

Alterações físico-químicas e atividade enzimática de trigo com germinação pré-colheita¹

Physicochemical changes and enzymatic activity of pre-harvest sprouting wheat

Paulo de Tarso Carvalho^{2*} e Adelaide Del Pino Beleia³

RESUMO - O trigo na colheita está exposto a danos por chuva, que podem levar à alteração na qualidade e perda de valor comercial. O objetivo desse trabalho foi caracterizar as alterações de diferentes variedades de trigo da região Sul que sofreram danos por chuva, detectado pelo método de *falling number*. Treze amostras foram avaliadas quanto a peso hectolitro, peso de mil sementes, proteína, açúcares redutores, nitrogênio solúvel, nitrogênio de aminoácidos livres e atividade enzimática (α e β -amilase, β -glucanase e protease). As alterações na fração de gliadina foram avaliadas por eletroforese SDS-PAGE. As variáveis açúcares redutores, nitrogênio solúvel, nitrogênio de aminoácidos livres, atividade de α -amilase, β -glucanase e protease apresentaram correlações significativas com *falling number*. À medida que houve redução do *falling number*, as gliadinas apresentaram alterações nas bandas entre 40 e 30 KDa que ficaram mais intensas.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*. Falling number. Dano por chuva. SDS PAGE.

ABSTRACT - During harvest, wheat is exposed to damage from rain, which may lead to changes in quality and loss of commercial value. The aim of this study was to characterize the changes in different varieties of wheat from the south of Brazil, damaged by rain as detected with the falling number method. Thirteen samples were evaluated for hectoliter weight, thousand-seed weight, protein, reducing sugars, soluble nitrogen, free amino nitrogen and enzyme activity (α and β -amylase, β -glucanase and protease). Changes in the gliadin fraction were evaluated by SDS-PAGE electrophoresis. The variables, reducing sugars, soluble nitrogen, free amino nitrogen, the activity of α -amylase, β -glucanase and protease all showed significant correlation with the falling number test. As the falling number values were reduced, the gliadins displayed changes to the 40 and 30 KDa bands, which become more intense.

Key words: *Triticum aestivum*. Falling number. Rain damage. SDS PAGE.

DOI: 10.5935/1806-6690.20150034

*Autor para correspondência

¹Recebido para publicação em 07/05/2014; aprovado em 22/04/2015

Parte de tese do primeiro autor, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos/Uel-PR

²Departamento de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Av. dos Pioneiros, 3131, Morumbi, Londrina-PR, Brasil, 80.230-901, tarso@utpr.edu.br

³Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil beleia@uel.br

INTRODUÇÃO

Germinação pré-colheita é um importante problema na cultura do trigo em diferentes regiões do mundo, incluindo o Brasil, onde com certa frequência, chuvas no período da colheita causam danos tão severos que acarretam grandes perdas para os produtores rurais. Essas perdas são decorrentes de mudanças nas propriedades físicas, na composição química, no poder germinativo e nas propriedades tecnológicas do trigo (CUNHA; PIRES, 2004). As alterações podem alcançar níveis que levam ao rebaixamento da classificação do trigo, pois segundo a legislação brasileira, o trigo para moagem deve apresentar padrões mínimos para *falling number* (número de queda), força de glúten e estabilidade para classificação como melhorador, pão, doméstico ou básico (BRASIL, 2010).

Embora o problema tenha forte relação com a chuva e alta umidade, o comportamento das diferentes variedades de trigo é distinto, pois é influenciado tanto por fatores climáticos como por fatores anatômicos e genéticos (BARNARD; SMITH, 2009; CUNHA; PIRES, 2004; JIANG; XIAO, 2005). Havendo as condições adequadas, alterações são observadas nos grãos, em virtude principalmente do conjunto enzimático que é ativado pelos mecanismos que regulam o processo de germinação (WOONTON *et al.*, 2005).

