2^\circ$ C. Afterwards, the flour of germinated and non-germinated flaxseed varieties was prepared and analyzed for centesimal composition, calcium determination, oxalate, phytate and tannin. In the *in vitro* study, the flours were subjected to an enzyme-simulated gastrointestinal digestion process to assess calcium bioaccessibility. For the *in vivo* calcium bioavailability study, 40 male Wistar rats were divided into five groups: Control (CT), Golden Flaxseed (LD), Brown Flaxseed (LM), Germinated Golden Flaxseed (LDG) and Germinated Brown Flaxseed (LMG). The study took place for six weeks and calcium balance was performed at six weeks to assess its bioavailability. At the end of the experimental time, the animals were euthanized, and blood samples were collected for biochemical analysis and femoral bone tissue for calcium analysis. For the *in vivo* protein quality study, 48 male Wistar rats were divided into six groups: without protein (AP), CT, LD, LM, LDG and LMG. The study took place during two weeks, being performed nitrogen balance in the second week to evaluate the protein quality. Statistical analysis was performed using the “two-way” analysis of variance (ANOVA) for the physicochemical characterization data, antinutritional factors and *in vitro* study of calcium bioaccessibility, in case of interaction the Tukey test was applied. *In vivo* studies were analyzed using “one-way” ANOVA, followed by Tukey test. Results were presented as mean \pm standard deviation, being used $p \leq 0.05$. Germination increased lipid and protein content and reduced carbohydrate content of flaxseeds. Calcium concentration is higher in the golden variety than in the brown one. The tannin content did not present statistical difference between the groups, while the phytate and oxalate contents showed significant reduction after germination. The germination promoted reduction of the phytate:calcium and oxalate:calcium molar ratio, being that in brown flaxseed these relations were superior to the golden variety. In the *in vitro* study, germinated flaxseeds showed a statistically higher percentage of bioaccessible calcium than their non-germinated samples. Also, calcium bioavailability was influenced by variety, being

higher in golden flaxseed. Regarding the *in vivo* study, it was found that food intake, caloric intake, calcium intake, food efficiency ratio and caloric efficiency ratio; as well as weekly weight and total weight gain were similar for all groups. No differences were observed in intake, excretion (urinary and fecal) and calcium retention. Germination did not influence the calcium balance, but the germinated brown flaxseed was inferior to the control group. No statistical differences were observed in plasma calcium, phosphorus, creatinine and alkaline phosphatase levels. The present study did not show changes in the morphology and calcium content of the femurs of the animals. The Protein Efficiency Coefficient (PER) values did not differ between groups. However, germination promoted a reduction in Net Protein Efficiency Ratio (NPER) and relative PER and NPER, whereas for True Digestibility (DV), only brown flaxseed improved digestibility after germination. In conclusion, flaxseed germination promoted an increase in lipid and protein content, as well as a reduction in phytate and oxalate levels. The *in vitro* study showed that germination increased calcium bioaccessibility, while the *in vivo* study did not influence calcium bioavailability, although it had a negative effect on protein quality. The use of germinated flaxseed, regardless of variety, can contribute to increase the nutritional value of the diet without impairing calcium homeostasis.

Keywords: flaxseed, germination, protein quality, calcium metabolism, bioaccessibility, bioavailability.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A germinação é um método simples e barato, que promove melhorias na palatabilidade, na digestibilidade e na biodisponibilidade de nutrientes. O efeito da germinação depende da variedade da semente e de condições às quais a semente foi submetida, como luz, temperatura e disponibilidade de água (KUMAR; VERMA; SINGH, 2011). Esse método de processamento é amplamente utilizado para leguminosas e cereais, especialmente no Oriente e Extremo Oriente da Ásia. Mas, devido aos benefícios nutritivos em comparação com as sementes não germinadas, vem ganhando espaço também entre a população Ocidental (PAJAK et al., 2014), sendo um alimento consumido principalmente por vegetarianos, crudívoros e na área gastronômica, onde é utilizado para melhorar as propriedades sensoriais ou para compor a estética de uma ampla variedade de preparações (HÜBNER & ARENDT, 2013).

As sementes, em geral, consistem no embrião, no tecido do endosperma e no revestimento da semente. Um dos principais propósitos do endosperma é servir como fonte de nutrientes para o embrião germinar. A germinação é o resultado de diferentes processos fisiológicos, que resultam na degradação das reservas, na mobilização e na utilização de compostos (LINKIES et al., 2010). Sugere-se que as sementes germinadas apresentam melhor qualidade nutricional, maior conteúdo de compostos bioativos e menor concentração de componentes antinutricionais (TARZI et al., 2012). Além do mais, a germinação promove a síntese de novos compostos bioativos, que além de proteger a planta de desafios exógenos, como insetos e microrganismos, podem ser benéficos à saúde dos indivíduos (WANASUNDARA; SHAHIDI; BROSNAN, 1999).

No processo germinativo, muitas enzimas são ativadas e algumas proteínas são sintetizadas através de uma série de reações bioquímicas. Enquanto outras proteínas podem ser hidrolisadas pela protease, sendo que esse equilíbrio determina o conteúdo das proteínas nas sementes. Portanto, as mudanças no teor de proteínas durante a germinação devem ser um processo de regulação dinâmica (YIMING et al., 2015).

As propriedades que melhor definem a qualidade nutricional de um alimento em termos proteicos são a sua digestibilidade e seu valor biológico (WANG et al.,

2008). A digestibilidade e utilização das proteínas vegetais são limitadas por fatores exógenos e endógenos (DUODU et al., 2003). As sementes são geralmente submetidas a algum tipo de tratamento térmico para melhorar a digestibilidade proteica. Porém, métodos não térmicos e mais simples como a germinação, podem ser aplicados em produtos alimentícios, preservando a qualidade dos alimentos e aumentando a digestibilidade (ESTRADA-GIRÓN; SWANSON; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005).

Nesse contexto, o crescente mercado de produtos naturais, aliado ao interesse dos consumidores em melhorar a qualidade da alimentação e na prevenção de doenças, tem movido a indústria alimentícia na busca por produtos mais saudáveis. As sementes germinadas é um nicho a ser explorando, no qual a germinação da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) é pouco estudada (HERCHI et al., 2012).

A semente de linhaça é um cereal do grupo das oleaginosas, que se caracteriza por ser achatada, oval, com uma extremidade pontiaguda e a cor variando de marrom-avermelhada ao dourado. Apresentam um sabor agradável de nozes e cereais, ligeiramente amargo (COŞKUNER & KARABABA, 2007).

A linhaça fornece benefícios para a saúde devido à presença de compostos bioativos, que tem sido associado à redução do risco de doenças, como artrite, diabetes, doenças coronarianas, acidentes vasculares cerebrais e câncer (FIGUEIREDO et al., 2017). Ainda, diversos estudos têm relacionado o consumo de linhaça com melhorias na composição corporal (AGUILAR et al., 2017; CINTRA et al., 2006; MACHADO et al., 2015).

Originária da Ásia, hoje é amplamente distribuída ao redor do mundo, crescendo em diversos tipos de terrenos. A variedade dourada é mais cultivada em regiões frias, como Canadá, Estados Unidos, Argentina, China, Índia, Holanda, Marrocos e Rússia (OOMAH & SITTER, 2009), enquanto a variedade marrom tem sido cultivada em regiões de clima quente e úmido, como o Brasil, principalmente no estado do Rio Grande do Sul (MARQUES et al., 2011), sendo comercializada para ao consumidor a preços mais baixos que a dourada.

A linhaça em geral, apresenta em sua composição básica cerca de 43% de carboidratos, sendo destes, 33% na forma de fibras, apresenta também 14% de proteínas e 32% de lipídios, além de mineiras, como cálcio (212 mg / 100g), fósforo (616 mg / 100g) e magnésio (347 mg / 100 g); e vitaminas como vitamina E (0,24 mg

/ 100 g) e vitamina B6 (0,14 mg / 100 g) (IBGE, 2011; TACO, 2011; TBCA, 2018; USDA, 2018).

A germinação duplica o valor antioxidante da linhaça, além de reduzir fatores antinutricionais, como fitato, oxalato e inibidores enzimáticos, permitindo maior biodisponibilidade e absorção de nutrientes (SANDHU; KAUR; BHISE, 2017). Ainda, um período curto de germinação (48 h) da linhaça é capaz de aumentar os conteúdos de ácido ascórbico, ácidos fenólicos, flavonóides e aminoácidos livres e, reduzir os teores de glicosídeos cianogênicos e do inibidor da tripsina (HERCHI et al., 2015; WANASUNDARA; SHAHIDI; BROSNAN, 1999). Além disso, Sandhu; Kaur e Bhise (2017) mostraram aumento no conteúdo de cálcio na linhaça germinada.

O cálcio é um nutriente com funções biológicas, como a contração muscular, mitose, coagulação sanguínea, transmissão do impulso nervoso ou sináptico e o suporte estrutural do esqueleto. Ainda, o consumo adequado de cálcio tem sido associado à redução do risco de osteoporose, hipertensão arterial, obesidade e câncer de cólon (KAUSHIK et al., 2014).

A linhaça é uma boa fonte vegetal de cálcio, cujo conteúdo desse mineral, em uma porção de 20 g, é de aproximadamente de 45 mg (IBGE, 2011; TACO, 2011; TBCA, 2018; USDA, 2018). No entanto, deve-se ressaltar que os fatores antinutricionais da linhaça podem comprometer a biodisponibilidade desse elemento.

Sendo assim, a germinação pode melhorar a qualidade nutricional, reduzir os fatores antinutricionais, aumentar o teor vitaminas, minerais e compostos bioativos e com isso melhorar a bioacessibilidade e biodisponibilidade de nutrientes de sementes comestíveis.

1.1 Referências bibliográficas

AGUILAR, C. M. et al. Comparative effects of brown and golden flaxseeds on body composition, inflammation and bone remodelling biomarkers in perimenopausal overweight women. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 166-175, 2017.

CINTRA, D. E. C. et al. Lipid profile of rats fed high-fat diets based on flaxseed, peanut, trout, or chicken skin. **Nutrition** (Burbank, Los Angeles County, Calif.), v. 22, n.2, p. 197-205, 2006.

COŞKUNER, Y.; KARABABA, E. Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 3, p. 1067–1073, 2007.

DUODU, K. G. et al. Factors affecting sorghum protein digestibility. **Journal of Cereal Science**, v. 38, n. 2, p. 117–131, 2003.

ESTRADA-GIRÓN, Y.; SWANSON, B. G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Advances in the use of high hydrostatic pressure for processing cereal grains and legumes. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 5, p. 194–203, 2005.

FIGUEIREDO, M. S. et al. Flaxseed secoisolariciresinol diglucoside (SDG) during lactation improves bone metabolism in offspring at adulthood. **Journal of functional foods**, v. 29, p. 161-171, 2017.

HERCHI, W. et al. Changes in phospholipid composition, protein content and chemical properties of flaxseed oil during development. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 54, p. 1–5, 2012.

HERCHI, W. et al. Effects of germination on chemical composition and antioxidant activity of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil. **Grasas y Aceites**, v. 66, n. 1, p. 57, 2015.

HÜBNER, F.; ARENDT, E. K. Germination of Cereal Grains as a Way to Improve the Nutritional Value: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 8, p. 853–861, 2013.

IBGE - Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil**. ISBN 978-85-240-4198-3, Rio de Janeiro, 2011.

KAUSHIK, R. et al. Bioavailability of vitamin D2 and calcium from fortified milk. **Food Chemistry**, v. 147, p. 307–311, 2014.

KUMAR, B.; VERMA, S. K.; SINGH, H. P. Effect of temperature on seed germination parameters in Kalmegh (*Andrographis paniculata* Wall. ex Nees.). **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1241–1244, 2011.

LINKIES, A. et al. The evolution of seeds. **New Phytologist**, v. 186, n. 4, p. 817-831, 2010.

MACHADO, A. M. et al. Effects of brown and golden flaxseed on the lipid profile, glycemia, inflammatory biomarkers, blood pressure and body composition in overweight adolescents. **Nutrition**, v. 31, p. 90-96, 2014.

MARQUES, A. C. et al. Efeito da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) sob diferentes formas de preparo na resposta biológica em ratos. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 1, p. 131–141, 2011.

OOMAH, B. D.; SITTER, L. Characteristics of flaxseed hull oil. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 623–628, 2009.

PAJAK, P. et al. Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. **Food Chemistry**, v. 143, p. 300–306, 2014.

SANDHU, V.; KAUR, A.; BHISE, S. Effect of ungerminated and germinated flaxseed addition on the rheological properties of whole wheatmeal and wheat flour. **Carpathian Journal of Food Science & Technology**, v. 9, n. 3, 2017.

TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Núcleo de Estudos e pesquisas em Alimentação. **Universidade Estadual de Campinas (NEPA – UNICAMP)**. Campinas, 4ª edição revisada e ampliada, 161 páginas, 2011.

TARZI, B. G. et al. The effect of Germination on phenolic content and antioxidant activity of chickpea. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 4, p. 1137–1143, 2012.

TBCA - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. **Universidade de São Paulo (USP)**. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tbca>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2018.

USDA - United States Department of Agriculture. **Food Composition Databases**. Disponível em: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>. Acesso em: 21 de abril de 2018.

WANASUNDARA, P.K.J.P.D.; SHAHIDI, F.; BROSNAN, M. E. Changes in flaxseed (*Linum usitatissimum*) seed nitrogenous compounds during germination. **Food chemistry**, v. 65, n. 3, p. 289-295, 1999.

WANG, X. S. et al. Characterization, amino acid composition and *in vitro* digestibility of hemp (*Cannabis sativa* L.) proteins. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 11–18, 2008.

YIMING, Z. et al. Evolution of nutrient ingredients in tartary buckwheat seeds during germination. **Food Chemistry**, v. 186, p. 244–248, 2015.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Verificar a influência da germinação nas características físico-químicas, na qualidade proteica, na bioacessibilidade e na biodisponibilidade de cálcio das linhaças dourada e marrom (*Linum usitatissimum* L.).

2.2 Específicos

- I. Promover a germinação das variedades de linhaça dourada e marrom;
- II. Avaliar a composição centesimal das linhaças dourada e marrom não germinadas e germinadas;
- III. Verificar a bioacessibilidade *in vitro* de cálcio das linhaças dourada e marrom não germinadas e germinadas;
- IV. Analisar a biodisponibilidade *in vivo* de cálcio das linhaças dourada e marrom não germinadas e germinadas;
- V. Verificar os efeitos da germinação das variedades de linhaça dourada e marrom sobre a fixação de cálcio no tecido ósseo e em parâmetros bioquímicos;
- VI. Analisar a qualidade proteica *in vivo* das linhaças dourada e marrom não germinadas e germinadas;
- VII. Confrontar as características físico-químicas, qualidade proteica, bioacessibilidade e biodisponibilidade de cálcio das linhaças dourada e marrom não germinadas e germinadas.

3. ARTIGO DE REVISÃO

Impacto da germinação sobre a composição nutricional de sementes comestíveis

RESUMO

A germinação é um método alternativo para melhorar a qualidade nutricional de sementes. É um processo complexo, no qual ocorrem mudanças significativas nas características bioquímicas, nutricionais e sensoriais. Como resultado, as sementes germinadas são nutricionalmente superiores às sementes não germinadas, com níveis mais elevados de nutrientes e menor quantidade de antinutrientes. A presente revisão teve como objetivo investigar os efeitos da germinação na qualidade nutricional em diferentes tipos de sementes. Os resultados encontrados mostraram que a germinação melhora o valor nutricional de sementes, propiciando diminuições de fatores antinutricionais, como fitato, tanino e oxalato; bem como o aumento na composição de minerais, vitaminas e compostos bioativos. Concluindo, a germinação se mostra promissora na melhoria na composição nutricional, da bioacessibilidade e da biodisponibilidade de nutrientes e de compostos bioativos.

Palavras-chave: germinação, linhaça, qualidade nutricional, bioacessibilidade, biodisponibilidade.

3.1 INTRODUÇÃO

O crescente aumento no mercado de produtos naturais tem ocorrido atualmente devido ao estilo de vida adotado por um nicho de consumidores, que buscam “vida saudável e alimentos saudáveis” (BENINCASA et al., 2019). Esse público busca alimentos com melhor conteúdo nutricional, seja de nutrientes ou de não nutrientes, os quais promoverão efeitos benéficos para a saúde. Neste contexto, os alimentos germinados vêm ganhando destaque pela superior qualidade nutricional às sementes não germinadas (PAJAŁK et al., 2019).

Na germinação ocorrem mudanças significativas nos processos bioquímicos, que irão impactar nas características nutricionais e sensoriais das sementes. A germinação promove intensa atividade metabólica, na qual ocorrem várias reações químicas envolvendo uma intensificação de processos que, dentre outras ações, atuam sobre os nutrientes armazenados nas sementes durante o processo de maturação (GAN et al., 2017).

O mais elevado ponto de vitalidade no ciclo de vida de uma planta ocorre quando esta é um broto, os quais apresentam altas concentrações de nutrientes e menores quantidade de antinutrientes (NONOGAKI, 2014). Porém os efeitos da germinação sobre a composição química, aspectos nutricionais e características sensoriais, variam com as espécies, cultivares vegetais e as condições de germinação das sementes (ROSENTAL; NONOGAKI; FAIT, 2014).

Durante o desenvolvimento da semente, ocorre o armazenamento de minerais nos tecidos, estes compostos armazenados são hidrolisados e transportados para os tecidos meristemáticos do embrião que gradualmente se desenvolve em uma plântula (GAN et al., 2017). Por outro lado, a germinação leva ao catabolismo e degradação dos principais macronutrientes, acompanhados do aumento de açúcares simples, aminoácidos livres e ácidos orgânicos (LIU; GUO; SHI, 2010). Ainda, pode reduzir os inibidores de protease e a lectina, promovendo um incremento na digestibilidade proteica (SHU et al., 2016). A germinação também é capaz de aumentar o conteúdo de vitaminas, como ácido ascórbico, riboflavina, tiamina e ácido fólico, e de compostos bioativos, como fenólicos, flavonoides e polifenóis (GHAVIDEL & PRAKASH, 2007).

As sementes utilizadas nesse processo, na sua maioria, possuem diversos efeitos biológicos como antioxidantes, antidiabéticos e hipocolesterolemiantes, e que

podem ser potencializados pela germinação, contribuindo ainda mais para a saúde humana (SIBIAN; SAXENA; RIAR, 2017). Portanto, a germinação é considerada promissora no intuito de proporcionar melhorias à saúde dos indivíduos a partir das alterações positivas que ela ocasiona na qualidade nutricional de sementes comestíveis.

O objetivo da presente revisão foi abordar o efeito da germinação na composição nutricional de sementes comestíveis e seus possíveis impactos sobre a bioacessibilidade e biodisponibilidade de nutrientes.

3.2 Processo germinativo e alterações na composição nutricional dos alimentos

Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), por meio da Associação Americana de Química dos Cereais (AACC), “sementes germinadas” são definidas como “sementes contendo todo o farelo, germe e endosperma originais devendo ser considerados sementes integrais, desde que o crescimento do rebento não exceda o comprimento do grão e os valores de nutrientes não tenham diminuído” devendo ser rotulados como “sementes integrais maltadas ou germinadas” (AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS, 2008).

A germinação é um processo que envolve tanto reações catabólicas, como a degradação de substâncias de reservas, quanto reações anabólicas na produção de novas células e organelas do embrião, sendo caracterizada como um processo irreversível e um dos mais delicados durante o ciclo de vida da planta (GAN et al., 2017).

O processo germinativo inicia-se a partir de uma semente viável, a qual foi submetida a condições externas, como temperatura, disponibilidade de água, luminosidade, composição de gases na atmosfera; e internas, com a presença de promotores da germinação (OLIVEIRA; FERREIRA; BORGHETTI, 2005). Além disso, é importante que a semente possua reservas de nutrientes que favoreçam o processo germinativo. Desse modo, os efeitos da germinação sobre a composição química, aspectos nutricionais e características sensoriais variam com as espécies, cultivares vegetais e as condições de germinação das sementes (ROSENTAL; NONOGAKI; FAIT, 2014).

De uma maneira geral, durante a formação da semente na planta mãe, observa-se inicialmente, um acúmulo de açúcares tais como sacarose, frutose e glicose, bem como, compostos nitrogenados como aminoácidos e amidas. Estas substâncias drenadas da planta são os principais metabólitos para a formação dos tecidos da semente e das substâncias de reserva que serão acumuladas para fornecimento de energia e substâncias básicas para o desenvolvimento do processo de germinação. Desta forma, à medida que a semente se desenvolve ocorre diminuição na quantidade destas substâncias mais simples e, ao mesmo tempo, um acúmulo de moléculas maiores e mais complexas como as proteínas, amido, lipídios e celulose (KANMAZ & OVA, 2015a). As proteínas exercem a função de armazenar enxofre e nitrogênio essenciais no desenvolvimento da plântula, ao passo que os carboidratos e os lipídios desempenham principalmente funções energéticas, mas também podem ser utilizados na formação de componentes estruturais (HÜBNER & ARENDT, 2013).

O fitato, oxalato e tanino são altamente concentrados em vários alimentos de origem vegetal, representando importantes fatores antinutricionais e afetando principalmente a biodisponibilidade de íons minerais, uma vez que são caracterizados por uma forte afinidade quelante com cátions. Mas a atividade de enzimas quelantes desses fatores, tende a aumentar durante a germinação, podendo melhorar a absorção desses minerais (KUMAR et al., 2010). Os cereais integrais contêm ainda, altas concentrações de antioxidantes, como polifenóis, carotenoides, ácido ascórbico e tocoferóis, que equilibram os danos oxidativos dos componentes celulares das plântulas (BAILLY, 2004). Geralmente, a germinação leva a um aumento no conteúdo total de alguns destes, embora diferentes contribuições de frações livres e ligadas sejam observadas, dependendo da espécie e das condições de germinação (ALVAREZ-JUBETE et al., 2010).

Os principais componentes nutricionais de sementes comestíveis que podem sofrer alterações no processo germinativo, são apresentados na Figura 1.

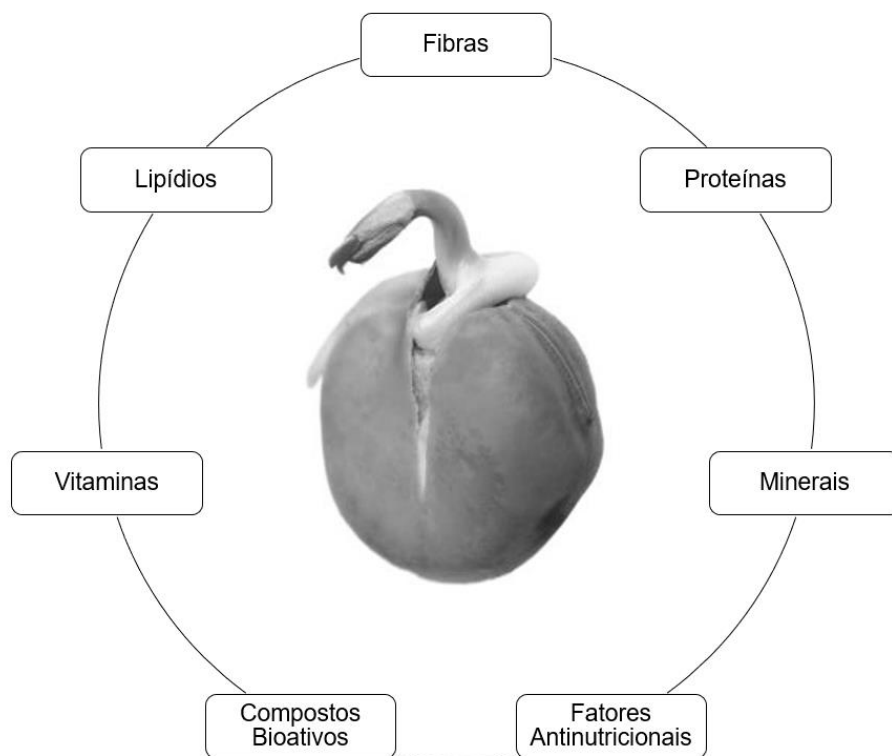


Figura 1. Principais componentes nutricionais de sementes comestíveis que podem sofrer alterações no processo germinativo.

Fonte: o autor.

3.2.1 Macronutrientes

3.2.1.1 Carboidratos

Os açúcares livres estão presentes em quantidades muito variáveis nas sementes de diferentes espécies. Eles raramente são o principal carboidrato de armazenamento, mas podem representar até 12-16% da massa seca em algumas leguminosas. Entretanto, em outras espécies, especialmente os cereais, pode ser inferior a 1%. O processo de germinação diminui o teor de amido da semente, devido à sua transformação em glicídios, porém estes não acumulam, são utilizados em grande parte na respiração, para a produção de energia, bem como na síntese de outras moléculas complexas (SINGH; SHARMA; SINGH, 2017).

A germinação facilita a decomposição enzimática de carboidratos em açúcares simples por meio da ativação de enzimas endógenas, como a α -amilase, melhorando assim a digestibilidade do amido, fornecendo energia para o desenvolvimento da semente (ZHANG, Ge et al., 2015). Um declínio do teor de amido é iniciado por condições de germinação, permitindo que a atividade enzimática da amilase hidrolise

o amido em moléculas de açúcar menores, como maltotriose e maltose. A duração do processo é um fator significativo na germinação. A hidrólise máxima do amido é entre 48 e 72 h, que é quando a amilase atinge o máximo da sua atividade (NIRMALA; SUBBA RAO; MURALIKRISHNA, 2000; TIAN, Binqiang et al., 2010).

No estágio inicial de germinação, é esperado que grandes porções de açúcares solúveis sejam consumidas durante a respiração e a α -amilase não tenha sido sintetizada ou ativada para hidrolisar o amido, levando a um menor aumento nos açúcares, sendo que o teor de açúcares redutores não parece ser significativamente afetado durante as primeiras 12 h de germinação (MBITHI-MWIKYA et al., 2000). No entanto, após 48 h de germinação, a dormência é perdida à medida que as enzimas amilolíticas sintetizadas na camada de aleurona migram para o endosperma e iniciam a hidrólise dos grânulos de amido (ZHANG, Ge et al., 2015). Os níveis de glicose e frutose são geralmente baixos nos cereais crus. No entanto, na germinação, os dois açúcares solúveis aumentam significativamente de tal forma que seus níveis substituem a ativação da sacarose da invertase, que hidrolisa a sacarose em glicose e frutose, levando a alterações do paladar e na digestibilidade dos carboidratos (TRAORÉ et al., 2004).

O efeito da germinação no teor de fibras das sementes germinadas é muitas vezes inconsistente e depende estritamente da fração da fibra, tempo de germinação e genótipos (NELSON et al., 2013). A perda de matéria seca resultante da hidrólise enzimática do amido e a quebra microbiana de materiais celulares, como proteínas, lipídios e carboidratos, poderiam explicar o aumento destas. Essa diferença também pode resultar do aumento da estrutura celular das plantas à medida que germinam. A fibra insolúvel, que consiste em celulose, lignina e hemicelulose, pode aumentar durante o processo de germinação, pois as células vegetais sintetizam diferentes componentes celulares (HUNG et al., 2012). Os estudos são controversos, pois alguns indicam redução no teor de fibras de leguminosas após a germinação, devido ao aumento da atividade das galactosidases (CHITRA; SINGH; RAO, 1996), e outros observam aumento no teor de fibras, o que pode ser devido a um aumento na produção de celulose e pectina durante a germinação (MARTÍN-CABREJAS et al., 2008; RAES et al., 2014).

Essas alterações podem ser observadas em estudos envolvendo preparações regionais tradicionais por exemplo, como no caso do *Kwati* (uma sopa de sementes

germinadas tradicional das montanhas do Nepal e partes do nordeste da Índia), que apresentou diminuição na concentração de carboidratos (CHAUDHARY et al., 2015), e em sementes isoladas como o tremoço e ervilha, que além dessa diminuição, apresentaram um aumento no teor de fibras (MARTÍN-CABREJAS et al., 2003; RUMIYATI; JAYASENA; JAMES, 2013).

Outros resultados relatando alterações na composição de carboidratos por meio da germinação podem ser observados na Tabela 1.

3.2.1.2 Proteínas

As proteínas de reserva de sementes são armazenadas em partículas proteicas ou grãos de aleurona. Durante a germinação, ocorre a hidrólise catalisada por proteases e os aminoácidos resultantes são transportados para os pontos de crescimento, onde são utilizados diretamente na formação de novas proteínas ou são oxidados para liberação de energia no ciclo de Krebs (HÜBNER & ARENDT, 2013).

No processo germinativo, muitas enzimas são ativadas e algumas proteínas são sintetizadas através de uma série de reações bioquímicas. Enquanto outras proteínas podem ser hidrolisadas pela protease, sendo que esse equilíbrio determina o conteúdo da proteínas nas sementes. Assim, o teor de proteínas depende do efeito da proteólise e da síntese proteica. Portanto, as mudanças no teor de proteínas durante a germinação consistem em um processo de regulação dinâmica (YIMING et al., 2015).

Os inibidores de tripsina também desempenham um papel importante na diminuição da digestão de proteínas desativando a tripsina, o que aumenta a atividade biológica das proteínas, ativando outras proteases de serina. A germinação tem mostrado diminuição no efeito dos inibidores de tripsina devido à instabilidade desses inibidores durante o processo germinativo (MAETENS et al., 2017). Já o aumento do teor de proteínas tem sido atribuído à liberação de proteínas compactada na estrutura da semente quando a α -amilase decompõe o grânulo de amido durante a germinação ou a síntese de proteínas (HEJAZI et al., 2016).

O aumento no teor de proteínas pode ser atribuído também a perdas no peso seco, particularmente nos carboidratos, através da respiração durante a germinação. As perdas em peso seco podem ser contabilizadas principalmente como perda de

açúcares durante a respiração devido à produção de dióxido de carbono e água, que escapam das sementes (MBITHI-MWIKYA et al., 2000).

De fato, há muitos argumentos que explicam o comportamento das proteínas durante a germinação, e diferentes conclusões já foram tiradas sobre esses efeitos em cereais e leguminosas germinadas, e o efeito da germinação nas proteínas das sementes ainda não é claro (MAETENS et al., 2017; ZHANG, Ge et al., 2015).

Alterações no conteúdo proteico após a germinação podem ser observadas no trigo-mourisco, por exemplo, em que houve diminuição significativa do teor de proteínas (YIMING et al., 2015), ao passo que, em um outro estudo também com trigo-mourisco, foi encontrado um aumento significativo nesse nutriente (ZHANG, Ge et al., 2015). Mais alterações no teor proteico também podem ser vistas em outros estudos com diferentes variedades de trigo (KOEHLER et al., 2007; SIBIAN; SAXENA; RIAR, 2017; HUNG et al., 2012).

Além disso, outras sementes também apresentam diferenças positivas e negativas nos teores de proteínas e na composição aminoacídica após a germinação (Tabela 1).

3.2.1.3 Lipídios

Mesmo nos cereais, onde o amido é o principal estoque de carbono no endosperma, os lipídios são abundantes nos tecidos vivos das sementes integrais na forma de óleo (GRAHAM, 2008). Das substâncias que são mobilizadas durante a germinação, os lipídios são as reservas que mais necessitam de etapas para se tornarem um produto de energia pronto para ser utilizado pela célula (HÜBNER & ARENDT, 2013). A mobilização de triacilgliceróis a partir de corpos oleosos requer uma atividade metabólica coordenada, que é iniciada com a germinação, levando à conversão líquida de óleo em açúcares. As lipases liberam primeiro os ácidos graxos esterificados do triacilglicerol. Os ácidos graxos livres podem então ser degradados através dos ciclos de β -oxidação e glicoxilato e subsequentemente convertidos em açúcares (GRAHAM, 2008).

Com isso, a germinação reduz o conteúdo de lipídios devido ao aumento da atividade lipolítica durante a germinação, provocando a hidrólise e utilização desses lipídios como fonte de energia para reações bioquímicas durante a germinação (JAN; SAXENA; SINGH, 2016). A degradação de nutrientes de reserva durante a

germinação, como os lipídios, serve para fornecer a energia necessária para a síntese de proteínas no crescimento das plantas, mas nem sempre essa situação pode ocorrer, e em alguns casos a germinação pode provocar um aumento nos teores de lipídios, em vez de sua redução (HAHM; PARK; MARTIN LO, 2009).

Além disso, a atividade das lipoxigenases mostra-se reduzida durante a germinação, sendo que esse intervalo é devido à variação no tempo de germinação. Tempos de germinação mais longos resultam em atividades mais baixas devido à degradação da lipoxigenase (BAU; VILLAUME; MÉJEAN, 2002). Na produção de um chips a partir de farinha de soja germinada por exemplo, observou-se reduções das atividades da lipoxigenase-1 e lipoxigenase-3 (MAETENS et al., 2017).

Em sementes de painço o teor de trioleína, diminuiu significativamente, sendo que essa redução pode ser parcialmente atribuída ao aumento da atividade de enzimas lipolíticas, resultando na hidrólise da trioleína em glicerol e ácido oleico durante o processo de germinação (XU et al., 2017). Por outro lado, Kim et al. (2012) observaram um aumento de lipídios, bem como de ácido linoleico e ácido oleico no arroz germinado, enquanto não foi encontrada nenhuma alteração no teor de lipídios em outro estudo com arroz (MOONGNGARM; SAETUNG, 2010).

Em sementes de linhaça marrom e dourada germinadas foi encontrada uma redução no teor de lipídios (HERCHI et al., 2015; KANMAZ & OVA, 2015a; LI et al., 2019), entretanto, em um dos estudos, exclusivamente o teor de ácido palmítico, aumentou notavelmente durante a germinação (KANMAZ & OVA, 2015a), enquanto em outro estudo, os lipídios foram encontrados aumentados após a germinação (KAUR; KAUR; BHISE, 2018).

Estudos realizados com sementes germinadas relacionando-se a alterações nos teores de lipídios, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Estudos relacionando a germinação de sementes comestíveis com alterações na composição de carboidratos, proteínas e lipídios.

| Ano | Autores | Alimento (espécie) | Tempo de germinação | Resultados |
|---------------------|-----------------------------------|---|---------------------|------------------------------|
| <i>Carboidratos</i> | | | | |
| 2000 | Nirmala; Subba Rao; Muralikrishna | Milheto (<i>Eleusine coracana</i>) | 96 h | ↓ CHO e amido |
| 2007 | Ghavidel & Prakash | Feijão-caupi, lentilha e grão-de-bico (<i>Vigna catjang</i> , <i>Lens culinaris</i> e <i>Cicer arietinum</i>) | 24 h | ↑ digestibilidade do amido |
| 2010 | Tian et al. | Aveia (<i>Avena nuda</i>) | 144 h | ↓ amido ↑ açúcares livres |
| 2012 | Hung et al. | Trigo (<i>Triticum aestivum</i>) | 48 h | ↑ fibras ↓ amido |
| 2013 | Świeca; Baraniak; Gawlik-Dziki | Lentilha (<i>Lens culinaris</i>) | 144 h | ↓ amido |
| 2015 | Chaudhary et al. | Variedades utilizadas na preparação do <i>Kwati</i> | 120 h | ↑ fibras ↓ CHO |
| 2016 | Megat; Azrina; Norhaizan | Feijão-mungu, soja e amendoim (<i>Phaseolus aureus</i> , <i>Glycine max</i> e <i>Arachis hypogaea</i>) | 72 h | ↑ fibras e açúcares totais |
| 2018 | Kaur; Kaur; Bhise | Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>) | 72 h | ↑ fibras |
| <i>Proteínas</i> | | | | |
| 2005 | Mubarak | Feijão-mungu (<i>Phaseolus aureus</i>) | 72 h | ↑ PTN |
| 2007 | Koehler et al. | Trigo (<i>Triticum aestivum</i>) | 122 h | ↑ AAs livres |

CHO: carboidratos; PTN: proteínas; AAs: aminoácidos. ↑: aumento; ↓: redução.

Continua Tabela 1.

| <i>Proteínas</i> | | | | |
|------------------|----------------------|---|-------|----------------------|
| 2012 | Hung et al. | Trigo (<i>Triticum aestivum</i>) | 48 h | ↑ AAs livres |
| 2013 | Chilomer et al. | Tremoço (<i>Lupinus luteus</i>) | 96 h | ↑ PTN |
| 2015 | Herchi et al. | Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>) | 96 h | ↑ PTN |
| 2015 | Villeneuve et al. | Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>) | 24 h | ↑ AAs essenciais |
| 2015 | Yiming et al. | Trigo-mouriso (<i>Fagopyrum tataricum Gaertn</i>) | 168 h | ↓ PTN |
| 2015 | Cornejo et al. | Arroz (<i>Oryza sativa</i>) | 48 h | ↑ PTN |
| 2017 | Sibian; Saxena; Riar | Trigo, arroz e triticale (<i>Triticum aestivum</i> , <i>Oryza sativa</i> e <i>Triticosecale Wittmack</i>) | 96 h | ↑ AAs não essenciais |
| 2018 | Kaur; Kaur; Bhise | Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>) | 72 h | ↑ PTN |
| <i>Lipídios</i> | | | | |
| 2012 | Hung et al. | Trigo (<i>Triticum aestivum</i>) | 48 h | ↓ LIP |
| 2012 | Kim et al. | Arroz (<i>Oryza sativa</i>) | 72 h | ↑ LIP |
| 2015 | Herchi et al. | Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>) | 96 h | ↓ LIP |
| 2015 | Kanmaz & Ova | Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>) | 120 h | ↓ LIP |
| 2016 | Sharma; Saxena; Riar | Milheto (<i>Echinochloa frumentaceae</i>) | 82 h | ↑ ácido palmítico |
| 2017 | Maetens et al. | Soja (<i>Glycine max</i>) | 120 h | ↓ lipoxigenase |
| 2017 | Xu et al. | Painço (<i>Coixlachryma-jobi</i>) | 60 h | ↓ trioleína |
| 2018 | Kaur; Kaur; Bhise | Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>) | 72 h | ↑ LIP |
| 2019 | Li et al. | Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>) | 120 h | ↓ LIP |

PTN: proteínas; AAs: aminoácidos; LIP: lipídios. ↑: aumento; ↓: redução.

3.2.2 Micronutrientes

3.2.2.1 Minerais

A diferença na disponibilidade de minerais entre as sementes após a germinação por período similar, pode estar relacionada a diferenças no conteúdo de antinutrientes, ativação de enzimas, extensão da ligação dos minerais dentro da matriz ou interação desses fatores (PAJAK et al., 2019).

As perdas de minerais durante o processo de embebição antes da germinação podem ser atribuídas à lixiviação de minerais, que se desprendem da semente na forma livre e / ou complexados pelo fitato ou associado a compostos fenólicos, que são solubilizados durante o processo e significativamente reduzidos pela germinação (RAHMA et al., 2015). Durante alguns processos de germinação as perdas de magnésio (Mg) por exemplo, continuam, embora em ordem decrescente, o que sugere que a quantidade solúvel desse mineral suscetível de lixiviar a partir da semente diminui com o aumento dos períodos de germinação (URBANO et al., 2006).

Já o aumento no conteúdo mineral de sementes germinadas é provavelmente devido à perda de matéria seca devido ao metabolismo das sementes, isso é atribuído à melhoria na extração mineral causada pela germinação. Além disso, a absorção de certos minerais do meio de crescimento também poderia ser parcialmente responsável pelo aumento destes durante a germinação (SUNG et al., 2005).

Um aumento no teor de minerais é observado principalmente como resultado da hidrólise do fitato devido ao aumento da atividade enzimática da fitase. O fator antinutricional, atua como um poderoso agente quelante e, com isso, reduz a biodisponibilidade de minerais que formam complexos insolúveis (SHARMA; SAXENA; RIAR, 2016). Após esse aumento, a atividade da fitase pode diminuir significativamente, provavelmente devido à degradação da enzima pela protease ativa ou devido à inibição pela acumulação de fosfato (SUNG et al., 2005).

Alterações na composição mineral de sementes comestíveis após a germinação são apresentadas na Tabela 2.

3.2.2.2 Vitaminas

A germinação aumenta o conteúdo de vitaminas presentes em cereais e leguminosas, tais como riboflavina, niacina e tiamina em lentilha e feijão-fava por exemplo (PRODANOV; SIERRA; VIDAL-VALVERDE, 1997). Aumentos estes que podem ser devido a síntese dessas vitaminas pelos novos brotos (ŽILIC et al., 2014). No entanto, as perdas de vitaminas também são comuns durante a germinação, como a de tiamina em arroz integral (MOONGNARM & SAETUNG, 2010), que pode ser devido à lixiviação no processo de germinação.

Além destas vitaminas, o ácido ascórbico é um dos que mais sofrem alterações durante o processo germinativo. O ácido ascórbico é essencial para diferentes atividades fisiológicas para proteger as espécies vegetais dos danos induzidos pelo estresse oxidante, incluindo o estágio inicial da germinação dos embriões (TOMMASI et al., 2001). Ele pode ser sintetizado por plantas e animais a partir de glicose, manose e galactose. Portanto, o aumento do ácido ascórbico durante a germinação é impulsionado pela hidrólise enzimática do amido por amilases e diástases que aumentam a disponibilidade de glicose para a biossíntese do ácido ascórbico. É esse conteúdo aprimorado de glicose que atua como um precursor para a formação de ácido ascórbico (WANG et al., 2015a).

O acúmulo de ácido ascórbico em sementes comestíveis germinadas pode ser devido à síntese *de novo*, uma vez que a maioria das sementes antes da germinação apresenta conteúdo de ácido ascórbico muito baixo ou mesmo não detectável. Além disso, a atividade de L-galactono- γ -lactona desidrogenase, que é uma das enzimas chave na biossíntese do ácido ascórbico e catalisa a oxidação de l-galactono-1,4-lactona de ácido ascórbico, tem sido encontrado para ser significativamente aumentada durante a germinação de sementes de soja, paralelamente ao aumento do teor de ácido ascórbico (XU; DONG; ZHU, 2005).

Além disso, a germinação pode alterar de forma distinta o teor de isômeros do tocoferol em sementes comestíveis, no entanto, os mecanismos potenciais permanecem incertos. γ -tocoferol é o principal componente entre os tocoferóis em diversas sementes comestíveis, sendo significativamente aumentada em soja germinada, mas reduzida em tremoço e feijão-mungu, por exemplo (FERNANDEZ-OROZCO et al., 2008). Portanto, a influência da germinação do tocoferol depende de sementes específicas.

Estudo mostra que o conteúdo de ácido ascórbico, fenólicos, antioxidantes e isoflavonas em soja e feijão-mungu foram significativamente aumentados durante a germinação (HUANG; CAI; XU, 2014). Outros dois estudos com feijão-mungu (GAN et al., 2016; GUO et al., 2012) e um com soja (WANG et al., 2015b), mostraram aumento no conteúdo de ácido ascórbico, e ainda no caso da soja, também foi observado aumento nos teores de α -tocoferol, γ -tocoferol e δ -tocoferol. Resultados semelhantes foram encontrados na germinação de ervilha (SIERRA & VIDAL-VALVERDE, 1999). E em sementes de linhaça, o conteúdo de ácido ascórbico também foi aumentado após a germinação (HERCHI et al., 2015; JUN et al., 2018).

Estudos realizados com sementes germinadas relacionando-se com vitaminas são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Estudos relacionando a germinação de sementes com a composição de minerais e vitaminas.

| Ano | Autores | Alimento (espécie) | Tempo de germinação | Resultados |
|------------------|----------------------------------|--|---------------------|---|
| <i>Minerais</i> | | | | |
| 2006 | Urbano et al. | Ervilha (<i>Pisum sativum</i>) | 96 h | ↓ Zn e Mg |
| 2010 | Platel; Eipeson; Srinivasan | Trigo (<i>Triticum aestivum</i>) | 48 h | ↑ Fe e Zn |
| 2011 | Afify et al. | Sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>) | 72 h | ↓ Fe e Zn |
| 2014 | Suma & Urooj | Milheto (<i>Pennisetum typhoideum</i>) | 72 h | ↑ Fe e Ca |
| 2017 | Kajla; Sharma; Sood | Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>) | 48 h | ↑ Fe, Zn e Mn |
| 2017 | Sandhu; Kaur; Bhise | Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>) | 48 h | ↑ Ca |
| 2018 | Lemmens et al. | Trigo (<i>Triticum aestivum</i>) | 120 h | ↑ Fe e Zn |
| 2019 | Pajak et al. | Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>) | 168 h | ↑ Mg e Zn ↓ Na, K, Fe, Ca e Mn |
| <i>Vitaminas</i> | | | | |
| 1997 | Prodanov; Sierra; Vidal-Valverde | Lentilha e feijão-fava (<i>Lens culinaris</i> e <i>Vicia Faba</i>) | 144 h | ↑ Vit. B ₁ , B ₂ e B ₃ |
| 1999 | Sierra & Vidal-Valverde | Ervilha (<i>Pisum sativum</i>) | 144 h | ↑ Vit B ₂ e B ₆ ↓ B ₁ |

Ca: cálcio; Fe: ferro; K: potássio; Mg: magnésio; Mn: manganês; Na: Sódio; Zn: zinco; Vit: vitamina. ↑: aumento; ↓: redução.

Continua Tabela 2.

Vitaminas

| | | | | |
|------|-------------------------|---|-------|---------------------|
| 2008 | Fernandez-Orozco et al. | Feijão-mungu, tremoço e soja (<i>Vigna radiata</i> , <i>Lupinus luteus</i> e <i>Glycine max</i>) | 120 h | ↑ Vit. E ↓ Vit E |
| 2014 | Huang; Cai; Xu | Soja e feijão-mungu (<i>Glycine max</i> e <i>Vigna radiata</i>) | 72 h | ↑ Vit. C |
| 2016 | Gan et al. | Feijão-mungu (<i>Vigna radiata</i>) | 120 h | ↑ Vit. C |
| 2018 | Jun et al. | Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>) | 192 h | ↑ Vit. C |

Vit: vitamina. ↑: aumento; ↓: redução.

3.2.3 Germinação e compostos bioativos

Durante a germinação, várias reações bioquímicas são iniciadas nas sementes, o que resulta em aumento de flavonóides, polifenóis, tocoferóis e ácido γ -aminobutírico (GABA), melhorando as atividades antioxidantes (KHANG et al., 2016). Ainda, alguns pesquisadores sugerem que a germinação é um bioprocessamento adequado e efetivo para aumentar a concentração de compostos fenólicos em sementes. Isto pode ser devido à liberação e biossíntese desses compostos. Enzimas que degradam a parede celular são ativas durante a germinação e contribuem para a modificação da estrutura da parede celular do grão. O significado disso está no fato de que compostos fenólicos como ácidos hidroxicinâmicos estão vinculados a polissacarídeos não-amiláceos em paredes celulares de sementes através de associações tais como ligações éster e éter. A ação de enzimas que degradam a parede celular nessas ligações contribui para a liberação de compostos fenólicos ligados (ALVAREZ-JUBETE et al., 2010).

Os compostos fenólicos e flavonóides são importantes metabólitos secundários nas plantas, que não estão envolvidos apenas nos processos de reprodução, crescimento e coloração das flores e frutos das espécies vegetais, mas também desempenham um papel importante na proteção dos vegetais (WANG et al., 2015a).

No processo de crescimento, a L-fenilalanina é transformada em ácido cinâmico sob a catálise de fenilalanina amonilase (PAL). E então, muitos componentes fenólicos como o ácido ferúlico e cafeico são sintetizados (KIM et al., 2012). A atividade da PAL pode ser aumentada durante a germinação. Assim, pode-se supor que o aumento do teor total de fenólicos, flavonóides e de tanino condensado observado na maioria dos processos germinativos, pode ser devido ao aumento da atividade PAL durante o estágio inicial de germinação (WINKEL-SHIRLEY, 2001).

O GABA é um aminoácido não proteico amplamente existente em plantas e animais. Nos mamíferos, funciona como um importante neurotransmissor do sistema nervoso e pode regular a pressão arterial e a frequência cardíaca, aliviar a dor e a ansiedade e aumentar a secreção de insulina do pâncreas (ADEGHATE & PONERY, 2002). Nas plantas, pode ser sintetizado através de diferentes vias de sinalização, sendo sintetizado principalmente a partir do ácido L-glutâmico via glutamato descarboxilase (GAD), ou pode ser transformado via intermediário γ -aminobutiraldeído a partir de poliamina, em cujo processo a diamina oxidase (DAO)

está envolvida (SHELP et al., 2012). Vários estudos demonstraram que a atividade de GAD e DAO é significativamente aumentada durante a germinação de sementes (XU et al., 2010; XU & HU, 2014; YANG; CHEN; GU, 2011). Portanto, o acúmulo de GABA em sementes germinadas pode ser devido ao aumento da atividade de enzimas endógenas envolvidas nas vias metabólicas do GABA (GAN et al., 2017).

Cereais e leguminosas germinados, como arroz integral, gergelim, trigo, aveia, lentilha soja e feijão, podem acumular significativamente GABA (HUANG; CAI; XU, 2017; MARTINEZ-VILLALUENGA et al., 2010).

Embora diferentes métodos de avaliação sejam utilizados para avaliar compostos bioativos e a capacidade antioxidante em sementes comestíveis germinadas, a maioria desses estudos alcançou um resultado consistente de que a germinação pode aumentar significativamente esses valores quando comparados com sementes não germinadas (ZHANG, Ge et al., 2015). No entanto, estudos relatam diminuição ou flutuação de compostos bioativos e da capacidade antioxidante em determinadas sementes (AGUILERA et al., 2014; ALVAREZ-JUBETE et al., 2010; GUAJARDO-FLORES; SERNA-SALDÍVAR; GUTIÉRREZ-URIBE, 2013). Essa contradição pode ser parcialmente associada com os resultados expressos como peso úmido ou peso seco, considerando que o teor de água durante a germinação é gradualmente aumentado durante o processo de germinação (AGUILERA et al., 2014).

Estudos mostram aumento no teor de α -tocoferol (KIM; HAN; HAN, 1997), diglucosídeo secoisolariciresinol (SDG) (KIM; HAN; HAN, 1997; WANG et al., 2016), flavonóides, fenólicos totais (JUN et al., 2018) e lignanas (VILLENEUVE et al., 2015) em linhaça marrom e dourada germinadas, melhorando de forma geral a capacidade antioxidante dessas sementes. Ao passo que em outros estudos, foi observado uma redução nos níveis de γ -tocoferol (KIM; HAN; HAN, 1997), SDG e fenólicos esterificados (KANMAZ & OVA, 2015b) e nos fenóis totais e na atividade antioxidante (KAUR; KAUR; BHISE, 2018) dessas sementes.

Diversos estudos mostram alterações positivas e negativas da germinação em vários compostos bioativos dos mais variados tipos de sementes comestíveis (Tabela 3).

Tabela 3 - Estudos relacionando a germinação de sementes com a composição de compostos bioativos.

| Ano | Autores | Alimento (espécie) | Tempo de germinação | Resultados |
|------|--------------------------|---|---------------------|----------------------------------|
| 1997 | Kim; Han; Han | Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>) | 48 h | ↑ SDG e tocoferóis totais |
| 2003 | Plaza; De Ancos; Cano | Soja e alfafa (<i>Glycine max</i> e <i>Medicago sativa</i>) | 24 h | ↑ fitoestrogênos |
| 2004 | Tian; Nakamura; Kayahara | Arroz (<i>Oryza sativa</i>) | 24 h | ↑ fenólicos insolúveis |
| 2012 | Hung et al. | Trigo (<i>Triticum aestivum</i>) | 48 h | ↑ GABA e fenólicos totais |
| 2014 | Pajåk et al. | Feijão-mungu e girassol (<i>Vigna radiata</i> e <i>Helianthus annuus</i>) | 120 h | ↑ fenólicos e flavonóides totais |
| 2015 | Zhang et al. | Trigo (<i>Triticum aestivum</i>) | 72 h | ↑ fenólicos e flavonóides totais |
| 2015 | Kanmaz & Ova | Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>) | 264 h | ↓ SDG |
| 2015 | Villeneuve et al. | Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>) | 24 h | ↑ lignanas |
| 2015 | Wang et al. | Soja (<i>Glycine max</i>) | 120 h | ↑ GABA e isoflavonas |
| 2016 | Wang et al. | Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>) | 192 h | ↑ SDG |
| 2017 | Huang; Cai; Xu | Soja (<i>Glycine max</i>) | 72 h | ↑ GABA e isoflavonas |
| 2017 | Xu et al. | Painço (<i>Coix lachryma-jobi</i>) | 60 h | ↑ GABA |
| 2017 | Gómez-Favela et al. | Chia (<i>Salvia hispanica</i>) | 120 h | ↑ GABA e fenólicos totais |

SDG: diglucosídeo secoisolariciresinol; GABA: ácido γ -aminobutírico. ↑: aumento; ↓: redução.

Continua Tabela 3.

| | | | | |
|------|--------------|---|-------|----------------------------------|
| 2018 | Gong et al. | Milho (<i>Zea mays</i>) | 72 h | ↑ fenólicos e flavonóides totais |
| 2018 | Jun et al. | Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>) | 192 h | ↑ fenólicos e flavonóides totais |
| 2019 | Pajał et al. | Chia e linhaça (<i>Salvia hispanica</i> e <i>Linum usitatissimum</i>) | 168 h | ↑ fenólicos e flavonóides totais |

↑: aumento.

3.2.4 Fatores antinutricionais

As sementes contêm níveis significativos de fatores antinutricionais que prejudicam seus benefícios nutricionais e de saúde. Entre esses antinutrientes incluem inibidores de tripsina e quimotripsina, oxalato, lectina, oligossacarídeos da família da rafinose, saponinas, tanino e polifenóis de fitato (WANG et al., 2010). Fitato e tanino são antinutrientes estáveis ao calor, de maior preocupação com relação à biodisponibilidade mineral, que se refere à proporção de um mineral que é absorvido e utilizado através de vias metabólicas normais (HAILESLASSIE; HENRY; TYLER, 2016).

O fitato pode quelar metais di e trivalentes e interagir com proteínas e vitaminas. Na forma aniônica pode ligar-se a minerais, proteínas e amido no trato digestivo, diminuindo a biodisponibilidade destes nas sementes (GHUMMAN; KAUR; SINGH, 2016). O fitato é formado durante a maturação das sementes das plantas e, portanto, as diferenças no conteúdo de fitato das sementes podem ser devidas a diferenças no grau de maturação durante a colheita (LUO et al., 2018).

A ação antinutricional do tanino está baseada na capacidade de formar complexos insolúveis com minerais, proteínas e amidos biologicamente indisponíveis para seres humanos em condições fisiológicas normais (AMAROWICZ; DYKES; PEGG, 2008).

O oxalato é formado nas plantas pela oxidação incompleta de carboidratos ocasionada pela ação de fungos (*Aspergillus niger*) ou bactérias (*Acetobacter*) (SUNG et al., 2005). Como produto final metabólico em humanos, o oxalato não exibe ação benéfica e devem ser excretados na urina. Os efeitos adversos dos oxalato são devidos à sua capacidade de quelar minerais, reduzindo assim a biodisponibilidade mineral (JUDPRASONG et al., 2006).