Para a identificação da severidade do problema, um dos principais parâmetros utilizados é a análise de *falling number* (FN), um teste que avalia mudanças na fração amilácea do trigo e da farinha em razão do aumento da atividade enzimática e detecta a perda de viscosidade das suspensões. A qualidade de produtos fabricados com farinhas com valores de FN menor que o padrão mínimo (200 s) em comparação com farinhas com mais de 250 s, é prejudicada, sendo que no primeiro caso são observados defeitos como massas difíceis de manusear, volume maior no forno, miolo úmido e pegajoso e células de ar maiores (CUNHA; PIRES, 2004).

O teste de FN, entretanto, não consegue caracterizar todas as demais mudanças sob ação das enzimas que ocorrem na germinação pré-colheita. Tais informações são importantes para uma melhor compreensão a respeito das consequências do dano, para identificar se existem padrões de alterações, bem como, qual o nível de correlação entre as alterações observadas. Além disso, embora os impactos da germinação pré-colheita sobre os cereais tenham sido estudados há várias décadas, a maioria dos estudos utiliza condições simuladas de chuva e avaliam poucos parâmetros.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar diferentes variedades de trigo provenientes de distintas

localidades do Sul do Brasil que sofreram germinação pré-colheita, quanto às suas propriedades físicas, químicas e atividade enzimática.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram obtidas inicialmente vinte amostras de trigo de diferentes variedades e localidades do Paraná e Rio Grande do Sul, todas cultivadas no ano de 2012. Dessas amostras iniciais, treze apresentaram valor de FN menor que 200 s, que caracteriza germinação pré-colheita, e somente essas foram submetidas às demais análises. As amostras coletadas foram secas sob condições naturais e então sub-amostras foram obtidas e mantidas congeladas (-20 °C) até as análises. As análises foram conduzidas na Universidade Estadual de Londrina e no Instituto Agrônomo do Paraná, Londrina.

O método n. 56-81B (AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS, 2000) foi utilizado para determinar o FN em triplicata. O peso de mil sementes (PMS) foi determinado com a metodologia descrita na Regra para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009) e os resultados expressos em gramas. A determinação de peso hectolitro (PH) utilizou balança semi-analítica (GEHAKA, modelo BK 4001 AGRI) com kit apropriado à determinação, seguindo as instruções do fabricante. O teste foi realizado em triplicata e os resultados expressos em kg hL⁻¹.

As análises de composição química foram realizadas em triplicata. A determinação de proteínas e nitrogênio total (% base seca e mg/100g grão base seca) utilizou o método de micro Kjeldahl, método 46-12, (N x 5,7) (AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS, 2000). Açúcares redutores (g/100g) foram analisados pelo método de Somogy-Nelson (MALDONADE *et al.*, 2013).

Nitrogênio de aminoácidos livres (mg/grama de grão) e nitrogênio solúvel (mg/grama de grão) utilizaram os métodos 4.10 e 4.9.1 da EBC (European Brewery Convention) (EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 2005), sendo os extratos obtidos em triplicata e as determinações realizadas em duplicata para cada extrato.

Na determinação de α -amilase, β -amilase e β -glucanases utilizaram-se kits enzimáticos Ceralpha, Betamyl-3 e Azo-Barley-glucan (Megazyme, Irlanda), respectivamente. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos nas unidades indicadas pelo fabricante.

A atividade de protease seguiu o método descrito por Sarath, De La Motte e Wagner (1989) com algumas modificações. O extrato foi obtido de 1 g de trigo moído,

peneirado (20 mesh) adicionado de 5 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5. O material foi homogeneizado em *shaker* refrigerado (4 °C, 2 horas). A suspensão foi centrifugada (15 min., 8.000 x g, 4 °C), e o sobrenadante separado e mantido congelado (-20 °C) até o momento da determinação.

A atividade das proteases utilizou 250 µL de solução de azocaseína (2,5% em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5) pré-aquecida a 35 °C e colocada em tubo de microcentrífuga. Ao substrato adicionou-se 150 µL do extrato enzimático pré-aquecido (35 °C), e se incubou por 30 minutos a 35 °C. A reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de solução de ácido tricloroacético 10%, o material foi centrifugado (14.000 x g, 8 min.) e do sobrenadante, tomou-se 1,2 mL em um tubo de ensaio que continha 1,4 mL de NaOH 1M e determinada a absorbância a 440 nm em espectrofotômetro (Biochrom, modelo Libra S22). Os extratos foram realizados em triplicata e as análises em duplicata. Uma unidade de atividade proteolítica correspondia à quantidade de enzima necessária para promover a mudança em uma unidade de absorbância.