A diminuição desses fatores no processo germinativo pode ser parcialmente atribuída ao aumento da atividade de enzimas como a fitase e a oxalato oxidase, que resultam na hidrólise desses componentes (SUNG et al., 2005). É importante ressaltar que as sementes contêm essas enzimas endógenas e que são ativadas naturalmente pela germinação (LUO et al., 2018). Além disso, a lixiviação do teor solúvel desses fatores pela água utilizada no processo de germinação, também pode explicar a diminuição no teor total dos mesmos (SUMA & UROOJ, 2014). Por outro lado, estudo não encontrou redução significativa no teor de fitato da linhaça após a germinação, a qual pode ser devido à menor relação semente / água (HEMALATHA; PLATEL; SRINIVASAN, 2007).

A redução desses fatores antinutricionais em sementes comestíveis podem ser observadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Estudos relacionando a germinação de sementes com a concentração de fatores antinutricionais.

| Ano | Autores | Alimento (espécie) | Tempo de germinação | Resultados |
|------------|--------------------------------|---|----------------------------|--------------------|
| 2002 | Egli et al. | Grão-de-bico (<i>Cicer arietinum</i>) | 48 h | ↓ tanino |
| 2007 | Shimelis & Rakshit | Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>) | 96 h | ↓ fitato e tanino |
| 2007 | Khattak et al. | Grão-de-bico (<i>Cicer arietinum</i>) | 96 h | ↓ fitato |
| 2011 | Azeke et al. | Feijão-guandu, feijão-fava e feijão-africano (<i>Cajanus cajan</i> , <i>Phaseolus lunatus</i> e <i>Sphenostylis stenocarpa</i>) | 168 h | ↓ fitato |
| 2013 | Gharachorloo; Tarzi; Baharinia | Lentilha (<i>Lens culinaris</i>) | 120 h | ↓ fitato e tanino |
| 2014 | Bains; Uppal; Kaur | Grão-de-bico, feijão-caupi e feijão-guandu (<i>Cicer arietinum</i> , <i>Vigna unguiculata</i> e <i>Cajanus cajan</i>) | 48 h | ↓ fitato |
| 2014 | Suma & Urooj | Milheto (<i>Pennisetum typhoideum</i>) | 72 h | ↓ oxalato e fitato |
| 2017 | Kajla; Sharma; Sood | Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>) | 48 h | ↓ fitato |
| 2019 | Erba et al. | Grão-de-bico e ervilha (<i>Cicer arietinum</i> e <i>Pisum sativum</i>) | 72 h | ↓ fitato |

↓: redução.

3.3 Impacto da germinação em estudos *in vitro* e *in vivo*

Antes de ser capaz de exercer um efeito benéfico no corpo, um determinado nutriente ou composto bioativo de um alimento deve primeiro ser bioacessível dentro da matriz alimentar. A fração bioacessível é a “fração liberada da matriz alimentar e disponível para absorção intestinal”. Devido a algumas dificuldades no acesso ao trato digestivo humano, esta fração é geralmente medida em sistemas digestivos simulados *in vitro*. Assim, em geral, em artigos de pesquisa relatando estudos realizados *in vitro*, o termo "bioacessível" e não "biodisponível" deve ser usado (LESTIENNE et al., 2007).

A biodisponibilidade captura a fração de uma substância que entra na circulação sistêmica para induzir a função fisiológica pretendida ao atingir o local alvo. A fração biodisponível de um composto ingerido é “a fração do nutriente ingerido que está disponível para utilização em funções fisiológicas normais e para armazenamento”. O conceito de biodisponibilidade, portanto, implica a noção do alvo fisiológico a ser alcançado pelo composto bioativo. Entende-se que uma fração bioacessível de um nutriente pode não atingir totalmente seu alvo (PARADA & AGUILERA, 2007).

Os impactos da germinação em estudos *in vitro* e *in vivo* são apresentados na Figura 2.

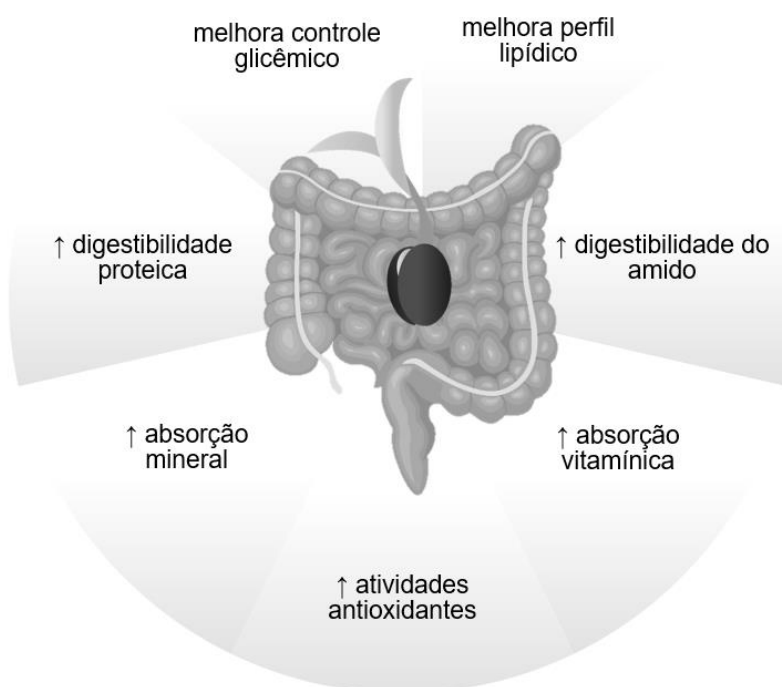


Figura 2. Impactos da germinação em estudos *in vitro* e *in vivo*.
Fonte: o autor.

3.3.1 Estudos *in vitro* - bioacessibilidade de nutrientes

Investigando-se a influência da germinação no milho, trigo e cevada na bioacessibilidade do ferro (Fe), zinco (Zn), manganês (Mn), cobre (Cu) e Ca, concluiu-se que, a germinação aumentou a bioacessibilidade do Fe no milho e no trigo, enquanto a bioacessibilidade do Zn aumentou no trigo e na cevada e reduziu no milho. A bioacessibilidade do Ca e Mn do milho e do trigo também aumentaram e o teor Cu diminuiu significativamente na cevada (PLATEL; EIPESON; SRINIVASAN, 2010).

Entre os inibidores da bioacessibilidade mineral inerente às sementes, o fitato tem sido observado como dominante em relação às fibras, tanino ou oxalato. Durante a germinação, a síntese *de novo* e ativação de fitases endógenas com concomitante diminuição no conteúdo de fitato ocorre em cereais e leguminosas. O efeito benéfico da germinação na bioacessibilidade dos minerais, pode provavelmente ser atribuído à diminuição desse conteúdo, mas em alguns tipos de sementes cujo conteúdo de fitato intrínseco já é relativamente menor, costumam não encontrar vantagens no aumento da bioacessibilidade desses minerais por meio do processo germinativo. Entretanto, nessas sementes cujo conteúdo de fitato não parece ser afetado pela germinação, o tanino ou o oxalato podem-se mostrar significativamente diminuídos, o que também pode levar a essa melhor bioacessibilidade mineral (PLATEL; EIPESON; SRINIVASAN, 2010).

A germinação também pode causar a ativação de enzimas que degradam os componentes da matriz alimentar, aumentando assim a digestibilidade dos nutrientes (CORREIA et al., 2010). Sendo que essas alterações dependem da variedade da semente.

Em sementes de sorgo, a solubilidade das proteínas aumentou significativamente. Além disso, a digestibilidade proteica *in vitro* foi significativamente aumentada após os tratamentos de germinação (AFIFY et al., 2012). Sementes de feno-grego germinadas melhoraram a bioacessibilidade de Fe, Zn e Ca e aumentaram a digestibilidade *in vitro* das proteínas e do amido (HOODA & JOOD, 2003).

A germinação causou significativo aumento na bioacessibilidade de Fe e Ca e na digestibilidade *in vitro* de amido e de proteínas do feijão-mungu, feijão-caupi, lentilha e grão-de-bico, sendo que o percentual de Fe e Ca bioacessíveis e a digestibilidade *in vitro* de amido e de proteínas, correlacionaram-se significativamente

e negativamente com os teores de ácido fítico, tanino e fibras (GHAVIDEL & PRAKASH, 2007).

Em alguns casos a germinação não é capaz de melhorar significativamente a disponibilidade dos minerais das sementes, podendo ser interessante combinar métodos de processamento com outras abordagens, como a aplicação de intensificadores de captação e o tratamento com fitase, para melhorar esse fator (LIANG et al., 2008).

Pensando nisso, que alguns estudos trabalham com a fortificação das sementes durante o processo de imersão e germinação. Estudos sobre alimentos à base de cereais germinados, relatam que a germinação não melhora o estado do Fe e que se precisa combinar com fortificação (MAMIRO et al., 2004; PYNAERT et al., 2006; TATALA et al., 2007; WEI et al., 2013). A possível razão, pode ser que essas mudanças estão relacionadas a uma alteração no conteúdo e / ou na atividade de ácido fítico e compostos fenólicos no grão como resultado do processamento. Embora o processo de germinação possa aumentar a quantidade de Fe solúvel, o ácido fítico residual em sementes ainda interfere na absorção de Fe, além disso os processos de germinação também quebram polímeros e os compostos monoméricos resultantes podem complexar com Fe dentro do lúmen intestinal, limitando a absorção de Fe (PYNAERT et al., 2006).

A incubação com adição de fitase também pode ser uma alternativa a ser incorporada no processo de germinação no intuito de melhorar os valores nutricionais das sementes. Os valores da bioacessibilidade de Zn e Fe aumentaram enquanto a do Ca diminuiu em sementes de soja e feijão-mungu germinados, mas os valores de bioacessibilidade da soja para Zn, Fe e Ca foram ainda maiores após a incubação (WANG et al., 2015c).

Um outro método que pode ser utilizado durante a germinação para melhorar a bioacessibilidade mineral, é a imersão da semente em solução de pH básico. Esse processo, parece ter um efeito protetor em relação às perdas minerais pela solubilização em comparação com o processo de imersão com água normal, assim, a perda mineral reduzida na forma solúvel do mineral, juntamente com a sua maior ingestão, favorece a utilização digestiva dos minerais (KAUP et al., 1990). O estudo de Nestares et al. (2003), mostrou que o teor de Ca do feijão aumentou à medida que o pH da solução de imersão aumentava. Este resultado deve-se ao fato de que o

processamento da leguminosa modifica outros componentes que afetam a absorção de Ca. Assim, a melhoria na qualidade proteica por imersão da semente em solução pH básico favorece a absorção de Ca. Além disso, à medida que o pH da solução aumenta, o Ca menos solúvel é perdido e a bioacessibilidade do mineral melhora (KAUP et al., 1990).

O destino dos alimentos no trato gastrointestinal é de fato extremamente complexo e depende de parâmetros físicos e físico-químicos, além de parâmetros hormonais do indivíduo e de seu perfil genético. Mas simulá-lo com a digestão *in vitro*, integrando a mastigação e o esvaziamento gástrico, pode abordar um pouco dessa complexidade e ser vantajoso, já que estes são dois passos fundamentais para disponibilizar os nutrientes para o intestino delgado, o principal local de absorção (FARDET, 2015).

Estudos realizados com sementes germinadas relacionando-se com a bioacessibilidade de nutrientes são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Estudos *in vitro* relacionando a germinação de sementes com a bioacessibilidade de nutrientes.

| Ano | Autores | Alimento (espécie) | Tempo de germinação | Metodologia | Resultados |
|------|-----------------------------|---|---------------------|--|---|
| 2003 | Hooda & Jood | Feno-grego (<i>Trigonella foenum-graecum</i>) | 48 h | Digestão <i>in vitro</i> das farinhas | ↑ bioacessibilidade de Ca, Fe e Zn ↑ digestibilidade <i>in vitro</i> de proteínas e amido |
| 2007 | Ghavidel & Prakash | Feijão-mungu, feijão-caupi, lentilha e grão-de-bico (<i>Phaseolus aureus</i> , <i>Vigna catjang</i> , <i>Lens culinaris</i> e <i>Cicer arietinum</i>) | 24 h | Digestão <i>in vitro</i> das farinhas | ↑ bioacessibilidade de Ca e Fe ↑ digestibilidade <i>in vitro</i> de proteínas e amido |
| 2010 | Platel; Eipeson; Srinivasan | Milheto, trigo e cevada (<i>Eleusine coracana</i> , <i>Triticum aestivum</i> e <i>Hordeum vulgare</i>) | 48 h | Digestão <i>in vitro</i> das farinhas | ↑ bioacessibilidade de Fe, Ca e Mn do milho; Fe, Zn, Ca e Mn do trigo e; Zn da cevada ↓ bioacessibilidade de Zn do milho e de Cu da cevada |
| 2012 | Afify et al. | Sorgo (<i>Sorghum moench</i>) | 72 h | Digestão <i>in vitro</i> das farinhas | ↑ solubilidade das proteínas e da digestibilidade proteica <i>in vitro</i> |
| 2015 | Wang et al. | Soja e feijão-mungu (<i>Glycine max</i> e <i>Vigna radiate</i>) | 96 h | Digestão <i>in vitro</i> das farinhas incubadas com adição de fitase | ↑ bioacessibilidade de Ca, Fe e Zn |

Ca: cálcio; Cu: cobre; Fe: ferro; Mn: manganês; Zn: zinco. ↑: aumento; ↓: redução.

3.3.2 Estudos *in vivo* – biodisponibilidade de nutrientes e efeitos fisiológicos

Não é suficiente que o alimento contenha um nutriente benéfico em particular, para que seja totalmente utilizado pelo organismo. Entre os alimentos e seus efeitos na saúde, há o destino digestivo, a bioacessibilidade de seus componentes, sua absorção intestinal e / ou colônica, seu metabolismo, sua biodisponibilidade e, finalmente, um efeito potencial para a saúde (FARDET, 2015). Além disso, os elementos constituintes de um alimento não são 100% biodisponíveis e sua cinética de liberação pode afetar muito o efeito geral de saúde dos alimentos. Cada vez mais as pesquisas tendem a considerar o alimento não como um conjunto de compostos isolados, mas como uma soma de componentes, interagindo entre si e com outros alimentos e componentes da dieta (SLATTERY, 2008).

Dietas experimentais contendo arroz germinado foram utilizadas para investigar a influência da germinação sobre o colesterol sanguíneo em ratos hipercolesterolêmicos. A hipercolesterolemia e a lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram melhoradas com sucesso pelas dietas experimentais contendo arroz germinado. Em comparação com o controle, a germinação teve um efeito significativo no colesterol sanguíneo. Verificou-se também que o melhor efeito no perfil lipídico de ratos hipercolesterolêmicos foi observado com o prolongamento do tempo de germinação, que levou a um aumento dos componentes bioativos, proporcionando uma dieta funcional mais eficiente, e conseqüentemente afetando o alto nível de colesterol no sangue (ROOHINEJAD et al., 2010).

Avaliou-se também o arroz germinado em coelhos. O grupo arroz germinado teve impacto positivo no aumento da atividade das enzimas antioxidantes e no nível de vitamina E e na redução da peroxidação lipídica, prevenindo a formação de placas ateroscleróticas. Além disso, a dieta também reduziu o nível de enzimas hepáticas, sugerindo que o arroz germinado tem efeitos protetores potentes contra a lesão hepática induzida por estresse, por meio de atividades antioxidantes (ESA et al., 2013).

Foram estudados os efeitos do arroz no estado antioxidante em ratos diabéticos tipo 2, induzidos com dieta hiperlipídica e injeção de estreptozotocina. Melhoraram-se as atividades de eliminação de radicais glicêmicos e hidroxilas nos rins, preveniu-se a deterioração do status antioxidante total, preservou-se as enzimas hepáticas, assim

como a creatinina sérica e produziu-se um melhor controle glicêmico (IMAM et al., 2012a).

Dois anos depois, Imam et al. (2014) avaliaram os efeitos do arroz no manejo dietético de doenças cardiovasculares em ratos hipercolesterolêmicos induzidos por dieta. Houve redução dos pesos corporais e melhora nos perfis lipídicos no grupo com arroz germinado, sugerindo que o arroz germinado poderia reduzir o risco de desenvolver doenças cardiovasculares, melhorando o metabolismo e a dislipidemia. Além disso, observou-se redução do estresse oxidativo e, conseqüentemente, menores níveis de LDL-oxidada do que no grupo controle.

A biodisponibilidade de Ca foi avaliada em 11 alimentos de origem vegetal e animal, utilizando-se ratos como modelo experimental. A biodisponibilidade de Ca foi encontrada como sendo mais alta em peixes e queijos fermentados, mas a germinação de feijão-fava também aumentou a biodisponibilidade do Ca para um valor comparável ao de alguns produtos de origem animal, demonstrando que o processo de germinação está associado a um aumento na biodisponibilidade mineral, sugerindo-se que a quebra de proteínas complexas sob o processo germinativo é o mecanismo subjacente de ação (GHANEM & HUSSEIN, 1999). A esse respeito, a germinação do feijão-mungu e do feijão-caupi foi responsável por considerável degradação e redução no conteúdo de ácido fítico, sendo que tais mudanças bioquímicas no conteúdo das sementes foram sugeridas como responsáveis em melhorar a biodisponibilidade do Ca (KUMAR et al., 1978).

Sementes de ervilha germinadas por 4 dias, melhoraram a biodisponibilidade de Zn e Mg, superando as reduções nesses teores causadas pela imersão das sementes (URBANO et al., 2006). Além disso, tanto a fermentação quanto a germinação de feijões, melhoraram a retenção de Zn, e somente a germinação melhorou significativamente a absorção de Zn e influenciou positivamente a retenção de Fe. A germinação diminuiu o nível de fitato no estudo de Fe e essa diminuição provavelmente explica o aumento na disponibilidade de Fe das sementes germinadas. Mas os resultados deste estudo mostram que uma diminuição nos níveis de fitato não resultou em melhor absorção e retenção do Fe. Esses resultados indicam que outros fatores como tanino, quantidade e fonte de proteínas, aminoácidos selecionados, forma química do Fe e duração da alimentação também podem desempenhar um papel na absorção e retenção de Fe desses produtos (KANNAN et al., 2001).

Um outro estudo, avaliou a biodisponibilidade da soja fortificada com FeSO₄ usando ratos com anemia induzida por deficiência de Fe. Observou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas na concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média entre os animais suplementados com soja enriquecida e os grupos ferritina isolada, FeSO₄ isolado e animais saudáveis. Além disso, a soja germinada e fortificada teve uma influência benéfica na recriação das reservas de ferritina no fígado e no soro sanguíneo, e não induziu alterações negativas nos parâmetros gerais de crescimento dos animais, sugerindo que a preparação proposta é uma fonte segura e facilmente disponível de suplementação de Fe (ZIELIŃSKA-DAWIDZIAK et al., 2012).

Avaliando-se os efeitos da farinha de linhaça germinada na qualidade do fêmur durante o desmame de ratos, viu-se que o grupo linhaça germinada apresentou maior força máxima, resistência à ruptura, rigidez e radiodensidade da cabeça do fêmur, menores valores de ácidos graxos poliinsaturados, ácido araquidônico e maior de ácido alfa-linolênico em comparação com o grupo linhaça não germinada. A composição de ácidos graxos da farinha de linhaça, bem como o perfil proteico e o teor de Ca, foram capazes de melhorar a qualidade óssea, podendo estar associada a menores níveis séricos de ácido araquidônico e maior ácido eicosapentaenoico, apresentando perfil anti-inflamatório e maior deposição da matriz orgânica durante o período pós-desmame, podendo resultar na prevenção da osteoporose futura (RIBEIRO et al., 2017).

Estudos realizados com sementes germinadas relacionando-se com a biodisponibilidade de nutrientes e efeitos fisiológicos são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Estudos *in vivo* relacionando a germinação de sementes com a biodisponibilidade de nutrientes e efeitos fisiológicos.

| Ano | Autores | Alimento (espécie) | Composição da dieta | Modelo experimental | Tempo experimental | Resultados |
|------|----------------------------|--------------------------------------|---|-----------------------------|-----------------------------------|---|
| 2001 | Kannan et al. | Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>) | Farinhas marcadas com isótopos de Fe ⁵⁹ e Zn ⁶⁵ | Ratos saudáveis | 24 dias para Fe e 10 dias para Zn | ↑ bioacessibilidade de Fe e Zn ↑ retenção de Zn |
| 2006 | Urbano et al. | Ervilha (<i>Pisum sativum</i>) | 100 % de farinha | Ratos saudáveis | 1 semana | ↑ biodisponibilidade de Zn e Mg |
| 2010 | Roohinejad et al. | Arroz (<i>Oryza sativa</i>) | 50 % de farinha | Ratos hipercolesterolêmicos | 4 semanas | ↓ hipercolesterolemia |
| 2012 | Imam et al. | Arroz (<i>Oryza sativa</i>) | 50 % de farinha | Ratos diabéticos tipo 2 | 4 semanas | Melhora do controle glicêmico |
| 2012 | Zielińska-Dawidziak et al. | Soja (<i>Glycine max</i>) | Farinha fortificada com FeSO ₄ | Ratos anêmicos | 2 semanas | Sem diferenças na concentração de Hb, VCM e HCM em relação aos grupos ferritina, FeSO ₄ e controle |

Ca: cálcio; Fe: Ferro; Zn: zinco; Hb: hemoglobina; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; FeSO₄: sulfato ferroso. ↑: aumento; ↓: redução.

Continua Tabela 6.

| | | | | | | |
|------|----------------|--|----------------------|-----------------------------|------------|---|
| 2013 | Esa et al. | Arroz (<i>Oryza sativa</i>) | 19 % de farinha | Coelhos saudáveis | 10 semanas | ↑ atividade antioxidante e Vitamina E ↓ peroxidação lipídica e do nível de enzimas hepáticas |
| 2014 | Imam et al. | Arroz (<i>Oryza sativa</i>) | 50 % de farinha | Ratos hipercolesterolêmicos | 5 semanas | ↓ do peso corporal Melhora do perfil lipídico ↓ estresse oxidativo ↓ LDL-ox |
| 2017 | Ribeiro et al. | Linhaça (<i>Linum usitatissimum</i>) | 25 e 15 % de farinha | Ratos saudáveis | 7 semanas | ↑ força máxima, resistência à ruptura e rigidez do fêmur |

LDL-ox: lipoproteína de baixa densidade oxidada. ↑: aumento; ↓: redução.

3.4 Perspectivas em estudos clínicos

O percurso da biodisponibilidade é longo e a percentagem do composto que realmente tem um efeito sobre o corpo é difícil de determinar com precisão. Notavelmente, o acesso ao trato digestivo humano é complexo e não permite de forma fácil e precisa determinar a biodisponibilidade de compostos dietéticos. O efeito na saúde depende então do destino metabólico do composto, da quantidade que atinge o alvo fisiológico e do estado fisiológico do indivíduo (FARDET, 2015).

Os estudos pré-clínicos trazem uma confiabilidade sobre os efeitos da germinação na saúde, mas estudos clínicos são necessários para comprovação desses efeitos em humanos. Entretanto, esses tipos de estudos controlados randomizados comparando diretamente as diferenças entre sementes germinadas e não germinadas nos desfechos metabólicos de saúde ainda são escassos, conseqüentemente, no momento atual ainda não é possível tirar conclusões consistentes sobre o impacto do consumo de sementes germinadas na saúde humana e os mecanismos de regulação por trás dele (LEMMENS et al., 2019; NELSON et al., 2013).

Atualmente os estudos clínicos mais importantes nessa área têm sido focados no arroz germinado. No entanto, a maioria desses estudos é de curto prazo e estudos clínicos crônicos ainda são necessários para verificar esses achados sobre os efeitos da germinação (IMAM et al., 2012b).

Alguns desses estudos em humanos observaram que o arroz germinado produziu melhor resposta glicêmica do que o arroz não germinado (ITO et al., 2005; PANLASIGUI & THOMPSON, 2006). O mesmo aconteceu com indivíduos com sobrepeso e obesos que foram expostos a pães, em que foi encontrado um efeito positivo dos pães com sementes germinadas na resposta glicêmica frente aos pães convencionais (MOFIDI et al., 2012). Outros estudos com arroz, também demonstraram redução significativa do colesterol total e triacilgliceróis, e aumento do HDL dos indivíduos após o consumo das sementes germinadas (HSU et al., 2008; WU et al., 2013).

Em contrapartida, um estudo de intervenção com cereais matinais baseados em trigo integral ou em trigo germinado em humanos, mostrou que o nível de LDL foi afetado por ambas as intervenções de maneira semelhante e os níveis de colesterol total e HDL permaneceram inalterados, não apoiando a hipótese de que o trigo

germinado teria um impacto mais forte do que o seu equivalente (NELSON et al., 2016).

Além disso, estudos também apontam os efeitos positivos da germinação na biodisponibilidade de minerais. Indivíduos saudáveis alimentados com mingau de aveia germinada obtiveram um aumento significativo da absorção de Zn e Fe em comparação com o grupo que consumiu o mingau com a aveia não germinada (LARSSON et al., 1996). Fredlund et al. (2003) obtiveram resultados semelhantes para a absorção de Zn com um grupo de indivíduos saudáveis quando lhes deram cereais matinais com cevada germinada e compararam com o grupo sem a cevada germinada.

Apesar de os estudos relacionando a germinação de sementes com a saúde em humanos ainda serem escassos, os poucos trabalhos já realizados mostram um futuro promissor a ser explorado, a fim de se obter conclusões mais concisas sobre o assunto e poder afirmar com maior clareza e segurança os reais efeitos dos alimentos germinados sobre a saúde humana.

3.6 CONCLUSÃO

A germinação pode ser um método eficaz quando se objetiva melhorar o valor nutricional de sementes, sendo capaz de alterar os macronutrientes presentes no grão e propiciar principalmente diminuições nos níveis de fatores antinutricionais, como fitato, tanino e oxalato; e aumento nos valores de minerais, vitaminas, flavonoides, fenólicos, polifenóis, ácido γ -aminobutírico, entre outros compostos bioativos, melhorando a capacidade antioxidante dessas sementes. A germinação também se mostra promissora na melhoria da bioacessibilidade e biodisponibilidade de nutrientes, sendo uma alternativa principalmente para a contribuição na obtenção das necessidades nutricionais de mineiras. A germinação pode ser aplicada aos mais diversos tipos de cereais, pseudocereais e leguminosas a fim de melhorar sua composição fitoquímica e funções biológicas. Com isso, a germinação pode contribuir para a nutrição e saúde humana, como a redução do risco da desnutrição e de doenças crônicas. Mais estudos são necessários para compreender melhor os efeitos de sementes comestíveis germinadas sobre a saúde humana.

3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGHATE, E.; PONERY, A. S. GABA in the endocrine pancreas: Cellular localization and function in normal and diabetic rats. **Tissue and Cell**, v. 34, n. 1, p. 1–6, 2002.

AFIFY, A. E. M. R. et al. Bioavailability of iron, zinc, phytate and phytase activity during soaking and germination of white sorghum varieties. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. 1–8, 2011

AFIFY, A. E. M. R. et al. Protein solubility, digestibility and fractionation after germination of sorghum varieties. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. 1–6, 2012.

AGUILERA, Y. et al. Effect of illumination on the content of melatonin, phenolic compounds, and antioxidant activity during germination of lentils (*Lens culinaris* L.) and kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 44, p. 10736–10743, 2014.

ALVAREZ-JUBETE, L. et al. 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.

AMAROWICZ, R.; DYKES, G. A.; PEGG, R. B. Antibacterial activity of tannin constituents from *Phaseolus vulgaris*, *Fagopyrum esculentum*, *Corylus avellana* and *Juglans nigra*. **Fitoterapia**, v. 79, n. 3, p. 217–219, 2008.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS - **AACC International Board 2008**. Disponível on-line: <http://www.aaccnet.org/initiatives/definitions/Pages/WholeGrain.aspx> (acessado em 11 de junho de 2019).

AZEKE, M. A. et al. The effect of germination on the phytase activity, phytate and total phosphorus contents of some Nigerian-grown grain legumes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 1, p. 75–79, 2011.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, n. 2, p. 93-107, 2004.

BAINS, K.; UPPAL, V.; KAUR, H. Optimization of germination time and heat treatments for enhanced availability of minerals from leguminous sprouts. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 5, p. 1016–1020, 2014.

BAU, H. M.; VILLAUME, C.; MÉJEAN, L. Effects of soybean (*Glycine max*) germination on biologically active components, nutritional values of seeds, and biological characteristics in rats. **Nahrung/Food**, v. 44, n. 1, p. 2–6, 2002.

CHAUDHARY, R. et al. Effect of Germination on Biochemical and Nutritional Quality of Kwati. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 1509–1517, 2015.

CHILOMER, K. et al. The influence of lupin seed germination on the chemical composition and standardized ileal digestibility of protein and amino acids in pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, n. 4, p. 639–646, 2013.

CHITRA, U.; SINGH, U.; RAO, P. V. Phytic acid, *in vitro* protein digestibility, dietary fiber, and minerals of pulses as influenced by processing methods. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 49, n. 4, p. 307–316, 1996.

CINTRA, D. E. C. et al. Lipid profile of rats fed high-fat diets based on flaxseed, peanut, trout, or chicken skin. **Nutrition** (Burbank, Los Angeles County, Calif.), v. 22, n.2, p. 197-205, 2006.

CORNEJO, F. et al. Effects of germination on the nutritive value and bioactive compounds of brown rice breads. **Food Chemistry**, v. 173, p. 298–304, 2015.

CORREIA, I. et al. Comparison of the effects induced by different processing methods on sorghum proteins. **Journal of Cereal Science**, v. 51, n. 1, p. 146–151, 2010.

EGLI, I. et al. The influence of soaking and germination on the phytase activity and phytic acid content of grains and seeds potentially useful for complementary feeding. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 9, p. 3484–3488, 2002.

ERBA, D. et al. Effect of sprouting on nutritional quality of pulses. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 70, n. 1, p. 30–40, 2019.

ESA, N. M. et al. Antioxidant activity of white rice, brown rice and germinated brown rice (in vivo and in vitro) and the effects on lipid peroxidation and liver enzymes in hyperlipidaemic rabbits. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1306–1312, 2013.

FARDET, A. A shift toward a new holistic paradigm will help to preserve and better process grain products' food structure for improving their health effects. **Food & function**, v. 6, n. 2, p. 363-382, 2015.

FERNANDEZ-OROZCO, R. et al. Kinetic study of the antioxidant compounds and antioxidant capacity during germination of *Vigna radiata* cv. emerald, *Glycine max* cv. jutro and *Glycine max* cv. merit. **Food Chemistry**, v. 111, n. 3, p. 622–630, 2008.

FREDLUND, K. et al. Hydrothermal treatment and malting of barley improved zinc absorption but not calcium absorption in humans. **European journal of clinical nutrition**, v. 57, n. 12, p. 1507, 2003.

GAN, R. et al. Bioactive compounds and bioactivities of germinated edible seeds and sprouts: An updated review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 59, p. 1–14, 2017.

GAN, R. et al. Dynamic changes in phytochemical composition and antioxidant capacity in green and black mung bean (*Vigna radiata*) sprouts. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 2090–2098, 2016.

GHANEM, K. Z.; HUSSEIN, L. Calcium bioavailability of selected Egyptian foods with emphasis on the impact of fermentation and germination. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, n. 5, p. 351–356, 1999.

GHARACHORLOO, M.; TARZI, B. G.; BAHARINIA, M. The effect of germination on phenolic compounds and antioxidant activity of pulses. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, n. 3, p. 407–411, 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.

GHUMMAN, A.; KAUR, A.; SINGH, N. Impact of germination on flour, protein and starch characteristics of lentil (*Lens culinaris*) and horsegram (*Macrotyloma uniflorum* L.) lines. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 137–144, 2016.

GÓMEZ-FAVELA, M. A. et al. Improvement of Chia Seeds with Antioxidant Activity, GABA, Essential Amino Acids, and Dietary Fiber by Controlled Germination Bioprocess. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 72, n. 4, p. 345–352, 2017.

GONG, K. et al. Effects of germination combined with extrusion on the nutritional composition, functional properties and polyphenol profile and related in vitro hypoglycemic effect of whole grain corn. **Journal of Cereal Science**, v. 83, n. January, p. 1–8, 2018.

GRAHAM, I. A. Seed storage oil mobilization. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 59, p. 115–142, 2008.

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.

GUO, X. et al. Effect of germination on phytochemical profiles and antioxidant activity of mung bean sprouts (*Vigna radiata*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 44, p. 11050–11055, 2012.

HAHM, T. S.; PARK, S. J.; MARTIN LO, Y. Effects of germination on chemical composition and functional properties of sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 4, p. 1643–1647, 2009.

HAILESLASSIE, H. A.; HENRY, C. J.; TYLER, R. T. Impact of household food processing strategies on antinutrient (phytate, tannin and polyphenol) contents of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and beans (*Phaseolus vulgaris* L.): a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 1947–1957, 2016.

HEJAZI, S. N. et al. Improvement of the in vitro protein digestibility of amaranth grain through optimization of the malting process. **Journal of Cereal Science**, v. 68, p. 59–65, 2016.

HEMALATHA, S.; PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Influence of germination and fermentation on bioaccessibility of zinc and iron from food grains. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, n. 3, p. 342–348, 2007.

HERCHI, W. et al. Effects of germination on chemical composition and antioxidant activity of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil. **Grasas y Aceites**, v. 66, n. 1, p. 057, 2015.

HOODA, S.; JOOD, S. Effect of soaking and germination on nutrient and antinutrient contents of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.). **Journal of Food Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 165–176, 2003.

HSU, T. et al. Effects of pre-germinated brown rice on blood glucose and lipid levels in free-living patients with impaired fasting glucose or type 2 diabetes. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 54, n. 2, p. 163-168, 2008.

HUANG, G.; CAI, W.; XU, B. Improvement in beta-carotene, vitamin B2, GABA, free amino acids and isoflavones in yellow and black soybeans upon germination. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 488–496, 2017.

HUANG, X.; CAI, W.; XU, B. Kinetic changes of nutrients and antioxidant capacities of germinated soybean (*glycine max* l.) and mung bean (*vigna radiata* l.) with germination time. **Food Chemistry**, v. 143, p. 268–276, 2014.

HÜBNER, F.; ARENDT, E. K. Germination of Cereal Grains as a Way to Improve the Nutritional Value: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 8, p. 853–861, 2013.

HUNG, P. et al. 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.

IMAM, M. U. et al. Antidiabetic properties of germinated brown rice: a systematic review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012a.

IMAM, M. U. et al. Effects of white rice, brown rice and germinated brown rice on antioxidant status of type 2 diabetic rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 10, p. 12952–12969, 2012b.

IMAM, M. U. et al. Germinated brown rice regulates hepatic cholesterol metabolism and cardiovascular disease risk in hypercholesterolaemic rats. **Journal of Functional Foods**, v. 8, n. 1, p. 193–203, 2014.

ITO, Y. et al. Postprandial blood glucose and insulin responses to pre-germinated brown rice in healthy subjects. **The Journal of Medical Investigation**, v. 52, n. 3, 4, p. 159-164, 2005.

JAN, R.; SAXENA, D. C.; SINGH, S. Physico-chemical, textural, sensory and antioxidant characteristics of gluten - Free cookies made from raw and germinated *Chenopodium* (*Chenopodium album*) flour. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 281–287, 2016.

JUDPRASONG, K. et al. Total and soluble oxalate contents in Thai vegetables, cereal grains and legume seeds and their changes after cooking. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 4, p. 340–347, 2006.

JUN, Y. et al. Study of chemical constituents and antioxidant activities of flaxseed before and after germination. **Journal of Chinese Mass Spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 112-119, 2018.

KAJLA, P. S.; SHARMA, A.; SOOD, D. R. Effect of germination on proximate principles, minerals and antinutrients of flaxseeds. **Asian Journal of Dairy and Food Research**, v. 36, n. 01, p. 52–57, 2017.

KANMAZ, E. Ö.; OVA, G. The effect of germination time on moisture, total fat content and fatty acid composition of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) Sprouts. **GIDA/The Journal of Food**, v. 40, n. 5, p. 249-254, 2015a.

KANMAZ, E. Ö.; OVA, G. The effect of germination time on SDG lignan, total phenolic and flavonoid contents of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) Sprouts. **GIDA/The Journal of Food**, v. 40, n. 5, p. 255-262, 2015b.

KANNAN, S. et al. Iron and zinc bioavailability in rats fed intrinsically labeled bean and bean - rice infant weaning food products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 5063–5069, 2001.

KAUP, S. M. et al. Calcium and magnesium utilization in rats: effect of dietary butterfat and calcium and of age. **Journal of Nutrition**, v. 120, n. 3, p. 266–273, 1990.

KAUR, A.; KAUR, R.; BHISE, S.. Baking and sensory quality of germinated and ungerminated flaxseed muffins prepared from wheat flour and wheat atta. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, 2018.

KHANG, D. et al. Phenolic Profiles and Antioxidant Activity of Germinated Legumes. **Foods**, v. 5, n. 4, p. 27, 2016.

KHATTAK, A. B. et al. Influence of germination techniques on phytic acid and polyphenols content of chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1074–1079, 2007.

KIM, H. Y. et al. Chemical and functional components in different parts of rough rice (*Oryza sativa* L.) before and after germination. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 288–293, 2012.

KIM, I. S.; HAN, S. H.; HAN, K. W. Study on the chemical change of amino acid and vitamin of rapeseed during germination. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, 1997.

KOEHLER, P. et al. 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.

KUMAR, K. G. et al. Cooking characteristics of some germinated legumes: changes in phytins, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ and pectins. **Journal of Food Science**, v. 43, n. 1, p. 85–88, 1978.

KUMAR, V. et al. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. **Food chemistry**, v. 120, n. 4, p. 945-959, 2010.

LARSSON, M. et al. Improved zinc and iron absorption from breakfast meals containing malted oats with reduced phytate content. **British Journal of Nutrition**, v. 76, n. 5, p. 677-688, 1996.

LEMMENS, E. et al. Impact of Cereal Seed Sprouting on Its Nutritional and Technological Properties: A Critical Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 1, p. 305-328, 2019.

LEMMENS, E. et al. The impact of steeping, germination and hydrothermal processing of wheat (*Triticum aestivum* L.) grains on phytate hydrolysis and the distribution, speciation and bio-accessibility of iron and zinc elements. **Food Chemistry**, v. 264, n. 4, p. 367–376, 2018.

LESTIENNE, I. et al. Iron and Zinc in Vitro Availability in Pearl Millet Flours (*Pennisetum glaucum*) with Varying Phytate, Tannin, and Fiber Contents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 3240–3247, 2007.

LI, X. et al. Effects of germination on tocopherol, secoisolarciresinol diglucoside, cyanogenic glycosides and antioxidant activities in flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). **International Journal of Food Science and Technology**, p. 1–9, 2019.

LIANG, J. et al. Effects of soaking, germination and fermentation on phytic acid, total and in vitro soluble zinc in brown rice. **Food Chemistry**, v. 110, n. 4, p. 821–828, 2008.

LIU, J.; GUO, W. Q.; SHI, D. C. Seed germination, seedling survival, and physiological response of sunflowers under saline and alkaline conditions. **Photosynthetica**, v. 48, n. 2, p. 278–286, 2010.

LUO, Y. et al. Seed germination test for toxicity evaluation of compost: Its roles, problems and prospects. **Waste Management**, v. 71, p. 109–114, 2018.

MACHADO, A. M. et al. Effects of brown and golden flaxseed on the lipid profile, glycemia, inflammatory biomarkers, blood pressure and body composition in overweight adolescents. **Nutrition**, v. 31, p. 90-96, 2014.

MAETENS, E. et al. Physicochemical and nutritional properties of a healthy snack chip developed from germinated soybeans. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 505–510, 2017.

MAMIRO, P. S. et al. Processed Complementary Food Does Not Improve Growth or Hemoglobin Status of Rural Tanzanian Infants from 6–12 Months of Age in Kilosa District, Tanzania. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 5, p. 1084–1090, 2004.

MARTINEZ-VILLALUENGA, C. et al. Time dependence of bioactive compounds and antioxidant capacity during germination of different cultivars of broccoli and radish seeds. **Food Chemistry**, v. 120, n. 3, p. 710–716, 2010.

MARTÍN-CABREJAS, M. A. et al. Effect of germination on the carbohydrate composition of the dietary fiber of peas (*Pisum sativum* L.). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 5, p. 1254-1259, 2003.

MARTÍN-CABREJAS, M. A. et al. Influence of germination on the soluble carbohydrates and dietary fibre fractions in non-conventional legumes. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 1045-1052, 2008.

MBITHI-MWIKYA, S. et al. Nutrient and Antinutrient Changes in Finger Millet (*Eleusine coracana*) During Sprouting. **LWT - Food Science and Technology**, v. 33, n. 1, p. 9–14, 2000.

MEGAT, R. M. R.; AZRINA, A.; NORHAIZAN, M. E. Effect of germination on total dietary fibre and total sugar in selected legumes. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 1, p. 257–261, 2016.

MOFIDI, A. et al. The acute impact of ingestion of sourdough and whole-grain breads on blood glucose, insulin, and incretins in overweight and obese men. **Journal of nutrition and metabolism**, 2012.

MOONGNGARM, A.; SAETUNG, N. Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 782–788, 2010.

MUBARAK, A. E. Nutritional composition and antinutritional factors of mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes. **Food Chemistry**, v. 89, n. 4, p. 489–495, 2005.

NELSON, K. et al. Effects of malted and non-malted whole-grain wheat on metabolic and inflammatory biomarkers in overweight/obese adults: a randomized crossover pilot study. **Food chemistry**, v. 194, p. 495-502, 2016.

NELSON, K. et al. Germinated grains: a superior whole grain functional food?. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 91, n. 6, p. 429-441, 2013.

NESTARES, T. et al. Effect of different soaking solutions on nutritive utilization of minerals (calcium, phosphorus, and magnesium) from cooked beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in growing rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 2, p. 515–520, 2003.

NIRMALA, M.; SUBBA RAO, M. V. S. S. T.; MURALIKRISHNA, G. Carbohydrates and their degrading enzymes from native and malted finger millet (*Ragi*, *Eleusine coracana*, Indaf-15). **Food Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 175–180, 2000.

NONOGAKI, H. Seed dormancy and germination emerging mechanisms and new hypotheses. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. May, p. 1–14, 2014.

OLIVEIRA, S. C.; FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 3, p. 401–406, 2005.

PAJAK, P. et al. Antioxidant properties, phenolic and mineral composition of germinated chia, golden flax, evening primrose, phacelia and fenugreek. **Food Chemistry**, v. 275, n. September 2018, p. 69–76, 2019.

PAJAK, P. et al. Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. **Food Chemistry**, v. 143, p. 300–306, 2014.

PANLASIGUI, L. N.; THOMPSON, Lilian U. Blood glucose lowering effects of brown rice in normal and diabetic subjects. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 57, n. 3-4, p. 151-158, 2006.

PARADA, J.; AGUILERA, J. M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **Journal of food science**, v. 72, n. 2, p. 21-32, 2007.

PLATEL, K.; EIPESON, S. W.; SRINIVASAN, K. Bioaccessible mineral content of malted finger millet (*Eleusine coracana*), wheat (*Triticum aestivum*), and barley (*Hordeum vulgare*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 13, p. 8100–8103, 2010.

PLAZA, L.; DE ANCOS, B.; CANO, M. P. 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.

PRODANOV, M.; SIERRA, I.; VIDAL-VALVERDE, C. Effect of germination on the thiamine, riboflavin and niacin contents in legumes. **Zeitschrift for Lebensmitteluntersuchung und Forschung A**, v. 205, n. 1, p. 48–52, 1997.

PYNAERT, I. et al. Iron solubility compared with in vitro digestion–Caco-2 cell culture method for the assessment of iron bioavailability in a processed and unprocessed complementary food for Tanzanian infants (6–12 months). **British Journal of Nutrition**, v. 95, n. 04, p. 721, 2006.

RAES, K. et al. Role of processing on bioaccessibility of minerals: Influence of localization of minerals and anti-nutritional factors in the plant. **Trends in Food Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 32–41, 2014.

RAHMA, E. H. et al. Effect of soaking process on nutritional quality and protein solubility of some legume seeds. **Food/Nahrung**, v. 44, n. 5, p. 339-343, 2015.

RIBEIRO, D. C. et al. Incorporation of Flaxseed Flour as a Dietary Source for ALA Increases Bone Density and Strength in Post-Partum Female Rats. **Lipids**, v. 52, n. 4, p. 327–333, 2017.

ROOHINEJAD, S. et al. Effect of pre-germination time of brown rice on serum cholesterol levels of hypercholesterolaemic rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 2, p. 245–251, 2010.

ROSENTAL, L.; NONOGAKI, H.; FAIT, A. Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. **Seed Science Research**, v. 24, n. 1, p. 1–15, 2014.

RUMIYATI; JAYASENA, V.; JAMES, A. P. Total Phenolic and Phytosterol Compounds and the Radical Scavenging Activity of Germinated Australian Sweet Lupin Flour. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 68, n. 4, p. 352–357, 2013.

SHARMA, S.; SAXENA, D. C.; RIAR, C. S. Analysing the effect of germination on phenolics, dietary fibres, minerals and γ -amino butyric acid contents of barnyard millet (*Echinochloa frumentaceae*). **Food Bioscience**, v. 13, p. 60–68, 2016.

SHELP, B. J. et al. Hypothesis/review: Contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. **Plant Science**, v. 193–194, p. 130–135, 2012.

SHIMELIS, E. A.; RAKSHIT, S. K. Effect of processing on antinutrients and in vitro protein digestibility of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in East Africa. **Food Chemistry**, v. 103, n. 1, p. 161–172, 2007.

SHU, K. et al. Two Faces of One Seed: Hormonal Regulation of Dormancy and Germination. **Molecular Plant**, v. 9, n. 1, p. 34–45, 2016.

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**, v. 97, n. 13, p. 4643–4651, 2017.

SIERRA, I.; VIDAL-VALVERDE, C. Kinetics of free and glycosylated B6 vitamers, thiamin and riboflavin during germination of pea seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 2, p. 307–310, 1999.

SINGH, A.; SHARMA, S.; SINGH, B.. Effect of germination time and temperature on the functionality and protein solubility of sorghum flour. **Journal of Cereal Science**, v. 76, p. 131–139, 2017.

SLATTERY, M. L. Defining dietary consumption: is the sum greater than its parts?. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 88 , p. 14 -15, 2008.

SUMA, P. F.; UROOJ, A. Influence of germination on bioaccessible iron and calcium in pearl millet (*Pennisetum typhoideum*). **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 5, p. 976–981, 2014.

SUNG, H. G. et al. Effect of germination temperature on characteristics of phytase production from barley. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 11, p. 1297–1303, 2005.

SWIECA, 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.

TATALA, S. et al. Effect of germination of finger millet on nutritional value of foods and effect of food supplement on nutrition and anaemia status in Tanzania children. **Tanzania Journal of Health Research**, v. 9, n. 2, p. 77-86, 2007.

TBCA - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. **Universidade de São Paulo (USP)**. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tbca>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2018.

TIAN, B. et al. Physicochemical changes of oat seeds during germination. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1195–1200, 2010.

TIAN, S.; NAKAMURA, K.; KAYAHARA, H. Analysis of phenolic compounds in white rice, brown rice, and germinated brown rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4808–4813, 2004.

TOMMASI, F. et al. A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 361, p. 1647–1654, 2001.

TRAORÉ, T. et al. Changes in nutrient composition, phytate and cyanide contents and α -amylase activity during cereal malting in small production units in Ouagadougou (Burkina Faso). **Food Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 105–114, 2004.

URBANO, G. et al. Evaluation of zinc and magnesium bioavailability from pea (*Pisum sativum*, L.) sprouts. Effect of illumination and different germination periods. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 618–626, 2006.

VILLENEUVE, S. et al. Effect of a Short-Time Germination Process on the Nutrient Composition, Microbial Counts and Bread-Making Potential of Whole Flaxseed. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 1574–1586, 2015.

WANG, F. et al. Isoflavone, γ -aminobutyric acid contents and antioxidant activities are significantly increased during germination of three Chinese soybean cultivars. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 596–604, 2015.

WANG, H. et al. Effect of germination on lignan biosynthesis, and antioxidant and antiproliferative activities in flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). **Food Chemistry**, v. 205, p. 170–177, 2016.

WANG, H. et al. Effect of germination on vitamin C, phenolic compounds and antioxidant activity in flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 12, p. 2545–2553, 2015a.

WANG, L. et al. The dynamic changes of ascorbic acid, tocopherols and antioxidant activity during germination of soya bean (*Glycine max*). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 11, p. 2367–2374, 2015b.

WANG, X. et al. Effect of germination and incubation on Zn, Fe, and Ca bioavailability values of soybeans (*Glycine max* L.) and mung beans (*Vigna radiate* L.). **Food Science and Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 1829–1835, 2015c.

WANG, Z. et al. Quantitative trait loci analysis for rice seed vigor during the germination stage. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 11, n. 12, p. 958–964, 2010.

WEI, Y. et al. Effect of ferrous sulfate fortification in germinated brown rice on seed iron concentration and bioavailability. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 1952–1958, 2013.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. **Plant Physiology**, v. 126, n. 2, p. 485–493, 2001.

WU, F. et al. Germinated brown rice and its role in human health. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 53, n. 5, p. 451-463, 2013.

XU, J. G. et al. Dynamic changes in γ -aminobutyric acid and glutamate decarboxylase activity in oats (*Avena nuda* L.) during steeping and germination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 17, p. 9759–9763, 2010.

XU, J. G.; HU, Q. P. Changes in γ -aminobutyric acid content and related enzyme activities in Jindou 25 soybean (*Glycine max* L.) seeds during germination. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 341–346, 2014.

XU, L. et al. Impact of germination on nutritional and physicochemical properties of adlay seed (*Coixlachryma-jobi* L.). **Food Chemistry**, v. 229, p. 312–318, 2017.

XU, M. J.; DONG, J. F.; ZHU, M. Y.. Effects of germination conditions on ascorbic acid level and yield of soybean sprouts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 6, p. 943–947, 2005.

YANG, R.; CHEN, H.; GU, Z. Factors influencing diamine oxidase activity and γ -aminobutyric acid content of fava bean (*Vicia faba* L.) during germination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 21, p. 11616–11620, 2011.

YIMING, Z. et al. Evolution of nutrient ingredients in tartary buckwheat seeds during germination. **Food Chemistry**, v. 186, p. 244–248, 2015.

ZHANG, G. et al. Effects of germination on the nutritional properties, phenolic profiles, and antioxidant activities of buckwheat. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 5, p. 1111–1119, 2015.

ZIELINSKA-DAWIDZIAK, M. et al. Study on iron availability from prepared soybean sprouts using an iron-deficient rat model. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2622–2627, 2012.

ZILIC, S. et al. 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 and Technology**, v. 49, n. 4, p. 1040–1047, 2014.

4. ARTIGO ORIGINAL

Composição nutricional, qualidade proteica, bioacessibilidade e biodisponibilidade de cálcio de linhaças germinadas marrom e dourada (*Linum usitatissimum* L.)

RESUMO

A germinação de sementes promove alterações na sua composição, proporcionando potenciais benefícios nutritivos e de saúde em comparação com as sementes não germinadas. Verificou-se a influência da germinação nas características físico-químicas, na qualidade proteica e na bioacessibilidade e biodisponibilidade de cálcio das linhaças marrom e dourada (*Linum usitatissimum* L.). A germinação foi realizada por 48 horas e foram analisadas a composição centesimal, determinação de cálcio, oxalato, fitato e tanino das linhaças. No estudo *in vitro*, foi avaliado a bioacessibilidade do cálcio. Para o estudo *in vivo* de biodisponibilidade de cálcio, foram utilizados 40 ratos machos Wistar divididos em cinco grupos durante seis semanas, sendo realizado balanço de cálcio para avaliação da biodisponibilidade. Foram coletadas amostras de sangue para análises bioquímicas e fêmures para análise de cálcio. Para o estudo *in vivo* de qualidade proteica, foram utilizados 48 ratos machos Wistar divididos em seis grupos durante duas semanas, sendo realizado balanço nitrogenado para avaliação da qualidade proteica. Para as análises estatísticas, foi empregado a Análise de Variância (ANOVA) “two-way” para os dados de caracterização físico-química, fatores antinutricionais e estudo *in vitro* de bioacessibilidade de cálcio, sendo que em casos de interação aplicou-se o teste de Tukey. Os estudos *in vivo* foram analisados por meio da ANOVA “one-way”, acompanhada pelo teste de Tukey. Os resultados foram apresentados em média \pm desvio padrão ($p \leq 0,05$). A germinação proporcionou aumento no teor de lipídios e de proteínas e, redução no teor de carboidratos das linhaças. A concentração de cálcio foi maior na variedade dourada. O teor de tanino não diferenciou entre os grupos, enquanto os teores de fitato e oxalato apresentaram redução após a germinação. No estudo *in vitro*, a germinação aumentou a bioacessibilidade de cálcio. Em relação ao estudo *in vivo*, a germinação não influenciou no balanço de cálcio. Não foram observadas diferenças estatísticas nas concentrações de cálcio, fósforo, creatinina e fosfatase alcalina plasmática. Ainda, não

foram observadas alterações na morfologia e no conteúdo de cálcio dos fêmures dos animais. Os valores do Coeficiente de Eficiência Proteica (PER) não apresentaram diferença entre os grupos. O Quociente de Eficiência Líquida da Proteína (NPR) e o PER e NPR relativos foram maiores para as linhaças germinadas, ao passo que para a Digestibilidade Verdadeira (DV), apenas a linhaça marrom melhorou a digestibilidade após a germinação. O uso da linhaça germinada, independente da variedade, pode contribuir para aumentar o valor nutricional da dieta.

Palavras-chave: linhaça, germinação, qualidade proteica, metabolismo de cálcio, bioacessibilidade, biodisponibilidade.

4.1 INTRODUÇÃO

A germinação é um fenômeno biológico que pode ser considerado como a retomada do crescimento do embrião. Ocorre mediante condições apropriadas, em que o eixo embrionário retoma o desenvolvimento que tinha sido interrompido por ocasião da maturação fisiológica, com o subsequente rompimento do tegumento pela radícula (KANMAZ & OVA, 2015). A germinação de sementes envolve uma drástica intensificação de processos metabólicos que, dentre outras ações, atuam sobre os nutrientes armazenados nas sementes. Durante a germinação, os compostos armazenados são hidrolisados e transportados para os tecidos meristemáticos do embrião que gradualmente se desenvolve em uma plântula (IBRAHIM, 2016). O processo germinativo consiste basicamente em três etapas: embebição, processos bioquímicos (atividade enzimática, respiração celular e síntese de proteínas) e emersão da radícula. Os tempos de germinação variam em cada alimento e de acordo com o uso previsto. Em geral, as sementes ficam aproximadamente por no mínimo 24 horas sob o processo de germinação para que possa começar a surgir alguma alteração na composição do alimento, sendo fundamental uma temperatura adequada e o fornecimento de água para que a plântula se desenvolva de forma desejável (LINKIES et al., 2010).

A germinação confere modificações nas dimensões das sementes, no teor de umidade e no conteúdo de matéria seca. O processo germinativo promove a mobilização de reservas nutricionais nas primeiras etapas de crescimento das

sementes. As proteínas convertem-se em aminoácidos, os carboidratos em açúcares simples, os lipídios em ácidos graxos, sintetizam-se vitaminas e enzimas e há mobilização de minerais. Esta conversão favorece a bioacessibilidade, a biodisponibilidade e a digestibilidade dos nutrientes no organismo. Além disso, há redução nos teores antinutricionais, como inibidores de proteases e tripsina, fitato, oxalato e tanino (GAN et al., 2017). Porém, os efeitos da germinação sobre a composição química, aspectos nutricionais e características sensoriais, variam com as espécies, cultivares vegetais e as condições de germinação das sementes (KUMAR; VERMA; SINGH, 2011).

A semente do linho, denominada de linhaça, é um cereal do grupo das oleaginosas, que se caracteriza por ser achatada e oval com uma extremidade pontiaguda, as duas variedades mais conhecidas são a marrom e a dourada. A marrom é a mais cultivada mundialmente, serve de matéria prima para as indústrias, alimentação animal e humana. A dourada é uma variedade que cresce melhor em clima frio, devido a maior sensibilidade a ataques de pragas e fungos, e sua produção é menor (TREVINO et al., 2000). Elas se diferem uma da outra em vários aspectos, principalmente nutricionais e no sabor, mas em sua composição básica apresentam 35% de lipídios, 20% de proteínas, 40% de carboidratos, sendo destes cerca de 30% na forma de fibras, vitaminas A, do complexo B, D, E e K, e minerais, como cálcio (Ca), fósforo e zinco. Esses teores podem variar de acordo com a variedade, o meio ambiente, o processamento da semente e métodos de análise (COŞKUNER & KARABABA, 2007). Atualmente, há um crescente incentivo na inclusão de linhaça na dieta devido aos seus potenciais benefícios à saúde, sendo considerada um alimento funcional (OOMAH; DER; GODFREY, 2006), especificamente pela ação anticarcinogênica e antiaterogênica, conferidos pela presença de grande quantidade de fibras, lignanas e ácido graxo α -linolênico (ω -3) (CHUNG; LEI; LI-CHAN, 2005; KRIS-ETHERTON et al., 2002; LUCAS et al., 2004).

Grande ênfase vem sendo dada à investigação de sementes germinadas, determinando tanto a bioacessibilidade e biodisponibilidade de minerais e vitaminas, quanto a qualidade proteica desses alimentos, identificando os fatores que podem interferir na absorção desses nutrientes. A linhaça é um alimento vegetal com alta concentração de Ca e proteínas, e desse modo, o processo de germinação da linhaça tanto dourada quanto marrom, pode ser considerado uma alternativa simples e de

baixo custo para aumentar a bioacessibilidade e biodisponibilidade do Ca e a sua qualidade proteica, melhorando a sua composição nutricional e incentivando a inclusão da semente germinada na dieta como um substituto da linhaça não germinada. Sendo assim, objetivou-se verificar a influência da germinação nas características físico-químicas, na qualidade proteica, na bioacessibilidade e biodisponibilidade de Ca das linhaças dourada e marrom.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Matéria prima

As linhaças (*Linum usitatissimum* L.) marrom e dourada (Nayna®) foram adquiridas do comércio local do município de Alegre – Espírito Santo – Brasil.

4.2.2 Germinação das linhaças

A germinação foi realizada de acordo com as metodologias de Villeneuve et al. (2015) e Kajla, Sharma e Sood (2017), com algumas modificações. Brevemente, as linhaças foram dispostas (100 g) em bandejas de polietileno (7 x 42 x 27 cm), previamente desmineralizadas com ácido nítrico 50% durante 3 horas e esterilizadas com ácido peracético 20% para controle microbiológico. As bandejas contendo as linhaças foram cobertas com um pano de algodão também esterilizado, e umedecido em água ultrapura, para evitar perda de umidade, sendo mantidas em uma sala ao abrigo de luz e com temperatura ambiente de 26 ± 2 °C, durante 48 horas. As sementes foram umedecidas 2 vezes ao dia (no período da manhã e no final da tarde) utilizando um borrifador com água ultrapura (50 mL / 100 g de linhaça).

4.2.3 Obtenção das farinhas

As linhaças germinadas foram submetidas a secagem em estufa (BIOPAR®) a 50 ± 5 °C até peso constante. Após esse procedimento, as linhaças secas germinadas e as linhaças não germinadas foram trituradas em um liquidificador doméstico (PHILIPS WALITA®), peneiradas para obtenção de uma farinha fina (30 mesh) e posteriormente, acondicionadas em embalagens laminadas e mantidas em BOD (CLIMATEC®) à 5 ± 2 °C até a sua utilização.

4.2.4 Caracterização físico-química das farinhas

4.2.4.1 Composição centesimal

O teor de nitrogênio foi quantificado pelo método de Kjeldahl, utilizando-se um destilador de nitrogênio (TECNAL®, modelo TE-036 / 1) e o teor de proteínas foi calculado multiplicando-se o resultado encontrado de nitrogênio pelo fator 6,25. O teor de lipídios foi determinado por extração em Soxhlet, utilizando-se um extrator de lipídios (QUIMIB®, modelo Q308G26) e éter de petróleo como solvente extrator. O teor de umidade foi determinado em estufa (BIOPAR®) a 105 °C até peso constante. O teor de cinzas foi realizado por meio da incineração em mufla (STECNO®) a 550 °C, por 6 horas (AOAC, 2005). O teor de carboidratos foi calculado por diferença, subtraindo-se a soma dos teores de proteínas, lipídios, umidade e cinzas de 100.

4.2.4.2 Determinação de cálcio

O teor de Ca das amostras foi determinado de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (2005). Brevemente, foram pesados 0,5 gramas de amostra e adicionados 10 mL de ácido nítrico, sendo realizada uma pré-digestão por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram digeridas em micro-ondas (CEM CORPORATION®, modelo MARS 6), envolvendo três passos: 1: rampa de temperatura de 25 minutos até 210 °C; 2: manutenção da temperatura por 15 minutos a 210 °C e 3: descida de 15 minutos até temperatura ambiente.

Após a digestão, foram transferidas para balão volumétrico e o volume completado com água ultrapura. Em seguida, as amostras foram diluídas com cloreto de estrôncio e o volume completado com água ultrapura. As amostras foram lidas em espectrofotômetro de absorção atômica de chama (THERMO SCIENTIFIC®, modelo ICE 3000 Series).

4.2.5 Fatores antinutricionais

4.2.5.1 Determinação de tanino

O teor de tanino foi realizado de acordo com a metodologia de Price, Scoyoc e Butler (1978) por meio de extração com metanol, posterior reação colorimétrica com solução de vanilina e leitura a 500 nm por espectrofotometria em aparelho ELISA

(THERMO SCIENTIFIC MULTISKAN GO®). A concentração de tanino foi obtida a partir de uma curva padrão de catequina, onde os resultados foram expressos em miligrama de Equivalente de Catequina / grama de amostra (EC / g).

4.2.5.2 Determinação de fitato

O teor de ácido fítico foi analisado segundo a metodologia descrita por Latta e Eskin (1980). Foi realizada extração prévia com HCl e posterior passagem em coluna de troca iônica com fase estacionária constituída por resina 1-X4 100-200 Mesh (BIO-RAD AG®). A coluna foi pré-condicionada com NaCl 2 M e o extrato obtido aplicado cuidadosamente à mesma. Os fósforos inorgânicos foram eluídos com NaCl 0,05 M, seguida da eluição do fitato retido com NaCl 2 M. O fitato foi determinado colorimetricamente por espectrofotometria em aparelho ELISA (THERMO SCIENTIFIC MULTISKAN GO®) a 500 nm.

4.2.5.3 Determinação de oxalato

O teor de ácido oxálico foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Iwuoha e Kalu (1995) com modificações. Brevemente, foram utilizados 0,25 g de amostra e adicionados 1 mL de HCl 6 M e diluído em água ultrapura para a digestão. As amostras foram aquecidas a 100 °C por 1 hora e em seguida, resfriadas à temperatura ambiente e filtradas. Para obter o precipitado de oxalato de Ca, foram adicionados vermelho de metila e NH₄OH concentrado ao filtrado, até obter pH de 4,5 com o auxílio de um pHmetro (KASVI®). Após, as amostras foram aquecidas a 90 °C por 2 minutos, resfriadas e filtradas novamente. O segundo filtrado foi aquecido novamente a 90 °C, sendo adicionado CaCl₂ a 5% e deixando precipitar por 24 horas. Após 24 horas, as amostras foram centrifugadas (THERMO SCIENTIFIC®, modelo Heraeus Megafuge 16R) e filtradas novamente, sendo que o precipitado no papel-filtro foi dissolvido com H₂SO₄ a 20%. Em seguida, o filtrado foi recolhido e acrescentada água destilada. No processo de titulação, as amostras foram aquecidas a 70 °C e tituladas com solução de KMnO₄ 0,1 N previamente padronizada. O porcentual de ácido oxálico foi obtido por meio da Equação 1.

Equação 1. Cálculo do percentual de ácido oxálico

$$\% \text{ ácido oxálico} = \frac{V \text{ KMnO}_4 \times N \text{ KMnO}_4 \times 0,04502}{\text{peso da amostra (g)}} \times 100$$

Em que:

V = volume de KMnO₄ gasto na titulação (mL)

N = normalidade da solução de KMnO₄

0,04502 = massa miliequivalente de ácido oxálico (H₂C₂O₄)

4.2.6 Estudo *in vitro* da bioacessibilidade de cálcio

As farinhas de linhaça dourada e marrom germinadas e não germinadas foram submetidas a um processo de digestão gastrointestinal *in vitro* simulado por enzimas adaptado de Vaz-Tostes et al. (2015) e Glahn et al. (1998). Foi realizada a digestão gástrica, na qual 1,0 g de amostra foi misturada a 19,0 mL de água ultrapura, sendo o pH ajustado para 2,0. A pepsina foi adicionada a uma concentração final de 0,0110 g (1 g de enzima:20 g de proteínas da amostra). Em seguida, as amostras foram incubadas a 37 °C em banho maria sob agitação a 110 rpm durante um período de 2 horas em agitador magnético com aquecimento (KASVI®). Após, o pH foi ajustado para 7,0 e adicionada a enzima pancreatina (1 g de enzima:20 g de proteínas da amostra) e sais biliares (0,3 g de sais:0,05 g de enzima). As amostras foram novamente incubadas a 37 °C e agitadas a 110 rpm durante 2 horas. Ao final do processo digestivo, as enzimas foram inativadas, por meio de tratamento térmico em banho maria a 75 °C durante 20 minutos. Após, as amostras foram resfriadas e centrifugadas (THERMO SCIENTIFIC®, modelo Heraeus Megafuge 16R) a 5.500 rpm e 4 °C, durante 20 minutos, para ocorrer a separação da fração bioacessível e residual. A análise do Ca das frações foram realizadas como descrita anteriormente (item 4.2.4.2). A partir dos valores obtidos, foi calculado a porcentagem de recuperação das amostras (fração bioacessível + fração residual).

4.2.7 Estudo *in vivo* da biodisponibilidade de cálcio

Foram utilizados 40 ratos machos *Wistar*, recém desmamados, com peso médio de 50 gramas, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde - UFES. Os animais foram mantidos em aclimatação por 5 dias. Após, foram distribuídos em cinco grupos (n = 8 animais por grupo), a saber: Controle (CT),

Linhaça Dourada (LD), Linhaça Dourada Germinada (LDG), Linhaça Marrom (LM) e Linhaça Marrom Germinada (LMG). O tempo experimental total foi de 6 semanas. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com ambiente controlado, sendo fotoperíodo de 12 horas e temperatura média de 23 ± 2 °C. Os animais receberam água ultrapura e ração *ad libitum*. O peso e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente. Foram calculados o Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) e o Coeficiente de Eficiência Calórica (CEC), que representam a relação entre o ganho de peso total (g) com o consumo de dieta total (g) e com o consumo calórico total (kcal) ingerido pelos animais, respectivamente.

Ao final do tempo experimental os animais foram anestesiados utilizando Xilazina (15 mg / kg) e Cetamina (60 mg / kg), administrados por via intraperitoneal. Após, o sangue foi coletado por punção cardíaca, centrifugado (THERMO SCIENTIFIC®, modelo Heraeus Megafuge 16R) a 3.000 g por 10 minutos a 4 °C para obtenção do soro e armazenado no freezer (THERMO SCIENTIFIC®, modelo 8924) à -80 °C.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Campus de Alegre – CEUA - ALEGRE, da Universidade Federal do Espírito Santo, protocolo número 013 / 2018 (Anexo A).

4.2.7.1 Dietas experimentais

As dietas experimentais (Tabela 1) foram elaboradas com base na composição da dieta AIN-93G (REEVES, 1997). As dietas forneceram 50% (250 mg) das necessidades diárias de Ca dos animais e o conteúdo de linhaça nas dietas foi de 10%. Após o preparo, as dietas foram acondicionadas em embalagens laminadas, rotuladas e armazenadas em BOD (CLIMATEC®) à 5 ± 2 °C.

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais de biodisponibilidade de cálcio (g / 100 g)

| Ingredientes (g / 100 g) | CT | LD | LDG | LM | LMG |
|---|-----------|-----------|------------|-----------|------------|
| Linhaça Dourada | --- | 10.0 | --- | --- | --- |
| Linhaça Dourada Germinada | --- | --- | 10.0 | --- | --- |
| Linhaça Marrom | --- | --- | --- | 10.0 | --- |
| Linhaça Marrom Germinada | --- | --- | --- | --- | 10.0 |
| Albumina ¹ (DIM®) | 25.74 | 23.68 | 23.54 | 23.75 | 23.56 |
| Amido Dextrinizado (PRAG Soluções) | 13.2 | 13.2 | 13.2 | 13.2 | 13.2 |
| Sacarose (UNIÃO®) | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 |
| Óleo de Soja ² (SOYA®) | 7.0 | 3.75 | 3.25 | 3.69 | 3.28 |
| Fibras ³ * (PRAG Soluções) | 5.0 | 2.15 | 2.15 | 2.22 | 2.22 |
| Mix de Minerais sem Ca (PRAG Soluções) | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| Carbonato de Ca (CaCO ₃) ⁴ (PRAG Soluções) | 0.62 | 0.57 | 0.56 | 0.57 | 0.58 |
| Mix de Vitaminas (PRAG Soluções) | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| L-cistina (ISO FAR®) | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| Bitartarato de Colina (SIGMA®) | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| Amido de Milho ⁵ (ANCHIETA®) | 34.0 | 31.60 | 32.25 | 31.52 | 32.11 |
| Valor energético total (kcal) | 392.3 | 397.2 | 394.7 | 396.6 | 394.5 |

CT: Controle, LD: Linhaça Dourada, LDG: Linhaça Dourada Germinada, LM: Linhaça Marrom, LMG: Linhaça Marrom Germinada.

¹ quantidade ajustada de acordo com a composição da linhaça para fornecer 20% de proteínas. Albumina: 77,7g de PTN / 100g.

² quantidade ajustada de acordo com a composição da linhaça para fornecer 7% de lipídios.

³ quantidade ajustada de acordo com a composição da linhaça para fornecer 5% de fibras.

⁴ quantidade ajustada de acordo com a composição da linhaça, sendo ofertado 50% das necessidades diária dos animais. CaCO₃: 40g de Ca / 100g de CaCO₃.

⁵ quantidade suficiente para completar 100g.

* Valores de fibras baseado na literatura (AGUILAR et al., 2017).

4.2.7.2 Biodisponibilidade de cálcio

Os animais foram alocados em gaiolas metabólicas individuais de aço inoxidável e as fezes e urina foram coletadas separadamente por um período de 5 dias na 6ª semana do ensaio biológico. Nesse período o consumo alimentar foi padronizado para 20 g / dia / animal para todos os grupos, a fim de minimizar possíveis erros.

O volume total da urina coletada foi centrifugado (THERMO SCIENTIFIC®, modelo Heraeus Megafuge 16R) por 15 minutos a 4.000 rpm e o sobrenadante armazenado no freezer (CONSUL®) à -20 °C. O conteúdo total de fezes coletadas foi peneirado e seco em estufa (BIOPAR®) a 105 °C por 24 h. Após, foram pesadas em balança de precisão (SHIMADZU®, modelo AUY 220), trituradas em moedor semi industrial (ARBEL®) e armazenadas no freezer (CONSUL®) à -20 °C (THERMO SCIENTIFIC®, modelo 8924). O Ca das fezes e do sobrenadante da urina foram analisados como descrito anteriormente (item 4.2.4.2). O conteúdo de Ca ingerido foi determinado a partir do consumo de dieta dos animais no período de avaliação multiplicado pelo teor de Ca de cada dieta.

Foi determinado o balanço de Ca (Balanço = Ca ingerido – Ca fecal – Ca urinário) e a porcentagem de retenção do Ca (Equação 2).

Equação 2. Cálculo da retenção de Ca

$$\% \text{ de retenção} = \frac{\text{consumo de Ca (mg)} - \text{Ca urinário (mg)} - \text{Ca fecal (mg)}}{\text{consumo de Ca (mg)}} \times 100$$

4.2.7.3 Análises bioquímicas

Foram realizadas análise plasmática de Ca (BIOCLIN® Cálcio Arsenazo III), fósforo (BIOCLIN® Fósforo UV), creatinina (BIOCLIN® Creatinina Cinética) e fosfatase alcalina (BIOCLIN® Fosfatase Alcalina Cinética) seguindo as instruções de uso da fabricante do kit e com leitura em analisador químico (MINDRAY®, modelo B5-200E).

4.2.7.4 Análises dos fêmures

Após a eutanásia dos animais, os fêmures foram removidos, pesados em balança de precisão (SHIMADZU®, modelo AUY 220), medidos o seu comprimento e diâmetro com o auxílio de um paquímetro (DISMA®) e armazenados no freezer (CONSUL®) à -20 °C. Os fêmures foram dissolvidos em ácido nítrico por 16 horas (BOULBAROUD et al., 2008), sendo o Ca analisado como descrito anteriormente (item 4.2.4.2).

A partir dos valores obtidos, foram calculados a porcentagem de Ca ósseo (Equação 3) e de retenção óssea (Equação 4).

Equação 3. Cálculo da porcentagem de Ca ósseo

$$\% \text{ de Ca ósseo} = \frac{\text{quantidade de cálcio do fêmur (mg)}}{\text{peso do fêmur (mg)}} \times 100$$

Equação 4. Cálculo da porcentagem de retenção óssea

$$\% \text{ de retenção óssea} = \frac{\text{quantidade de cálcio do fêmur (mg)}}{\text{Ca total ingerido (mg)}} \times 100$$

4.2.8 Estudo *in vivo* da qualidade proteica

Foram utilizados 48 ratos machos *Wistar*, recém desmamados, com peso médio de 50 gramas, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde - UFES. Os animais foram mantidos em aclimatação por 5 dias. Após, foram distribuídos em seis grupos (n = 8 animais por grupo), a saber: Controle (CT), Aproveico (AP), Linhaça Dourada (LD), Linhaça Dourada Germinada (LDG), Linhaça Marrom (LM) e Linhaça Marrom Germinada (LMG). O tempo experimental total foi de 2 semanas. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com ambiente controlado, sendo fotoperíodo de 12 horas e temperatura média de 23 ± 2 °C. Os animais receberam água ultrapura e ração *ad libitum*. O peso e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente.

4.2.8.1 Dietas experimentais

As dietas experimentais (Tabela 2) foram elaboradas com base na composição da dieta AIN-93G (REEVES, 1997). O conteúdo de linhaça nas dietas foi ajustado para fornecer 9,5% de proteínas (4,75% provindos da linhaça e 4,75% da caseína). Após o preparo, as dietas foram acondicionadas em embalagens laminadas rotuladas e armazenadas a 5 ± 2 °C até a administração para os animais.

Tabela 2 - Composição das dietas experimentais de qualidade proteica (g / 100 g)

| Ingredientes (g / 100 g) | CT | AP | LD | LDG | LM | LMG |
|--|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|
| Linhaça Dourada | --- | --- | 22.97 | --- | --- | --- |
| Linhaça Dourada Germinada | --- | --- | --- | 21.59 | --- | --- |
| Linhaça Marrom | --- | --- | --- | --- | 23.76 | --- |
| Linhaça Marrom Germinada | --- | --- | --- | --- | --- | 21.79 |
| Caseína ¹ (PRAG Soluções) | 11.18 | --- | 5.6 | 5.6 | 5.6 | 5.6 |
| Amido Dextrinizado (PRAG Soluções) | 13.2 | 13.2 | 13.2 | 13.2 | 13.2 | 13.2 |
| Sacarose (UNIÃO®) | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 |
| Óleo de Soja ² (SOYA®) | 7.0 | 7.0 | --- | --- | --- | --- |
| Fibras ^{2*} (PRAG Soluções) | 5.0 | 5.0 | --- | --- | --- | --- |
| Mix de Minerais (PRAG Soluções) | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| Mix de Vitaminas (PRAG Soluções) | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| L-cistina (ISO FAR®) | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| Bitartarato de Colina (SIGMA®) | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| Amido de Milho ³ (MAIZENA®) | 48.57 | 59.75 | 43.18 | 44.56 | 42.39 | 44.36 |
| Valor energético total (kcal) | 392.71 | 391.48 | 407.00 | 405.36 | 410.72 | 408.14 |

CT: Controle, AP: Aproteico, LD: Linhaça Dourada, LDG: Linhaça Dourada Germinada, LM: Linhaça Marrom, LMG: Linhaça Marrom Germinada.

¹ quantidade ajustada de acordo com a composição da linhaça para fornecer no total 9,5% de proteínas. Caseína: 85g de PTN / 100g.

² sem adição nos grupos linhaça, devido a quantidade de linhaça oferecida ter fornecido a porcentagem recomendada para a dieta de lipídio e fibras. * Valores de fibras baseado na literatura (AGUILAR et al., 2017).

³ quantidade suficiente para completar 100g.

4.2.8.2 Determinação da qualidade proteica

Os animais foram alocados em gaiolas individuais de aço inoxidável e as fezes correspondentes ao período de consumo de dieta entre o 8º e o 12º dias foram coletadas e armazenadas em freezer (CONSUL®) à -20 °C para posterior determinação do nitrogênio fecal.

As fezes foram secas em estufa com circulação de ar, resfriadas, trituradas em

moedor semi industrial (ARBEL®) e pesadas em balança de precisão (SHIMADZU®, modelo AUY 220). Posteriormente, foram submetidas à digestão e destilação pelo método Kjeldhal (AOAC, 2005), utilizando-se um destilador de nitrogênio (TECNAL®, modelo TE-036 / 1) para a determinação do teor de nitrogênio total.

A qualidade proteica foi avaliada pelos métodos de Coeficiente de Eficiência Proteica (PER), Quociente de Eficiência Líquida da Proteína (NPR), Digestibilidade Verdadeira (DV), e PER e NPR relativos, por meio das Equações 5, 6, 7 e 8, respectivamente.

Equação 5. Cálculo do PER

$$\text{PER} = \frac{\text{ganho de peso (g)}}{\text{proteína ingerida (g)}}$$

Equação 6. Cálculo do NPR

$$\text{NPR} = \frac{\text{ganho de peso (g)} + \text{média de perda de peso do grupo AP (g)}}{\text{proteína ingerida (g)}}$$

Equação 7. Cálculo da DV

$$\text{DV} = \frac{\text{NI} - (\text{NF} - \text{NFK})}{\text{NI}} \times 100$$

Equação 8. Cálculo do PER e NPR relativos

$$\text{PR ou NPR} = \frac{\text{grupo teste} \times 100}{\text{grupo controle}}$$

Em que:

NI = nitrogênio ingerido pelo grupo testado

NF = nitrogênio fecal do grupo testado

NFK = nitrogênio fecal do grupo aprotéico

4.2.9 Análise estatística dos dados

Para avaliar a normalidade dos dados foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Após, foi empregado a Análise de Variância (ANOVA) “two-way” para os

dados de caracterização físico-química, fatores antinutricionais e estudo *in vitro* de bioacessibilidade de cálcio, sendo que em casos de interação aplicou-se o teste de Tukey. Para os estudos *in vivo* foi aplicado a ANOVA “one-way”, acompanhada pelo teste de Tukey. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises foram realizadas com auxílio do programa GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD SOFTWARE INC.®).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Germinação das linhaças

O processo de germinação das linhaças foi realizado por um período de 48 horas (Figura 1). Estudos sugerem que o tempo utilizado apresenta boa homogeneidade de germinação das sementes, podendo ser utilizado como referência para processos de germinação (URBANO et al., 2005; VILLENEUVE et al., 2015). Observa-se que, apesar de o tempo de germinação para ambas as linhaças terem sido o mesmo, a variedade marrom apresentou uma radícula maior que a dourada. Essa diferença pode estar relacionada à climatização das linhaças, visto que a marrom se adapta melhor ao clima quente e úmido do Brasil ao passo que, a dourada desenvolve-se melhor em regiões de clima frio.

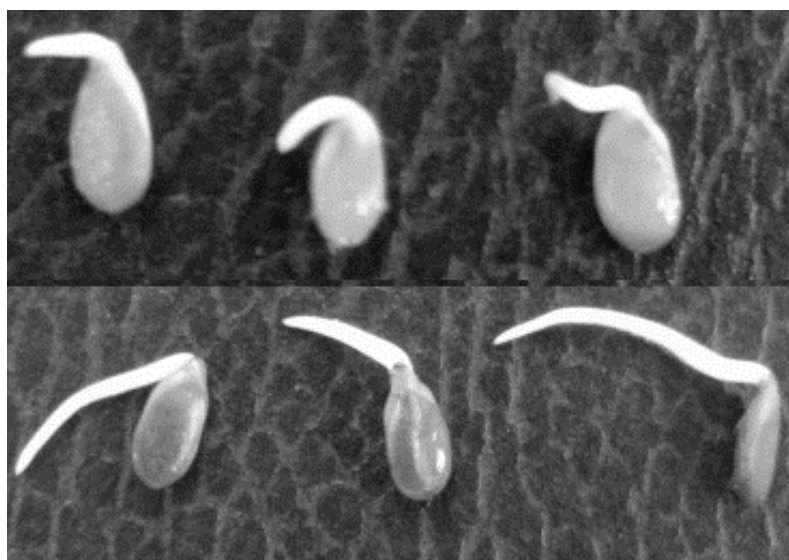


Figura 1. Registros digitais das linhaças dourada (A) e marrom (B) ao final do processo de germinação de 48 horas.

4.3.2 Caracterização físico-química das farinhas

O processo de germinação influenciou no aumento da concentração de proteínas, lipídios e cinzas ($p \leq 0,05$). Ainda, na concentração de proteínas houve influência da variedade da linhaça e no teor de cinzas ocorreu uma interação entre a variedade e a germinação ($p \leq 0,05$). Na concentração de carboidratos, a germinação reduziu significativamente esses teores nas linhaças ($p \leq 0,05$). Para a concentração de Ca não houve influência da germinação ($p > 0,05$), porém a variedade dourada foi significativamente superior nessa concentração em relação ao linhaça marrom ($p \leq 0,05$) (Tabela 3).

Nesse sentido, sugere-se que a germinação seja capaz de mobilizar as reservas das sementes para aumentar sua atividade metabólica e proporcionar o desenvolvimento da planta, o que culmina em modificações químicas nas macromoléculas. Herchi et al. (2015) verificaram um aumento de 16% no teor de proteínas, o que foi atribuído a síntese de lipídios e carboidratos no desenvolvimento inicial das sementes. Modificação similar no aumento de proteínas também foi observado em outro estudo, provavelmente devido a síntese de enzimas hidrolíticas durante os eventos da germinação (KAJLA; SHARMA; SOOD, 2017).

Diferentemente do presente estudo, Villeneuve et al. (2015) não observaram aumento do conteúdo total de lipídios e de proteínas em linhaças germinadas. Kim et al. (2012) observaram aumento de lipídios, ácido linoleico e oleico em arroz germinado, enquanto Moongngarm e Saetung (2010) encontraram valores sem diferença estatística nesses teores quando sementes de arroz passaram por esse mesmo processo e foram comparados com as sementes não germinadas. Enquanto isso, outros estudos relataram que a germinação reduziu o conteúdo de lipídios (JAN; SAXENA; SINGH, 2016; WANASUNDARA; WANASUNDARA; SHAHIDI, 1999), fato esse que pode ser devido à hidrólise e utilização de lipídios como fonte de energia para reações bioquímicas durante a germinação (JAN; SAXENA; SINGH, 2016; MOONGNGARM & SAETUNG, 2010). De modo geral, as discrepâncias observadas entre esses estudos podem estar relacionadas a diferenças no tempo de germinação e nos diferentes cultivares utilizados nos estudos, sendo necessário estudar o melhor tempo de germinação para cada alimento.

Tabela 3 - Composição centesimal da farinha de linhaça dourada e marrom germinada e não germinada em base seca.

| Composição em 100 g | Dourada | | Marrom | | Var | p | |
|---------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------|-----------------|---------------|
| | Não germinada | Germinada | Não germinada | Germinada | | Ger | Int |
| Carboidratos (g) | 38.86 ± 1.19 | 33.85 ± 1.97 | 39.31 ± 0.44 | 34.23 ± 0.36 | 0.5646 | < 0.0001 | 0.9625 |
| Proteínas (g) | 22.35 ± 0.38 | 23.10 ± 0.43 | 21.52 ± 0.42 | 22.85 ± 0.11 | 0.0319 | 0.0011 | 0.2082 |
| Lipídios (g) | 35.18 ± 0.81 | 39.39 ± 1.95 | 35.66 ± 0.14 | 39.08 ± 0.26 | 0.8936 | 0.0003 | 0.5359 |
| Cinzas (g) | 3.61 ± 0.05 ^{b,c} | 3.65 ± 0.03 ^b | 3.51 ± 0.05 ^c | 3.84 ± 0.03 ^a | 0.0981 | < 0.0001 | 0.0003 |
| Cálcio (mg) | 248.3 ± 5.67 | 265.6 ± 12.99 | 212.8 ± 26.29 | 211.6 ± 3.20 | 0.0009 | 0.3781 | 0.3170 |

Var: variedade da linhaça; Ger: germinação; Int: interação entre variedade x germinação. Valores apresentados com média ± desvio padrão. p: valores da ANOVA "two-way". Letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p \leq 0.05$) pelo teste de Tukey.

O processo de germinação pode diminuir o teor de amido da semente, devido à sua transformação em glicídios, que são utilizados em grande parte na respiração, para a produção de energia, bem como na síntese de outras moléculas complexas (SINGH; SHARMA; SINGH, 2017). Além disso, a germinação facilita a decomposição enzimática de carboidratos em açúcares simples por meio da ativação de enzimas endógenas, como a α -amilase, fornecendo energia para o desenvolvimento da semente (ZHANG, Ge et al., 2015).

A diferença no teor de minerais de sementes após a germinação, pode estar relacionada a desproporção na composição entre as próprias sementes, no tempo de germinação, no conteúdo de fatores antinutricionais, na ativação de enzimas endógenas, na extensão da ligação de minerais dentro da matriz ou na interação desses fatores (PAJAK et al., 2019). Kajla, Sharma e Sood (2017) verificaram redução significativa na concentração dos principais minerais, entre eles o Ca, mas em contrapartida, Sandhu, Kaur e Bhise (2017) observaram um aumento de 47% no teor de Ca da linhaça após a germinação.

O aumento no conteúdo mineral de sementes germinadas pode ser devido à perda de matéria seca que é ocasionada pelas alterações no metabolismo dessas sementes, atribuído isso, há então, uma melhor extração mineral (SUNG et al., 2005). Além disso, um aumento no teor de minerais é frequentemente observado como resultado da hidrólise do fitato devido ao aumento da atividade enzimática da fitase durante a germinação (SHARMA; SAXENA; RIAR, 2016). Para mais, a absorção de certos minerais do meio de crescimento também poderia ser parcialmente responsável pelo aumento destes durante a germinação (SUNG et al., 2005). Por outro lado, as perdas de minerais, podem ser atribuídas à lixiviação, ocasionadas pelo processo de embebição antes da germinação (RAHMA et al., 2015).

4.3.3 Fatores antinutricionais

O teor de tanino das linhaças não se diferenciou após a germinação, assim como não apresentou influência da variedade ($p > 0,05$). Por outro lado, os teores de fitato e oxalato reduziram após o processo de germinação ($p \leq 0,05$), mas também sem influência da variedade (Tabela 4).

Tabela 4 - Fatores antinutricionais da farinha de linhaça dourada e marrom germinada e não germinada em base seca.

| Composição em 100 g | Dourada | | Marrom | | p | | |
|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------|---------------|--------|
| | Não germinada | Germinada | Não germinada | Germinada | Var | Ger | Int |
| Tanino (EC) | 79.97 ± 3.49 | 78.81 ± 0.77 | 81.82 ± 2.61 | 79.24 ± 4.58 | 0.5528 | 0.3384 | 0.7110 |
| Fitato (mg) | 1435.43 ± 84.70 | 1140.57 ± 75.09 | 1296.38 ± 57.91 | 1134.23 ± 21.43 | 0.0866 | 0.0003 | 0.1125 |
| Oxalato (mg) | 293.27 ± 6.51 | 252.85 ± 16.11 | 307.87 ± 8.04 | 258.20 ± 15.39 | 0.1971 | 0.0002 | 0.5327 |

EC: Equivalente de Catequina. Var: variedade da linhaça; Ger: germinação; Int: interação entre variedade x germinação. Valores apresentados com média ± desvio padrão. p: valores da ANOVA “two-way”.

Tabela 5 - Razões molares de fitato e oxalato com o cálcio da farinha de linhaça dourada e marrom germinada e não germinada em base seca.

| | Dourada | | Marrom | | p | | |
|----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|---------------|---------------|
| | Não germinada | Germinada | Não germinada | Germinada | Var | Ger | Int |
| Razão molar fitato:cálcio | 5.35 ± 0.28 ^b | 4.09 ± 0.25 ^a | 5.66 ± 0.26 ^b | 5.11 ± 0.08 ^b | 0.0009 | 0.0001 | 0.0200 |
| Razão molar oxalato:cálcio | 1.09 ± 0.03 | 0.91 ± 0.06 | 1.34 ± 0.03 | 1.16 ± 0.06 | < 0.0001 | 0.0001 | 0.9047 |

Var: variedade da linhaça; Ger: germinação; Int: interação entre variedade x germinação. Valores apresentados com média ± desvio padrão. p: valores da ANOVA “two-way”. Letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p \leq 0.05$) pelo teste de Tukey.

A ação antinutricional de tanino e fitato está baseada na capacidade de formar complexos insolúveis com minerais, proteínas e amidos biologicamente indisponíveis para seres humanos em condições fisiológicas normais, enquanto o teor de oxalato é de importância nutricional devido à interferência principalmente na biodisponibilidade do Ca. (AMAROWICZ; DYKES; PEGG, 2008). Entretanto, o fitato quando em baixas concentrações, apresenta também efeitos positivos sobre a saúde, como ação protetora frente ao câncer e redução do risco de enfermidades cardiovasculares (RAMÍREZ-CÁRDENASI; LEONEL; COSTA, 2008).

Resultados diferentes aos do presente estudo foram observados por Oloyo (2004), que ao quantificar o teor de tanino em leguminosas observaram redução de 82% após 48 horas, enquanto Ahmed et al. (2006), encontraram aumento de 51% no conteúdo de tanino após 36 horas de germinação. Segundo o autor, esse aumento no conteúdo de tanino durante o processo germinativo, deve-se à solubilização de tanino insolúvel, que pode ter causado migração do tanino do tegumento para o núcleo da semente.

Outros estudos relataram que a atividade de enzimas quelantes de fitato, oxalato e tanino aumentaram durante o processo germinativo de sementes, ao passo que esses fatores diminuíram como resultado da germinação (BETSCHE & FRETZDORFF, 2005; EGLI et al., 2002; KAJLA; SHARMA; SOOD, 2017; KHATTAK et al., 2007; SHIMELIS & RAKSHIT, 2007). Enquanto Hemalatha, Platel e Srinivasan (2007) não encontraram redução significativa no teor de fitato após a germinação.

A função biológica da enzima fitase em sementes está relacionada com a liberação do fósforo inorgânico e orgânico a partir do fitato hidrolisado e na disponibilidade de Ca, proteínas, magnésio e lipídios. Desta forma, a desfosforilação do fitato torna-se pré-requisito para melhoria do valor nutricional do grão, favorecendo o aumento de nutrientes que estavam complexados à molécula do ácido fítico (SHIMELIS & RAKSHIT, 2007).

Diversos autores (SHIMELIS & RAKSHIT, 2007; VIDAL-VALVERDE et al., 2002) indicam que embora o teor de ácido fítico diminua durante processo germinativo, o aumento da atividade dessas enzimas dependerá das condições da germinação estudadas, bem como o tipo e tempo de embebição realizado anterior ao processo de germinação. Assim, com essa grande variação nos teores de ácido fítico,

entende-se que as condições de germinação os quais as sementes são submetidas, têm papel fundamental na composição do produto final.

Willians e Taylor (1985) verificaram que a hidrólise de fitato pela fitase bacteriana do intestino grosso é a principal responsável pela quebra de fitato, quando os ratos são alimentados com dietas sem fitase. Assim, a fitase intestinal pode aumentar a biodisponibilidade de Ca e as diferenças nos teores de fitato entre dietas e a razão fitato:cálcio, como as aqui observadas, podem não ser suficiente para afetar a absorção de Ca em ratos.

A partir dos valores obtidos de fitato, oxalato e Ca presente nas linhaças, calculou-se também as razões molares fitato:cálcio e oxalato:cálcio (Tabela 5). A redução encontrada nos teores de fitato e oxalato das linhaças após a germinação influenciaram diretamente nas razões molares com o Ca. A germinação promoveu redução significativa das razões molares fitato:cálcio e oxalato:cálcio, sendo que na linhaça marrom essas relações foram superiores à variedade dourada ($p \leq 0,05$). Ainda, na razão fitato:cálcio houve uma interação entre a variedade da linhaça com a germinação, em que a razão molar foi maior para a linhaça marrom e após a germinação a linhaça dourada, que apresentava valor de razão molar estatisticamente idêntico a outra variedade, reduziu, diferenciando-se da linhaça marrom ($p \leq 0,05$). Mas, apesar de ter ocorrido uma diminuição nas razões molares de oxalato e fitato com o Ca após a germinação, esses valores ainda podem ser considerados elevados.

4.3.4 Estudo *in vitro* da bioacessibilidade de cálcio

O teor de Ca das amostras após a simulação do processo de digestão gastrointestinal *in vitro* foi analisado (Figura 2).

Verifica-se que a germinação aumentou a bioacessibilidade de Ca em relação às contrapartes não germinadas ($p \leq 0,05$), sendo que a variedade também influenciou significativamente no resultado ($p \leq 0,05$), em que a linhaça dourada foi superior em relação a variedade marrom.

Na avaliação do Ca residual, o resultado para a linhaça dourada foi inverso ao do Ca bioacessível, apresentando diferença significativa entre a não germinada e a germinada ($p \leq 0,05$). Por outro lado, na linhaça marrom apesar de ter havido uma diminuição nesses valores, não houve diferença estatística ($p > 0,05$). A porcentagem de recuperação do Ca apresentou-se estatisticamente igual nas quatro farinhas ($p >$

0,05), encontrando-se todas acima dos 90%, demonstrando uma regularidade entre as amostras e uma eficácia nas análises realizadas.

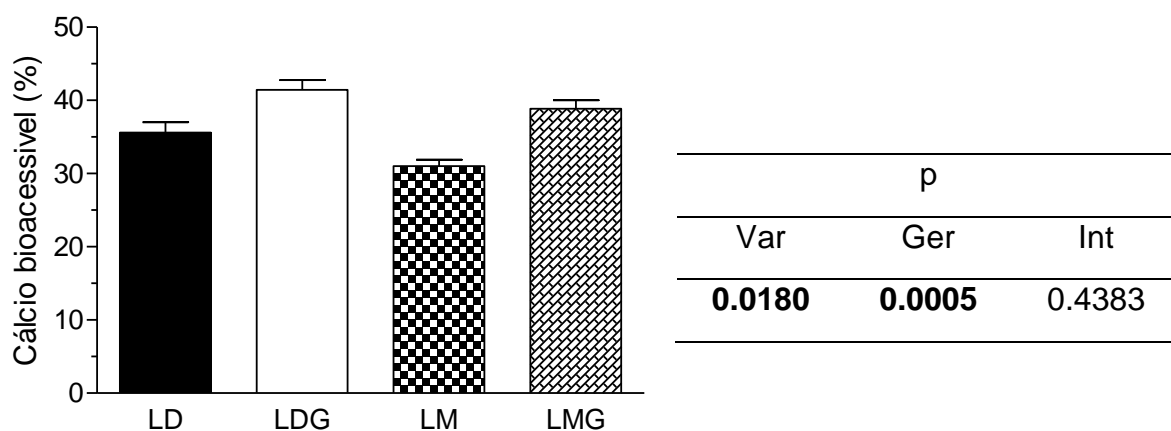


Figura 2. Porcentagem de Ca bioacessível das farinhas de linhaça dourada e marrom germinada e não germinada após o processo de digestão *in vitro*.

LD: Linhaça Dourada, LDG: Linhaça Dourada Germinada, LM: Linhaça Marrom, LMG: Linhaça Marrom Germinada. Var: variedade da Linhaça; Ger: germinação; Int: interação entre variedade x germinação. Dados expressos em média e desvio padrão. p: valores da ANOVA “two-way”.

A bioacessibilidade tem sido definida como a fração que é liberada do alimento no trato gastrointestinal, a qual está disponível para absorção e utilização pelo organismo (FERNÁNDEZ-GARCÍA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009; TAKO; BAR; GLAHN, 2016). Desse modo, a metodologia de digestão *in vitro* simulada tem sido utilizada com o objetivo de apresentar informações preliminares sobre a estimativa da biodisponibilidade de determinados nutrientes devido a sua correlação positiva com os experimentos utilizando modelos *in vivo* (HARO-VICENTE; MARTÍNEZ-GRACIÁ; ROS, 2006).

Outros estudos também evidenciaram aumento da bioacessibilidade de Ca após o processo germinativo, como é o caso do milho e do trigo (PLATEL; EIPESON; SRINIVASAN, 2010), de sementes de feno grego (AFIFY et al., 2012), de feijão verde, feijão caupi, lentilha e grão de bico (GHAVIDEL & PRAKASH, 2007).

O efeito benéfico da germinação na bioacessibilidade do Ca, pode provavelmente ser atribuído à diminuição do conteúdo de fitato e oxalato como resultado da germinação. Entre os inibidores da bioacessibilidade mineral inerente às sementes, o fitato e oxalato tem sido observado como dominante em relação às fibras ou ao tanino (PLATEL; EIPESON; SRINIVASAN, 2010). O fitato em alimentos vegetais forma complexos com minerais essenciais, tornando-os biologicamente indisponíveis para absorção, mas a atividade de fitase aumenta na germinação, causando

catabolismo de ácido fítico e polifenóis, melhorando a bioacessibilidade mineral (HOODA & JOOD, 2003). Ghavidel e Prakash (2007) observaram correlação negativa entre a bioacessibilidade de Ca e o teor de fitato em diferentes tipos de leguminosas germinadas por 24 horas.

4.3.5 Estudo *in vivo* da biodisponibilidade de cálcio

4.3.5.1 Consumo alimentar, peso dos animais e coeficiente de eficiência alimentar e calórica

O consumo alimentar semanal, consumo alimentar per capita diário, consumo calórico per capita diário, consumo de Ca per capita diário, peso semanal dos animais, ganho de peso total dos animais, CEA e CEC não apresentaram diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 3). As dietas fornecidas eram isocalóricas, o que contribuiu para um consumo e ganho de peso adequado e sem diferença entre os grupos.

Analisando o consumo alimentar semanal, uma pequena queda é observada na última semana. Essa queda é devido a padronização na quantidade da dieta fornecida aos animais, que até quarta semana foram fornecidas *ad libitum*, e da quarta até a sexta semana foi controlada, sendo fornecido uma média de dieta calculada a partir das semanas anteriores, no intuito de minimizar erros na avaliação do balanço de Ca. Essa redução não apresentou diferença significativa para os grupos ($p > 0,05$).

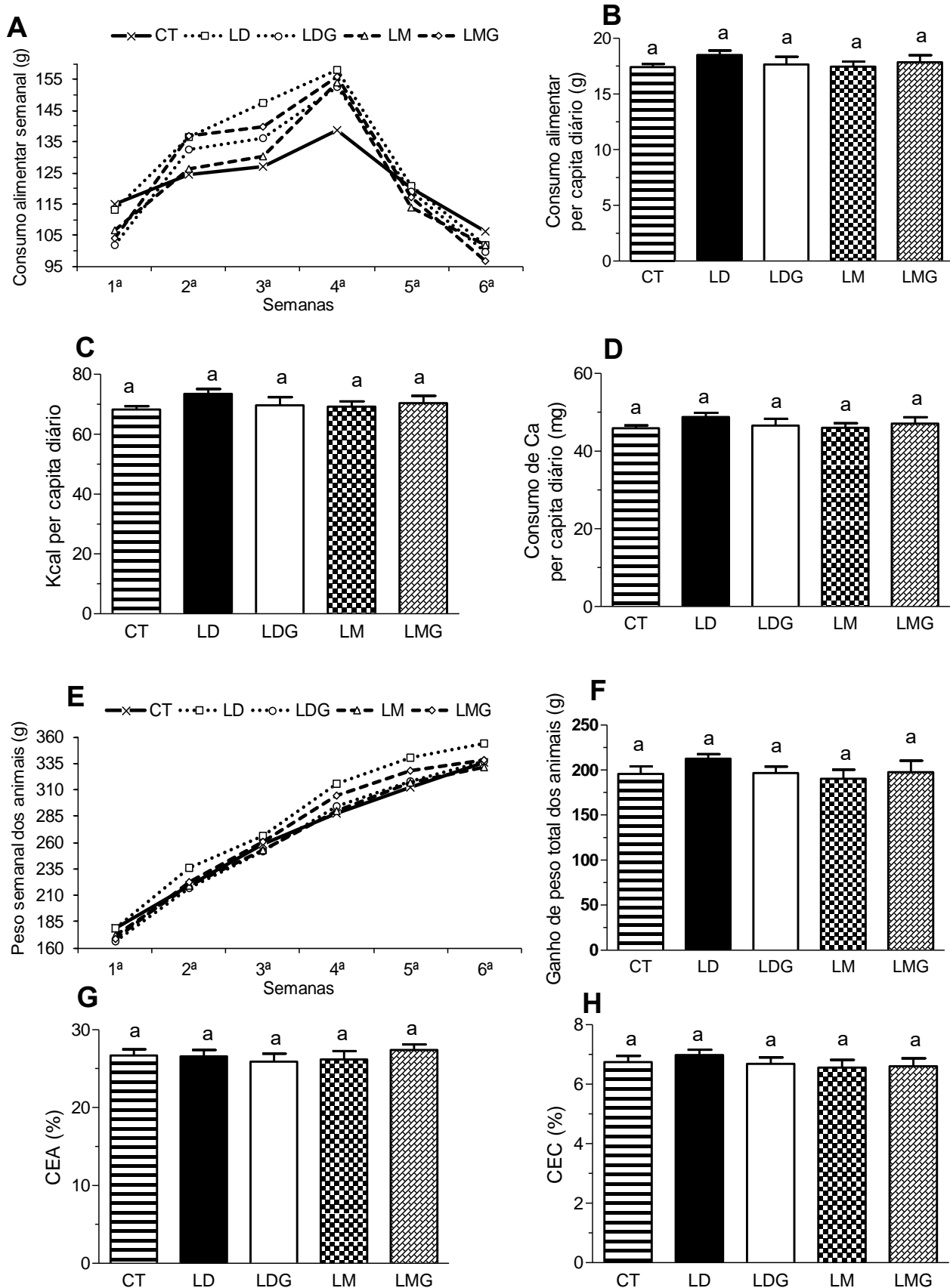


Figura 3. Consumo alimentar semanal (A), consumo alimentar per capita diário (B), consumo calórico per capita diário (C), consumo de Ca per capita diário (D), peso semanal dos animais (E), ganho de peso total dos animais (F), CEA (G) e CEC (H) do experimento *in vivo*.

CEA: Coeficiente de Eficiência Alimentar, CEC: Coeficiente de Eficiência Calórica. Ca: Cálcio. LD: Linhaça Dourada, LDG: Linhaça Dourada Germinada, LM: Linhaça Marrom, LMG: Linhaça Marrom Germinada. Dados expressos em média e desvio padrão. Letras diferentes significam diferença estatística ($p \leq 0,05$) pelo teste ANOVA "one-way" acompanhada pelo teste de Tukey.

4.3.5.2 Balanço de cálcio

O consumo de dieta e de Ca durante o balanço não diferiu entre os grupos ($p > 0,05$), mostrando que todos os animais consumiram quantidades semelhantes de dieta e evidenciando que este fator teve uma correlação positiva com o estudo, não sendo um interferente para com os resultados finais do balanço. O Ca urinário e o Ca fecal, também não apresentaram diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$), comportando-se todos de maneira semelhante e equiparando-se como o grupo controle (Figura 4).

Em relação ao balanço de Ca / dia, a linhaça marrom germinada apresentou-se estatisticamente inferior ao grupo controle ($p \leq 0,05$), entretanto os outros grupos não se diferenciaram do grupo controle ($p > 0,05$). Já a porcentagem de retenção do Ca da dieta, não apresentou diferença significativa entre nenhum dos grupos ($p > 0,05$), estando todos acima dos 90% de retenção.

Embora a linhaça seja uma boa fonte de Ca, o consumo não garante sua liberação, visto que os fatores antinutricionais em sementes podem reduzir a absorção de minerais. A maioria do Ca dos alimentos está na forma de complexos com outros constituintes dietéticos, que devem ser quebrados e o Ca ser liberado em uma forma solúvel e ionizada, antes de ser absorvido. No trato gastrointestinal os constituintes dos alimentos são liberados, como glicose, ácidos graxos, fosfato e oxalato, que podem se ligar ao Ca solúvel, resultando em formação de complexo com diferentes graus de solubilidade (EKBOTE et al., 2011).

Existe uma sequência de fatores que podem interferir na biodisponibilidade do Ca, incluindo a forma química do mineral, a ligação molecular, a quantidade ingerida e o estado nutricional do indivíduo. Além desses, diversos componentes presentes na matriz do alimento podem influenciar consideravelmente a utilização do Ca pelo organismo (CASHMAN, 2002). De uma forma geral, em humanos a quantidade de Ca absorvido depende de uma variedade de fatores, incluindo o comprimento do segmento intestinal, tempo de permanência do quimo em um determinado segmento do intestino, a sua concentração no lúmen intestinal e a biodisponibilidade do mineral no alimento (KAUSHIK et al., 2014). A eficiência absorvativa, geralmente, varia inversamente com a ingestão, mas a quantidade absoluta absorvida aumenta com a ingestão. Além disso, quando as demandas do mineral se encontram aumentadas,

como durante a gravidez, a lactação e o crescimento do esqueleto, a eficiência do transporte de Ca encontra-se aumentada (AHEARN et al., 2011).

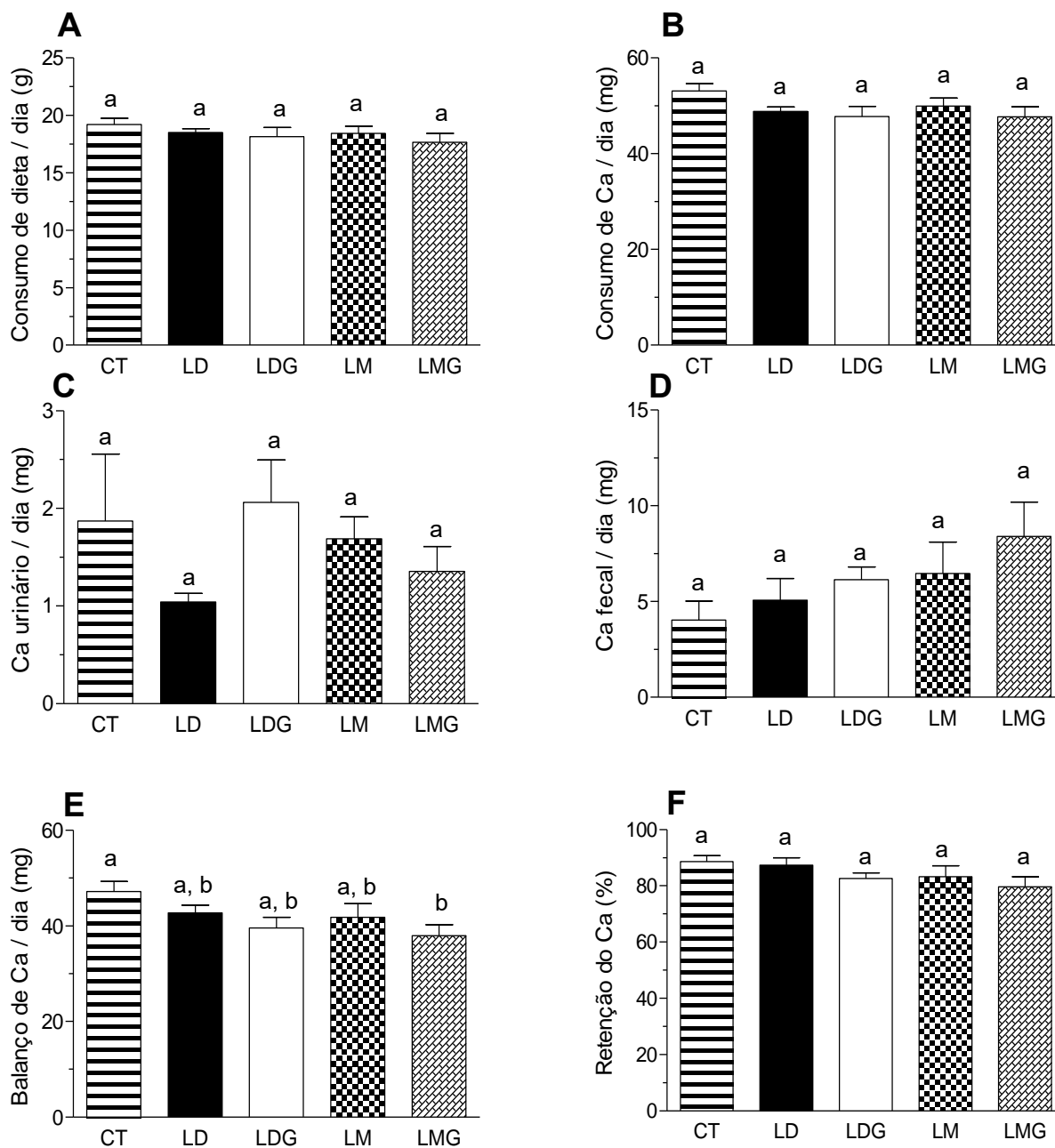


Figura 4. Consumo de dieta / dia (A), consumo de Ca / dia (B), Ca urinário / dia (C), Ca fecal / dia (D), balanço de Ca / dia (E) e porcentagem de retenção do Ca (F) do experimento *in vivo*. Ca: Cálcio. LD: Linhaça Dourada, LDG: Linhaça Dourada Germinada, LM: Linhaça Marrom, LMG: Linhaça Marrom Germinada. Dados expressos em média e desvio padrão. Letras diferentes significam diferença estatística ($p \leq 0,05$) pelo teste ANOVA “one-way” acompanhada pelo teste de Tukey.

No presente estudo, a absorção de Ca foi similar entre as variedades de linhaça e suas respectivas germinações. Provavelmente, a redução nos níveis de fitato e oxalato, embora significativa, não tenha sido suficiente para afetar a absorção de Ca.

Os resultados obtidos neste trabalho são similares ao do estudo de Mason et al. (1993), no qual níveis diferentes de fitato (0,74 e 1,7%) em isolado proteico de soja não influenciaram a absorção de Ca em ratos recém-desmamados e adultos.

Durante a digestão, o Ca é descomplexado na dieta e liberado em uma forma solúvel e provavelmente ionizada para a absorção. Para que isso ocorra é necessário a atuação de enzimas digestivas e um pH relativamente ácido. Entretanto, complexos de baixo peso molecular, como o oxalato de Ca e o carbonato de Ca, podem ser absorvidos intactos (FREDLUND et al., 2003).

Ainda, a redução das razões molares de fitato e oxalato com o Ca entre as linhagens não germinadas e germinadas, parece ter sido suficiente para aumentar a bioacessibilidade de Ca, mas apesar dessa redução, a razão molar tanto de fitato quanto de oxalato ainda são consideradas elevadas, podendo não permitir a melhora da absorção do Ca. Weaver et al. (1993), utilizando diferentes variedades de feijão, observaram que o feijão carioca, que possuía maior relação oxalato:cálcio e fitato:cálcio, não reduziu a absorção de Ca em humanos em relação às variedades de feijão branca e vermelha, que apresentaram menor razão molar.

Este estudo, apesar de ter sido realizado com animais, tentou-se basear em referências para humanos, e sabe-se que a média do consumo de Ca da população fica em torno de 50% das necessidades diárias (EKBOTE et al., 2011), por isso, escolheu-se trabalhar com essa quantidade em vez de 100% das necessidades.

Além disso, a utilização de uma dieta fornecendo 50% das necessidade dos animais é suportada pelo fato de que a deficiência do Ca dietético pode reduzir a sua quantidade absorvida no intestino, levando a menores níveis sanguíneos, e com isso, o reduzido nível de Ca circulante estimula a liberação de paratormônio (PTH) para restaurar seus níveis no sangue que, por sua vez, atua diminuindo a excreção urinária de Ca, além de elevar sua absorção intestinal e mobilização óssea (ZHANG et al., 2008).

Em um estudo avaliando a ingestão de Ca em 50 e 100% das necessidades diárias dos animais, constatou-se que os níveis da excreção de Ca urinário e fecal nos animais que consumiram baixos teores de Ca foram menores quando comparados aos animais com 100% das necessidades atingidas (COUDRAY et al., 2005). Essa menor perda de Ca poderia ser um mecanismo protetor do organismo, a fim de poupar os níveis de Ca séricos para suas funções fisiológicas.

A biodisponibilidade de Ca foi avaliada em 11 alimentos de origem vegetal ou animal, utilizando-se ratos como modelo experimental. A biodisponibilidade de Ca foi encontrada como sendo mais alta em peixes e queijos fermentados, mas a germinação de feijão-fava também aumentou a biodisponibilidade do Ca para um valor comparável ao de alguns produtos de origem animal, demonstrando que o processo de germinação está associado a um aumento na biodisponibilidade mineral (GHANEM & HUSSEIN, 1999). A esse respeito, a germinação do feijão-mungu e do feijão-caupi foi responsável por considerável degradação e redução no conteúdo de ácido fítico, sendo que tais mudanças bioquímicas no conteúdo das sementes foram sugeridas como responsáveis em melhorar a biodisponibilidade do Ca (KUMAR et al., 1978).

Por isso, deve-se levar em consideração que a biodisponibilidade de minerais nos alimentos depende de várias condições, tais como o tipo de matriz alimentar, o tipo de processamento utilizado, a ativação de enzimas endógenas, a extensão da ligação de minerais dentro da matriz, a quantidade de fatores antinutricionais presentes no alimento ou uma interação desses fatores (HAILESLASSIE; HENRY; TYLER, 2016; PAJAŁK et al., 2019).

Desta forma, o metabolismo do Ca mostra-se de elevada complexidade, sendo necessário o conhecimento das interações entre os fatores que afetam a biodisponibilidade e os mecanismos envolvidos na absorção do Ca, para que se possa permitir o desenvolvimento de estratégias que visem um melhor aproveitamento do mineral pelo organismo.

4.3.5.3 Análises bioquímicas

A respeito da avaliação das análises bioquímicas (Figura 5), não foram observadas diferenças estatísticas entre as variedades germinadas e não germinadas, tampouco em relação ao controle nesse tempo de intervenção de 6 semanas ($p > 0,05$), estando todos em níveis considerados normais.

O nível sérico normal de Ca permanece rigorosamente controlado, oscilando não mais que 5% durante as 24 h do dia (COUDRAY et al., 2005). Sua manutenção é regulada por um sistema de fatores controladores e mecanismos de feedback, envolvendo a interação de hormônios calciotrópicos (PTH, vitamina D [1,25(OH)₂D₃] e calcitonina) com órgãos como o intestino, os rins e o osso. O PTH e a 1,25(OH)₂D₃ são secretados quando a concentração plasmática de Ca se encontra diminuída

(CASHMAN, 2002). A secreção do PTH parece ser regulada por um receptor sensível ao Ca, que também está envolvido no controle da absorção de Ca ao longo do trato gastrointestinal (COUDRAY et al., 2005). Quando tal concentração se eleva em resposta à absorção aumentada de Ca, à reabsorção tubular aumentada e à reabsorção óssea, o limiar de excreção renal altera-se e o Ca extra é excretado na urina. Outro mecanismo que é ativado quando a concentração plasmática de Ca se encontra aumentada é a liberação, pela tireoide, da calcitonina, que retarda a reabsorção osteoclástica, diminuindo a liberação óssea de Ca (CASHMAN, 2002).

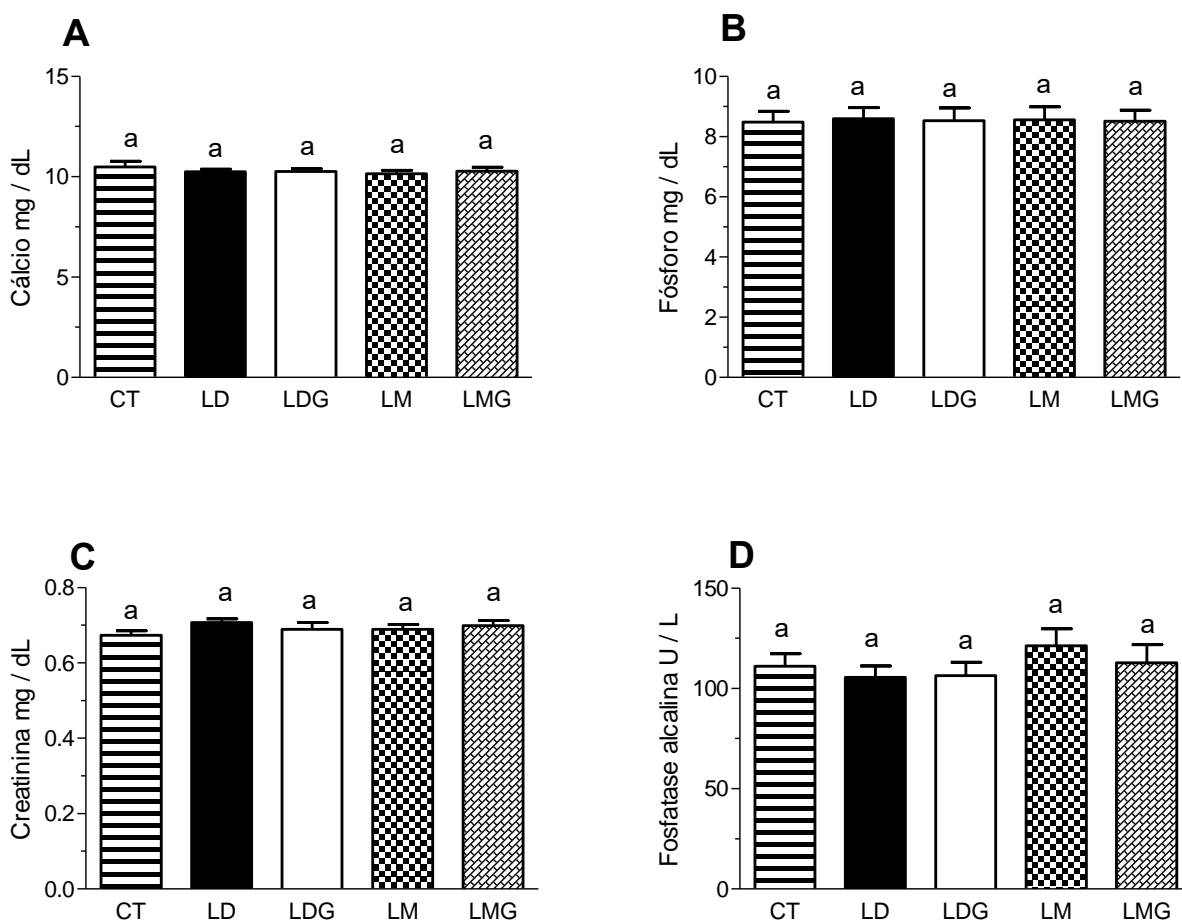


Figura 5. Cálcio plasmático (A), fósforo plasmático (B), creatinina plasmática (C) e fosfatase alcalina (D) dos animais.

LD: Linhaça Dourada, LDG: Linhaça Dourada Germinada, LM: Linhaça Marrom, LMG: Linhaça Marrom Germinada. Dados expressos em média e desvio padrão. Letras diferentes significam diferença estatística ($p \leq 0,05$) pelo teste ANOVA "one-way" acompanhada pelo teste de Tukey.

Os indicadores que refletem o estado nutricional referente ao Ca estão intimamente relacionados à sua concentração no esqueleto. O Ca é um dos principais constituintes da matriz óssea mineralizada formando, juntamente com o fósforo, os cristais de hidroxiapatita sendo, deste modo, fundamental para a manutenção de um tecido ósseo saudável e resistente. Através da remodelação óssea, estes íons sofrem

um processo de solubilização durante a reabsorção, sendo transferidos para a circulação e retornando ao estado sólido (KAUSHIK et al., 2014).

Grande importância se dá aos distúrbios do cálcio e fósforo por suas implicações na elevada morbidade e na mortalidade de pacientes com doença renal crônica. O hiperparatireoidismo secundário ocorre precocemente no curso da insuficiência renal crônica, devido, principalmente, à retenção de fósforo, hipocalcemia e níveis baixos de calcitriol. Estas alterações, associadas à resistência óssea e à ação do PTH, levam à hipertrofia e hiperplasia da glândula paratireoide (JUNIOR et al., 2004).

As alterações do metabolismo do cálcio e fósforo não são frequentes nas fases iniciais da doença renal crônica. Já em fases mais avançadas da insuficiência renal, quando a creatinina sérica começa a se elevar, níveis elevados da fosforemia passam a ser observados. A hipocalcemia ocorre somente quando a depuração da creatinina é muito baixa, já nos níveis de PTH, há uma elevação progressiva à medida em que a depuração de creatinina é reduzida, evidenciando o hiperparatireoidismo em fases precoces de disfunção renal (BARRY et al., 2014).

A creatinina, sintetizada principalmente no fígado e nos rins, é produzida e excretada em um ritmo constante independente da dieta, grau de hidratação e metabolismo proteico. Os dados bioquímicos proporcionam índices seguros quanto a capacidade renal de excretar, reabsorver e secretar a creatinina. A creatinina está elevada na insuficiência renal aguda e crônica, na obstrução do trato urinário e na insuficiência cardíaca congestiva. Níveis diminuídos podem ser observados na desnutrição e doença renal severa (AGARWAL et al., 2011).

O mecanismo pelo qual a suplementação de cálcio aumenta a creatinina no sangue é desconhecido, mas pode ser devido a um efeito sobre a função renal. Algum do efeito pode ser devido ao aumento muito modesto do cálcio no sangue devido à suplementação de cálcio, possivelmente através de um mecanismo hemodinâmico (BOLLAND et al., 2008). Outros mecanismos potenciais incluem vasoconstrição leve devido ao aumento da calciúria ou indução de natriurese por cálcio, o que poderia causar leve desidratação, ou possivelmente aumento da calcificação dos glomérulos. Tem sido sugerido que a glomerulosclerose e a aterosclerose compartilham mecanismos comuns e o aumento da calcificação vascular tem sido sugerido como um possível mecanismo para um aumento de eventos cardiovasculares com

suplementação de cálcio. Alternativamente, a suplementação de cálcio pode aumentar a carga de creatinina ou alterar o manejo renal da creatinina sem reduzir a filtração glomerular (BARRY et al., 2014).

A fosfatase alcalina é um marcador bioquímico circulante de renovação óssea que eleva com o aumento da atividade óssea e reflete a atividade dos osteoblastos. Além de estar presente nos ossos e constituir doenças ósseas associadas a hiperatividade osteoblástica, a fosfatase encontra-se em altas concentrações no fígado e no intestino, constituindo um útil indicador de doenças hepáticas (DABAJA et al., 2015).

Isoenzimas de fosfatase alcalina são produzidas por pelo menos quatro genes diferentes. A medida laboratorial típica da fosfatase não distingue entre as diferentes isoenzimas, mas é uma reflexão altamente sensível da renovação óssea, já que a maior parte da fosfatase no soro é produzida a partir da remodelação óssea e do fígado (BRUN; BRANCE; RIGALLI, 2012).

Quando diminuída, pode representar hipotireoidismo, retardo do crescimento na fase inicial de vida, hipofosfatasia e desnutrição grave. Enquanto altos níveis de creatinina podem ser observados em doenças hepáticas, metástase óssea, hipertireoidismo, raquitismo e doença de Paget (LIM et al., 2015). No entanto, a atividade da fosfatase alcalina sérica é a soma de três isoformas (osso, fígado, intestino). Portanto, os níveis séricos elevados não são necessariamente um sinal de um defeito de mineralização, mas também podem ser devidos a uma alta taxa de crescimento ou a um distúrbio da função hepática (HUNG et al., 2011).

Além disso, foi sugerido que a fosfatase alcalina desempenha um papel fundamental no metabolismo mineral e pode ser um marcador molecular de calcificação vascular. De fato, a fosfatase é uma enzima metalo ligada à membrana que catalisa a hidrólise do pirofosfato orgânico, um inibidor da calcificação vascular. Assim, o papel da fosfatase tem sido destacado em termos de seus efeitos sobre a doença vascular (PARK et al., 2013).

Apesar de parte da fonte de Ca das dietas serem diferente entre os grupos, a quantidade final fornecida foi a mesma, e possivelmente, devido a esse fator, a absorção mineral se comportou de maneira semelhante. Mas os resultados encontrados podem ser considerados positivos quando comparados com o controle, uma vez que o Ca disponível para o grupo controle era composto 100% de carbonato

de Ca, que é a forma preferida quando utilizada como suplemento por causa de seu peso molecular relativamente baixo. Os demais grupos possuíam uma parte do Ca da dieta proveniente da linhaça, que juntamente trazia consigo fatores antinutricionais, que podem contribuir para uma diminuição na biodisponibilidade de Ca, mas que nesse caso, não foi capaz de interferir, não diferenciando os demais grupos do controle.

4.3.5.4 Análises dos fêmures

Na avaliação morfológica dos fêmures (distância entre as epífises, largura da diáfise e peso) não foram evidenciadas diferenças estatísticas entre as linhaças, bem como em relação ao controle nesse tempo de intervenção de 6 semanas ($p > 0,05$). De forma semelhante, a relação mg de Ca / peso total do fêmur, concentração de Ca no fêmur e o percentual de retenção óssea não variou entre os tratamentos ($p > 0,05$) (Figura 6).

Dentre os fatores de risco que interferem no metabolismo ósseo, a nutrição exerce um papel preponderante (BALLABRIGA, 2000). Tem sido sugerido que parte da variação da massa óssea é predeterminada por meio da alimentação, como a baixa ingestão de Ca ou condições que alterem a sua absorção intestinal, como a presença de fatores antinutricionais (CASHMAN, 2002). Por isso, processos como a germinação, que alteram a composição do alimento, podendo melhorar a bioacessibilidade e a biodisponibilidade de nutrientes como o Ca, podem exercer efeitos benéficos sobre a matriz óssea. Mas além desses fatores negativos, existem os fatores que estimulam a absorção de Ca e assim contribuem positivamente para com o metabolismo ósseo.

De todos os nutrientes que participam da biossíntese e manutenção óssea, o Ca é um dos mais discutidos e estudados porque é um dos minerais mais deficientes na nossa dieta habitual (EKBOTE et al., 2011). A linhaça, mesmo que não germinada, se mostra como uma boa fonte de Ca, e uma adequada ingestão e absorção desse mineral, asseguram uma mineralização durante períodos de rápido crescimento e mantêm a massa e a densidade óssea durante períodos críticos do desenvolvimento (BALLABRIGA, 2000).

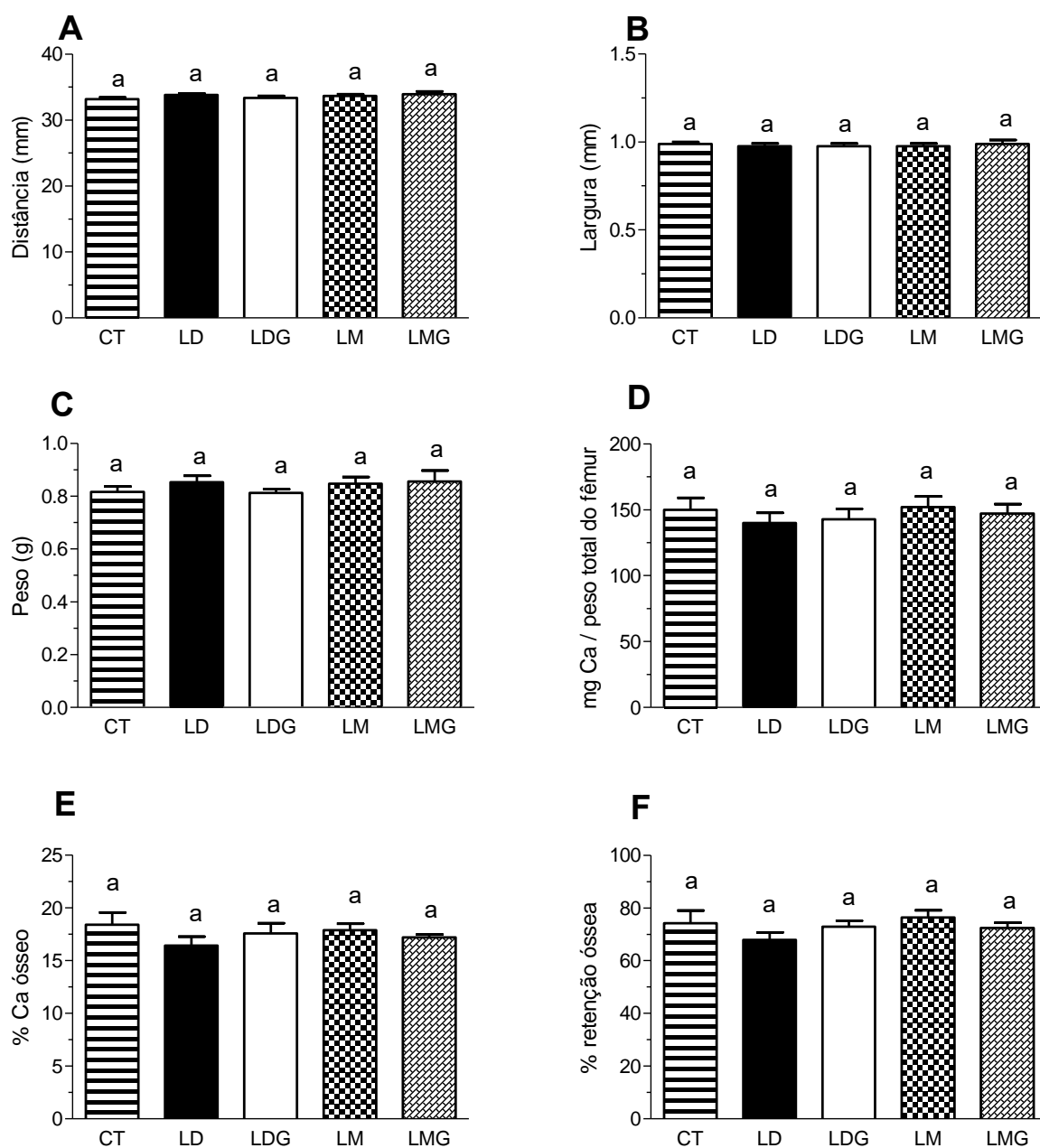


Figura 6. Distância entre as epífises (A), largura da diáfise (B), peso do fêmur (C), relação mg de Ca / peso total do fêmur (D), concentração de Ca no fêmur (E) e percentual de retenção óssea (F) do fêmur dos animais.

Ca: Cálcio. LD: Linhaça Dourada, LDG: Linhaça Dourada Germinada, LM: Linhaça Marrom, LMG: Linhaça Marrom Germinada. Dados expressos em média e desvio padrão. Letras diferentes significam diferença estatística ($p \leq 0,05$) pelo teste ANOVA "one-way" acompanhada pelo teste de Tukey.

Ainda, a linhaça contém altas concentrações de ácido alfa-linolênico (ALA) (16% na marrom e 13% na dourada) (AGUILAR et al., 2017). Os ácidos graxos da série ômega 3 reduzem a osteoclastogênese, bem como a maturação dos osteoclastos, contribuindo para diminuição da reabsorção óssea por regulação negativa do ativador do receptor do fator nuclear β . Para os osteoblastos, o ALA

preserva a massa óssea aumentando a expressão dos principais fatores de transcrição, como a osteocalcina, que promovem a maturação dos osteoblastos maduros (DA COSTA et al., 2012; NAKANISHI & TSUKAMOTO, 2015; WEISS; BARRETT-CONNOR; MÜHLEN, 2005).

Além do ALA, a linhaça possui uma alta concentração de lignanas, principalmente como diglucosídeo secoisolariciresinol (SDG), que é o precursor das formas ativas do enterodiol (ED) e enterolactona (EL) (TOURE & XUEMING, 2010). A similaridade estrutural de ED e EL com a forma mais predominante e ativa de estrogênio no corpo, o estradiol, permite que essas lignanas se liguem a receptores de estrogênio e exerçam efeitos estrogênicos ou antiestrogênicos fracos (CARREAU et al., 2008), portanto, a suplementação de SDG estimula a osteogênese em ambos os sexos na idade adulta e pode ser responsável pela maioria dos efeitos da linhaça no metabolismo ósseo, especialmente aqueles relacionados às ações de fitoestrógenos, mimetizando os efeitos do estrogênio nos parâmetros ósseos (FIGUEIREDO et al., 2017).

O fitoestrógeno pode ter efeitos bifásicos, dependendo da dose. A daidzeína, por exemplo, que é um dos principais fitoestrógenos da soja, teve efeito bifásico na osteogênese, que em concentrações mais baixas a estimulou, ao passo que em concentrações mais altas, mostrou efeito oposto (DANG & LÖWIK, 2004). Além disso, o ED e EL também possuem efeitos bifásicos na diferenciação de células osteoblásticas, quando em doses menores, podem aumentar a viabilidade celular, a atividade da fosfatase alcalina, o nível transcricional de osteonectina e o colágeno tipo I (FENG; SHI; YE, 2008).

Sacco et al. (2014) demonstraram que a suplementação com linhaça combinada com baixa dose de estrogênio em ratas ovariectomizadas melhora a microarquitetura óssea e protege o tecido ósseo, devido à redução do turnover ósseo. Além disso, Figueiredo et al. (2017) observaram que a ingestão de lignana da linhaça fornecida pra ratas durante a lactação, melhorou os parâmetros ósseos da prole na idade adulta em machos e fêmeas, sugerindo que o SDG dietético pode potencialmente beneficiar o desenvolvimento ósseo. Enquanto Da Costa et al. (2016), demonstraram que filhotes machos desmamados, cujas mães foram tratadas com dieta contendo linhaça durante a lactação, apresentaram aumento do conteúdo

mineral ósseo e da área óssea, maiores concentrações séricas de osteoprotegerina e osteocalcina.

Portanto, mesmo as linhaças não passando pelo processo de germinação, naturalmente já possuem alto teor de compostos capazes de influenciar o metabolismo ósseo, desse modo, os resultados sem diferença estatística que foram encontrados nesse estudo, podem estar relacionados à composição da linhaça, tanto para a germinada quanto para a não germinada.

Destaca-se que a literatura científica é carente em estudos que avaliaram o efeito das linhaças sobre o metabolismo ósseo. No estudo de Aguilar et al. (2017) a suplementação com linhaça, independente da variedade, não teve efeito significativo sobre os biomarcadores de formação óssea e reabsorção em mulheres com excesso de peso na perimenopausa. Por outro lado, Ribeiro et al. (2017) mostraram que a farinha de linhaça contribuiu para o processo de mineralização óssea em ratos, melhorando as propriedades biomecânicas do fêmur e contribuindo com a melhoria da saúde óssea.

4.3.6 Qualidade proteica

A digestibilidade proteica, que se refere ao percentual da proteínas ingerida e efetivamente absorvida pelo trato gastrintestinal, das proteínas vegetais são limitadas por fatores exógenos e endógenos. Os fatores exógenos incluem as interações das proteínas com polifenóis, fitato, carboidratos, lipídios, lectinas e inibidores de proteases. Os fatores endógenos se referem às características estruturais das proteínas, como estrutura terciária e quaternária, sendo que a estrutura terciária das proteínas vegetais é mais complexa que a estrutura de proteínas animais, o que faz com que a sua digestibilidade seja limitada (DUODU et al., 2003).

Com isso, as proteínas de vegetais podem não ser capazes de liberar totalmente os peptídeos com benefícios fisiológicos quando consumidas como sementes cruas. No entanto, a limitada digestibilidade dessas proteínas é melhorada significativamente por meio de métodos não térmicos, como a germinação, que pode ser aplicada em produtos alimentícios, aumentando a digestibilidade e preservando a qualidade de outros compostos presente no alimento (ESTRADA-GIRÓN; SWANSON; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005; MARAMBE; SHAND; WANASUNDARA,

2013). Ghavidel e Prakash (2007) observaram efeito significativo e diretamente proporcional entre germinação e digestibilidade proteica de lentilhas e grão de bico.

Na análise da qualidade proteica, o PER não apresentou diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$), equiparando os grupos linhaças ao grupo controle. A germinação reduziu os valores de NPR, de PER relativo e de NPR relativo das linhaças ($p \leq 0,05$), por outro lado, a germinação não influenciou na DV da linhaça dourada ($p \leq 0,05$), entretanto a germinação da linhaça marrom aumentou a sua DV ($p \leq 0,05$), mas as duas variedades tanto não germinada quanto germinada, foram inferiores ao grupo controle (Figura 7).

A menor qualidade das proteínas poderia ser provocada pela presença de fitato, que se ligam às proteínas diminuindo a suscetibilidade à proteólise (RAMÍREZ-CÁRDENASI; LEONEL; COSTA, 2008), mesmo nas linhaças germinadas, que apesar da redução em comparação com as mesmas não germinadas, ainda apresentavam uma concentração elevada desse antinutriente. Considerando que enzimas digestivas (proteolíticas e amilolíticas) também são proteínas, o fitato podem afetar potencialmente em forma adversa a atividade enzimática por ligação direta (o que provoca a inativação) ou pela precipitação das enzimas. Em qualquer situação, a redução ou perda destas, pode provocar a diminuição da quantidade disponível para digestão de proteínas e amido (RAMÍREZ-CÁRDENASI; LEONEL; COSTA, 2008).

De uma maneira geral, as sementes apresentam digestibilidade proteica relativamente baixa, devido às características estruturais de suas proteínas e a presença de fatores antinutricionais (WANG et al., 2008). Ainda, alguns componentes presentes na linhaça, como os lipídios, podem contribuir para uma menor digestibilidade proteica, devido à formação de lipossomas (WICKHAM; FAULKS; MILLS, 2009). Estudos *in vitro* sugerem que a menor digestibilidade proteica de sementes ocorre devido à presença de globulinas, que são as principais proteínas de reserva destas sementes, e são bastante resistentes ao ataque de enzimas proteolíticas de mamíferos (LI-CHAN & MA, 2002; OOMAH & MAZZA, 1998).

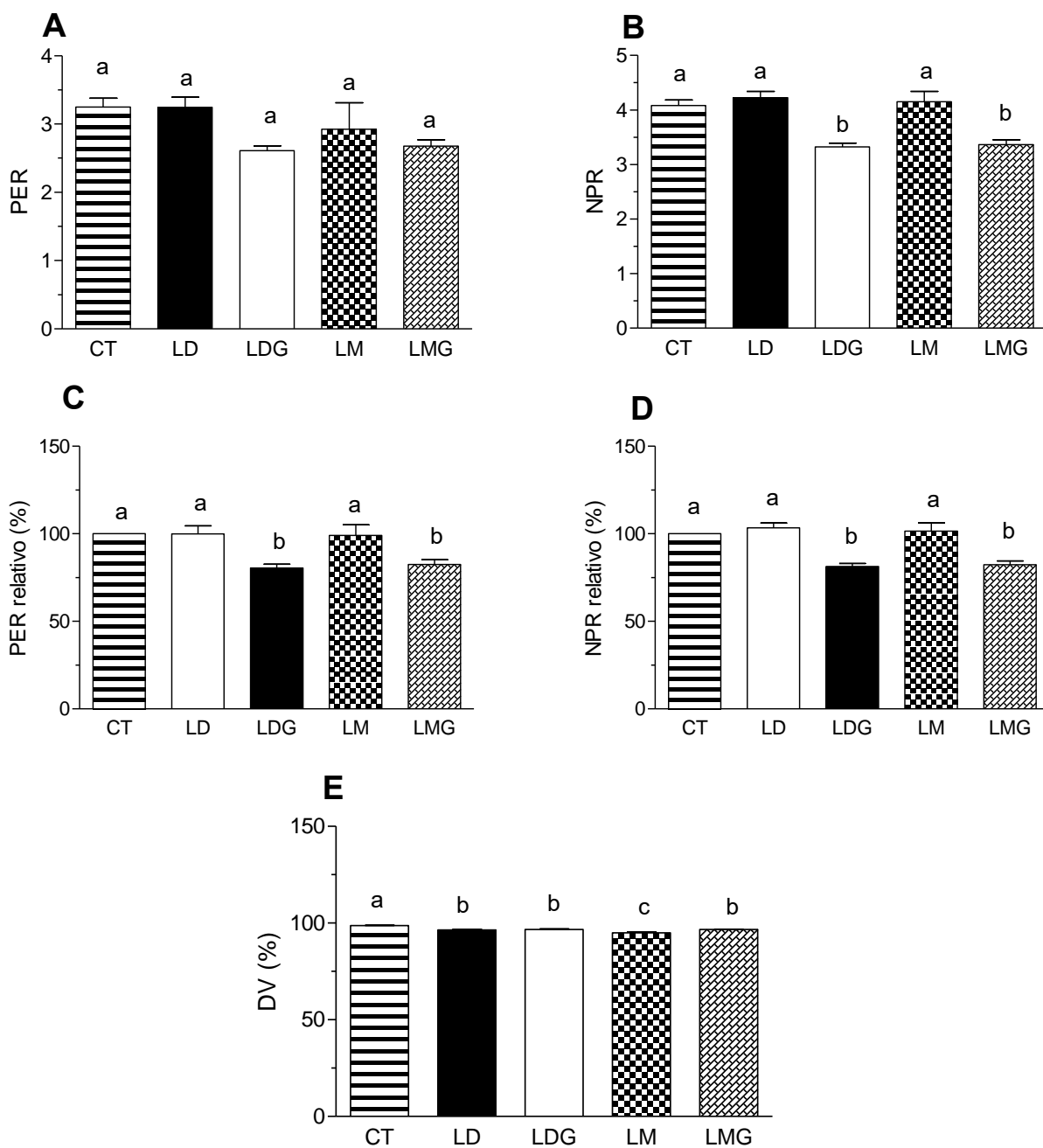


Figura 7. PER (A), NPR (B), PER relativo (C), NPR relativo (D) e DV (E) da análise de qualidade proteica.

PER: Coeficiente de Eficiência Proteica, NPR: Quociente de Eficiência Líquida da Proteína, DV: Digestibilidade Verdadeira. LD: Linhaça Dourada, LDG: Linhaça Dourada Germinada, LM: Linhaça Marrom, LMG: Linhaça Marrom Germinada. Dados expressos em média e desvio padrão. Letras diferentes significam diferença estatística ($p \leq 0,05$) pelo teste ANOVA "one-way" acompanhada pelo teste de Tukey.

4.4 CONCLUSÃO

Este estudo evidenciou que a germinação por 48 horas promoveu melhorias na qualidade nutricional das linhaças. A germinação contribuiu para aumentar a concentração de lipídios e de proteínas e redução nos níveis de carboidratos, fitato e oxalato das linhaças. A variedade dourada apresentou maior teor de proteínas e de cálcio, bem como menores razões molares de fitato:cálcio e oxalato:cálcio.

A bioacessibilidade *in vitro* de cálcio das linhaças germinadas foi superior em comparação às contrapartes não germinadas, sendo que a variedade dourada apresentou maior bioacessibilidade desse mineral, em relação à variedade marrom. A biodisponibilidade *in vivo* de cálcio não promoveu alterações significativas nos marcadores metabólicos, na morfologia e na retenção de cálcio dos fêmures, mas também não diferiram do controle. Ainda, a germinação não foi efetiva em melhorar a qualidade proteica, necessitando de estudos adicionais.

Os benefícios nutricionais promovidos pelo processo germinativo podem levar ao aumento do consumo e da versatilidade dessa semente. Destaca-se que a linhaça marrom possui um menor custo no mercado brasileiro e na maior parte das análises comportou-se de maneira semelhante à variedade dourada, sendo uma boa alternativa para a alimentação humana.

Ressalta-se que a literatura científica carece de estudos sobre a biodisponibilidade de nutrientes da linhaça germinada. Assim, mais estudos devem ser encorajados, em especial aplicando-se técnicas de processamento que possibilitem a melhoria da qualidade nutricional do alimento ou mesmo modulando o tempo de germinação e tempo experimental com os animais.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFIFY, A. E. M. R. et al. Protein solubility, digestibility and fractionation after germination of sorghum varieties. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. 1–6, 2012.

AGARWAL, R. et al. Short-term vitamin D receptor activation increases serum creatinine due to increased production with no effect on the glomerular filtration rate. **Kidney international**, v. 80, n. 10, p. 1073-1079, 2011.

AGUILAR, C. M. et al. Comparative effects of brown and golden flaxseeds on body composition, inflammation and bone remodelling biomarkers in perimenopausal overweight women. **Journal of Functional Foods**, v. 33, n. 2017, p. 166–175, 2017.

AHEARN, T. U. et al. A randomized clinical trial of the effects of supplemental calcium and vitamin D3 on markers of their metabolism in normal mucosa of colorectal adenoma patients. **Cancer Research**, v. 71, n. 2, p. 413–423, 2011.

AHMED, M. B. et al. Proximate composition, antinutritional factors and protein fractions of guar gum seeds as influenced by processing treatments. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 5, n. 5, p. 481-484, 2006.

AMAROWICZ, R.; DYKES, G. A.; PEGG, R. B. Antibacterial activity of tannin constituents from *Phaseolus vulgaris*, *Fagopyrum esculentum*, *Corylus avellana* and *Juglans nigra*. **Fitoterapia**, v. 79, n. 3, p. 217–219, 2008.

AOAC - Association of Official Methods Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association Chemists**. Washington, D.C., 2005.

BALLABRIGA, A. Morphological and physiological changes during growth: an update. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, n. 1, p. 1, 2000.

BARRY, E. L. et al. Calcium supplementation increases blood creatinine concentration in a randomized controlled trial. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. 1080-1094, 2014.

BETSCHKE, T.; FRETZDORFF, B. Biodegradation of oxalic acid from spinach using cereal radicles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 25, p. 9751–9758, 2005.

BOLLAND, M. J. et al. Vascular events in healthy older women receiving calcium supplementation: randomised controlled trial. **Bmj**, v. 336, n. 7638, p. 262-266, 2008.

BOULBAROUD, S. et al. Preventive effects of flaxseed and sesame oil on bone loss in ovariectomized rats. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 13, p. 1696-1701, 2008.

BRUN, L. R.; BRANCE, M. L.; RIGALLI, A. Luminal calcium concentration controls intestinal calcium absorption by modification of intestinal alkaline phosphatase activity. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 2, p. 229-233, 2012.

CARREAU, C. et al. Enterodiol and enterolactone, two major diet-derived polyphenol metabolites have different impact on ER α transcriptional activation in human breast cancer cells. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 110, n. 1-2, p. 176-185, 2008.

CASHMAN, K. D. Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. **British journal of Nutrition**, v. 87, n. 2, p. 169-177, 2002.

CHUNG, M. W. Y.; LEI, B.; LI-CHAN, E. C. Y. Isolation and structural characterization of the major protein fraction from NorMan flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). **Food Chemistry**.v. 90, n. 1-2, p. 271-279, 2005.

COSKUNER, Y.; KARABABA, E. Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). **Journal of Food Engineering**. v. 78, n. 3, p. 1067-1073, 2007.

COUDRAY, C. et al. Stimulatory effect of inulin on intestinal absorption of calcium and magnesium in rats is modulated by dietary calcium intakes: Short- and long-term balance studies. **European Journal of Nutrition**, v. 44, n. 5, p. 293–302, 2005.

DA COSTA, C. A. S. et al. Diet containing low n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids ratio, provided by canola oil, alters body composition and bone quality in young rats. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. 2, p. 191–198, 2012.

DA COSTA, C. A. S. et al. Effects of diet containing flaxseed flour (*Linum usitatissimum*) on body adiposity and bone health in young male rats. **Food & function**, v. 7, n. 2, p. 698-703, 2016.

DABAJA, A. A. et al. The effect of hypogonadism and testosterone-enhancing therapy on alkaline phosphatase and bone mineral density. **BJU international**, v. 115, n. 3, p. 480-485, 2015.

DANG, Z.; LÖWIK, C. W. G. M. The balance between concurrent activation of ERs and PPARs determines daidzein-induced osteogenesis and adipogenesis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19, n. 5, p. 853-861, 2004.

DUODU, K. G. et al. Factors affecting sorghum protein digestibility. **Journal of Cereal Science**, v. 38, n. 2, p. 117–131, 2003.

EGLI, I. et al. The influence of soaking and germination on the phytase activity and phytic acid content of grains and seeds potentially useful for complementary feeding. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 9, p. 3484–3488, 2002.

EKBOTE, V. H. et al. Calcium bioavailability from a fortified cereal-legume snack (laddoo). **Nutrition**, v. 27, n. 7–8, p. 761–765, 2011.

ESTRADA-GIRÓN, Y.; SWANSON, B. G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Advances in the use of high hydrostatic pressure for processing cereal grains and legumes. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 5, p. 194–203, 2005.

FENG, J.; SHI, Z.; YE, Z. Effects of metabolites of the lignans enterolactone and enterodiol on osteoblastic differentiation of MG-63 cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 6, p. 1067-1070, 2008.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, v. 29, n. 11, p. 751–760, 2009.

FIGUEIREDO, M. S. et al. Flaxseed secoisolariciresinol diglucoside (SDG) during lactation improves bone metabolism in offspring at adulthood. **Journal of functional foods**, v. 29, p. 161-171, 2017.

FREDLUND, K. et al. Hydrothermal treatment and malting of barley improved zinc absorption but not calcium absorption in humans. **European journal of clinical nutrition**, v. 57, n. 12, p. 1507, 2003.

GAN, R. et al. Bioactive compounds and bioactivities of germinated edible seeds and sprouts: An updated review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 59, p. 1–14, 2017.

GHANEM, K. Z.; HUSSEIN, L. Calcium bioavailability of selected Egyptian foods with emphasis on the impact of fermentation and germination. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, n. 5, p. 351–356, 1999.

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.

GLAHN, R. P. et al. Caco-2 cell ferritin formation predicts nonradiolabeled food iron availability in an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. **The Journal of nutrition**, v. 128, n. 9, p. 1555–61, 1998.

HAILESLASSIE, H. A.; HENRY, C. J.; TYLER, R. T. Impact of household food processing strategies on antinutrient (phytate, tannin and polyphenol) contents of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and beans (*Phaseolus vulgaris* L.): a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 1947–1957, 2016.

HARO-VICENTE, J. F.; MARTÍNEZ-GRACIÁ, C.; ROS, G. Optimisation of *in vitro* measurement of available iron from different fortificants in citric fruit juices. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 639–648, 2006.

HEMALATHA, S.; PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Zinc and iron contents and their bioaccessibility in cereals and pulses consumed in India. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1328–1336, 2007.

HERCHI, W. et al. Effects of germination on chemical composition and antioxidant activity of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil. **Grasas y Aceites**, v. 66, n. 1, p. 57, 2015.

HOODA, S.; JOOD, S. Effect of soaking and germination on nutrient and antinutrient contents of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.). **Journal of Food Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 165–176, 2003.

HUNG, Y. et al. Serial measurements of serum alkaline phosphatase for early prediction of osteopaenia in preterm infants. **Journal of paediatrics and child health**, v. 47, n. 3, p. 134-139, 2011.

IBGE - Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil**. ISBN 978-85-240-4198-3, Rio de Janeiro, 2011.

IBRAHIM, E. A. Seed priming to alleviate salinity stress in germinating seeds. **Journal of Plant Physiology**, v. 192, p. 38–46, 2016.

IWUOHA, C. I.; KALU, F. A. Calcium oxalate and physico-chemical properties of cocoyam (*Colocasia esculenta* and *Xanthosoma sagittifolium*) tuber flours as affected by processing. **Food Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 61–66, 1995.

JAN, R.; SAXENA, D. C.; SINGH, S. Physico-chemical, textural, sensory and antioxidant characteristics of gluten - Free cookies made from raw and germinated *Chenopodium* (*Chenopodium album*) flour. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 281–287, 2016.

JUNIOR, J. E. R. et al. Alterações de cálcio e fósforo séricos e hiperparatireoidismo na insuficiência renal crônica incidente. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 26, n. 1, 2004.

KAJLA, P. S.; SHARMA, A.; SOOD, D. R. Effect of germination on proximate principles, minerals and antinutrients of flaxseeds. **Asian Journal of Dairy and Food Research**, v. 36, n. 01, p. 52–57, 2017.

KAJLA, P.; SHARMA, A.; SOOD, D. R. Flaxseed - a potential functional food source. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 4, p. 1857–1871, 2015.

KANMAZ, E. Ö.; OVA, G. The effect of germination time on moisture, total fat content and fatty acid composition of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) Sprouts. **GIDA/The Journal of Food**, v. 40, n. 5, p. 249-254, 2015.

KAUSHIK, R. et al. Bioavailability of vitamin D2 and calcium from fortified milk. **Food Chemistry**, v. 147, p. 307–311, 2014.

KHATTAK, A. B. et al. Influence of germination techniques on phytic acid and polyphenols content of chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1074–1079, 2007.

KIM, H. Y. et al. Chemical and functional components in different parts of rough rice (*Oryza sativa* L.) before and after germination. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 288–293, 2012.

KRIS-ETHERTON et al. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **American Journal of Medicine**, v. 113, n., p.71-88, 2002.

KUMAR, B.; VERMA, S. K.; SINGH, H. P. Effect of temperature on seed germination parameters in Kalmegh (*Andrographis paniculata* Wall. ex Nees.). **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1241–1244, 2011.

LATTA, M.; ESKIN, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1313–1315, 1980.

LI-CHAN, E. C. Y.; MA, C. Y. Thermal analysis of flaxseed (*Linum usitatissimum*) proteins by differential scanning calorimetry. **Food Chemistry**, v. 77, n. 4, p. 495–502, 2002.

LIM, E. et al. Smart nanoprobe for the detection of alkaline phosphatase activity during osteoblast differentiation. **Chemical Communications**, v. 51, n. 15, p. 3270–3272, 2015.

LINKIES, A. et al. The evolution of seeds. **New Phytologist**, v. 186, n. 4, p. 817-831, 2010.

LUCAS et al. Flaxseed reduces plasma cholesterol and atherosclerotic lesion formation in ovariectomized Golden Syrian hamsters. **Atherosclerosis**, v. 173, n. 2, p. 223-229, 2004.

MARAMBE, H. K.; SHAND, P. J.; WANASUNDARA, J. P. D. *In vitro* digestibility of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) protein: Effect of seed mucilage, oil and thermal processing. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 3, p. 628–635, 2013.

MASON, A. C. et al. Effect of Soybean Phytate Content on Calcium Bioavailability in Mature and Immature Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 2, p. 246–249, 1993.

MOONGNGARM, A.; SAETUNG, N. Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 782–788, 2010.

NAKANISHI, A.; TSUKAMOTO, I. N-3 polyunsaturated fatty acids stimulate osteoclastogenesis through PPAR γ -mediated enhancement of c-Fos expression and suppress osteoclastogenesis through PPAR γ -dependent inhibition of NF κ B activation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 11, p. 1317–1327, 2015.

OLOYO, R. A. Chemical and nutritional quality changes in germinating seeds of *Cajanus cajan* L. **Food Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 497–502, 2004.

OOMAH, B. D.; MAZZA, G. Compositional changes during commercial processing of flaxseed. **Industrial Crops and Products**, v. 9, n. 1, p. 29–37, 1998.

OOMAH, B. D.; DER, T. J.; GODFREY, D. V. Thermal characteristics of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) proteins. **Food Chemistry**, v. 98, n. 4, p. 733-741, 2006.

PAJAK, P. et al. Antioxidant properties, phenolic and mineral composition of germinated chia, golden flax, evening primrose, phacelia and fenugreek. **Food Chemistry**, v. 275, n. September 2018, p. 69–76, 2019.

PARK, J. et al. Serum alkaline phosphatase is a predictor of mortality, myocardial infarction, or stent thrombosis after implantation of coronary drug-eluting stent. **European heart journal**, v. 34, n. 12, p. 920-931, 2013.

PETERSON, C. A.; EURELL, J. A. C.; ERDMAN, J. W. Bone composition and histology of young growing rats fed diets of varied calcium bioavailability: Spinach, nonfat dry milk, or calcium carbonate added to casein. **Journal of Nutrition**, v. 122, n. 1, p. 137–144, 1992.

PLATEL, K.; EIPESON, S. W.; SRINIVASAN, K. Bioaccessible mineral content of malted finger millet (*Eleusine coracana*), wheat (*Triticum aestivum*), and barley (*Hordeum vulgare*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 8100–8103, 2010.

PRICE, M. L.; SCOYOC, S. V.; BUTLER, L. G. A Critical Evaluation of the Vanillin Reaction as an Assay for Tannin in Sorghum Grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 1214–1218, 1978.

RAHMA, E. H. et al. Effect of soaking process on nutritional quality and protein solubility of some legume seeds. **Food/Nahrung**, v. 44, n. 5, p. 339-343, 2015.

RAMÍREZ-CÁRDENASI, L.; LEONEL, A. J.; COSTA, N. M. B. Efeito do processamento doméstico sobre o teor de nutrientes e de fatores antinutricionais de diferentes cultivares de feijão comum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 200–213, 2008.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **The Journal of nutrition**, v. 127, n. 5, p. 838-841, 1997.

RIBEIRO, D. C. et al. Incorporation of Flaxseed Flour as a Dietary Source for ALA Increases Bone Density and Strength in Post-Partum Female Rats. **Lipids**, v. 52, n. 4, p. 327–333, 2017.

SACCO, S. M. et al. Flaxseed enhances the beneficial effect of low-dose estrogen therapy at reducing bone turnover and preserving bone microarchitecture in ovariectomized rats. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 39, n. 7, p. 801-810, 2014.

SANDHU, V.; KAUR, A.; BHISE, S. Effect of ungerminated and germinated flaxseed addition on the rheological properties of whole wheatmeal and wheat flour. **Carpathian Journal of Food Science & Technology**, v. 9, n. 3, 2017.

SHARMA, S.; SAXENA, D. C.; RIAR, C. S. Analysing the effect of germination on phenolics, dietary fibres, minerals and γ -amino butyric acid contents of barnyard millet (*Echinochloa frumentaceae*). **Food Bioscience**, v. 13, p. 60–68, 2016.

SHIMELIS, E. A.; RAKSHIT, S. K. Effect of processing on antinutrients and *in vitro* protein digestibility of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in East Africa. **Food Chemistry**, v. 103, n. 1, p. 161–172, 2007.

SINGH, A.; SHARMA, S.; SINGH, B.. Effect of germination time and temperature on the functionality and protein solubility of sorghum flour. **Journal of Cereal Science**, v. 76, p. 131–139, 2017.

SUNG, H. G. et al. Effect of germination temperature on characteristics of phytase production from barley. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 11, p. 1297–1303, 2005.

TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Núcleo de Estudos e pesquisas em Alimentação. **Universidade Estadual de Campinas (NEPA – UNICAMP)**. Campinas, 4^a edição revisada e ampliada, 161 páginas, 2011.

TAKO, E.; BAR, H.; GLAHN, R. P. The combined application of the Caco-2 cell bioassay coupled with *in vivo* (*Gallus gallus*) feeding trial represents an effective approach to predicting fe bioavailability in humans. **Nutrients**, v. 8, n. 11, 2016.

TBCA - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. **Universidade de São Paulo (USP)**. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tbca>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2018.

TOURÉ, A.; XUEMING, X. Flaxseed lignans: source, biosynthesis, metabolism, antioxidant activity, bio-active components, and health benefits. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 9, n. 3, p. 261-269, 2010.

TREVINO et al. Protein quality of flaxseed for growing broiler chicks. **Animal Feed Science and Technology**, v. 84, n. 3-4, p. 155-166, 2000.

URBANO, G. et al. Nutritional assessment of raw and germinated pea (*Pisum sativum* L.) protein and carbohydrate by *in vitro* and *in vivo* techniques. **Nutrition**, v. 21, n. 2, p. 230–239, 2005.

USDA - United States Department of Agriculture. **Food Composition Databases**. Disponível em: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>. Acesso em: 21 de abril de 2018.

VAZ-TOSTES, M. G. et al. Evaluation of iron and zinc bioavailability of beans targeted for biofortification using *in vitro* and *in vivo* models and their effect on the nutritional status of preschool children. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 4, p. 1326–1332, 2016.

VIDAL-VALVERDE, C. et al. New functional legume foods by germination: Effect on the nutritive value of beans, lentils and peas. **European Food Research and Technology**, v. 215, n. 6, p. 472–477, 2002.

- VILLENEUVE, S. et al. Effect of a Short-Time Germination Process on the Nutrient Composition, Microbial Counts and Bread-Making Potential of Whole Flaxseed. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 1574–1586, 2015.
- WANASUNDARA, P. K. J. P. D.; WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Changes in flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) seed lipids during germination. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 1, p. 41–48, 1999.
- WANG, Y. et al. Optimization of extrusion of flaxseeds for *in vitro* protein digestibility analysis using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 85, n. 1, p. 59–64, 2008.
- WEAVER, C. M. et al. Absorbability of Calcium from Common Beans. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 6, p. 1401–1403, 1993.
- WEISS, L. A.; BARRETT-CONNOR, E.; VON MÜHLEN, D. Ratio of n-6 to n-3 fatty acids and bone mineral density in older adults: The Rancho Bernardo study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 4, p. 934–938, 2005.
- WICKHAM, M.; FAULKS, R.; MILLS, C. *In vitro* digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 53, n. 8, p. 952–958, 2009.
- WILLIAMS, P. J.; TAYLOR, T. G. A comparative study of phytate hydrolysis in the gastrointestinal tract of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) and the laboratory rat. **British Journal of Nutrition**, v. 54, n. 2, p. 429–435, 1985.
- ZHANG, G. et al. Effects of germination on the nutritional properties, phenolic profiles, and antioxidant activities of buckwheat. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 5, p. 1111–1119, 2015.
- ZHANG, Y. et al. Fructus ligustri lucidi extract improves calcium balance and modulates the calciotropic hormone level and vitamin D-dependent gene expression in aged ovariectomized rats. **Menopause**, v. 15, n. 3, p. 558–565, 2008.

5. CONCLUSÃO GERAL

Diversos estudos mostram que a germinação é um método não térmico eficaz a ser utilizado quando se objetiva melhorar o valor nutricional de sementes. Esse método é capaz de reduzir os níveis de fatores antinutricionais, como fitato, tanino e oxalato, bem como aumentar os valores de minerais, vitaminas e compostos bioativos, melhorando a capacidade antioxidante dessas sementes.

Na linhaça, a germinação foi capaz de melhorar os teores de lipídios e proteínas. Além disso, a germinação reduziu o teor de carboidratos e os níveis dos principais fatores antinutricionais de ambas as sementes, com foco no teor de fitato e oxalato.

Nas linhaças germinadas, a bioacessibilidade *in vitro* de cálcio apresentou valores superiores em comparação com as mesmas não germinadas. Por outro lado, na biodisponibilidade *in vivo* os parâmetros avaliados não diferiram do controle, o que sugere que a linhaça pode ser uma boa fonte de cálcio.

A germinação pode ser aplicada aos mais diversos tipos de cereais, pseudocereais e leguminosas a fim de melhorar sua composição fitoquímica e funções biológicas. Com isso, a germinação pode contribuir de forma positiva para a nutrição e saúde humana.

O interesse nutricional e comercial de sementes germinadas vem crescendo, porém, algumas informações sobre a bioacessibilidade e biodisponibilidade de nutrientes dessas sementes germinadas ainda são escassas. Assim, mais estudos devem ser encorajados para verificar alterações na composição nutricional de sementes, bem como para avaliar seus benefícios na saúde humana.

6. ANEXO A



Universidade Federal
do Espírito Santo



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada *“Estudo in vitro e in vivo da influência da germinação das linhagens marrom e dourada (Linun usitatissimum L.) nas características físico-químicas, na qualidade proteica, no metabolismo ósseo e em marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo”*

Registrada sob o n.º **013/2018**, sob a responsabilidade de **Dr. André Gustavo Vasconcelos Costa**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.167 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CAMPUS DE ALEGRE (CEUA-ALEGRE) do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes), em reunião no dia **16 de abril de 2019**.

Vigência da autorização: **abril/2019 a abril/2020**

Finalidade: **Pesquisa**

Espécie(s): **Rattus norvegicus**

Linhagem(ns)/raça(s): **Wistar**

Peso: **50-60 gramas**

Idade: **21 dias**

Sexo: **Machos**

Número de animais: **88**

Origem: **Biotério Central da Ufes, campus Maruípe, Vitória - ES.**

Alegre-ES,

Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivilin

Coordenador da CEUA-ALEGRE