As alterações das gliadinas foram determinadas por eletroforese em sistema SDS-PAGE, segundo Peña, González e Cervantes (2004) com algumas modificações. Cerca de 200 mg de trigo moído (20 mesh) foram pesados em béquer e adicionados 7,5 mL de propanol 50% (v/v). O material ficou em banho com agitação a 65 °C por 30 minutos e depois centrifugado por 2 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi separado e o precipitado ressuspenso e repetido o procedimento. O sobrenadante foi mantido em estufa com circulação de ar a 90 °C por 5 horas para concentração. Após este período foram adicionados 3 mL de solução TRIS contendo 2% de SDS (m/v), 40% de glicerol (m/v), e 0,02% (m/v) de Azul de Coomassie Brilhante.

Foram aplicados 10 µL de extrato em géis de poliacrilamida no sistema SDS-PAGE. O gel de corrida continha solução TRIS com pH 8,5, concentração de acrilamida de 15% e 0,48% de bis-acrilamida; 0,1% de SDS, 0,11% de TEMED (N, N, N', N'-Tetrametiletilenodiamina) e 0,04 % de persulfato de sódio. O gel de concentração continha 4% de acrilamida e 0,13% de bis-acrilamida; 0,1% de SDS, 0,04% de TEMED e 0,04 % de persulfato de sódio, água destilada e solução TRIS de pH 6,8. A solução tampão do tanque continha 3% de Trisma, 14,4% de glicina, 1% de SDS, com pH 8,3. A eletroforese foi conduzida em 11 mA com polaridade normal (Loccus Biotecnologia, modelo LPS-300 V). Ao final da corrida, os géis foram fixados e corados em uma mistura (4:1) de solução de TCA 5% e solução de Azul de Coomassie 0,1% e descoloridos em água destilada.

As análises obedeceram a um delineamento inteiramente casualizado, sendo as diferentes amostras as variáveis independentes. Os dados foram submetidos

à análise de variância (ANOVA) e quando identificada diferença significativa, o Teste de Tukey em nível de 1% foi utilizado para comparação entre as médias. Foi determinado o coeficiente de correlação de Pearson entre todas as variáveis repostas. O software Statistica 5.0 (StatSoft) foi utilizado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram intencionalmente dispostos em ordem decrescente de FN (Tabela 1). Todas as amostras apresentaram valores de FN menor que o padrão mínimo exigido pela legislação brasileira (200 s) (BRASIL, 2010) que indica germinação pré-colheita (CUNHA; PIRES, 2004), mas com grande variação, de 180 a 62 s. Segundo Mares e Mrva (2008), o FN é influenciado tanto pelas condições ambientais como pelo genótipo, e como as amostras foram provenientes do campo, as condições são muito variáveis e não controladas. Além disso, a resposta da planta ao ambiente varia em função da dormência da semente (regulada geneticamente) e de aspectos anatômicos (CUNHA; PIRES, 2004). Ao estudar tolerância à germinação pré-colheita, pesquisadores verificaram diferenças quanto ao resultado de FN tanto para variedades distintas plantadas no mesmo ano e local como também para a mesma variedade plantada no mesmo local, porém em anos diferentes (BIDDULPH *et al.*, 2008). No Brasil, tal comportamento já foi observado, demonstrando que variedades diferentes plantadas no mesmo local e colhidas na mesma época apresentaram valores diversos de FN (FELÍCIO *et al.*, 2002).

Sete amostras que apresentaram FN menor que 200 s tiveram PH menor que 72, o mínimo exigido para trigo para moagem, mas as outras variaram entre 73 e 78. O peso hectolitro teve coeficiente de correlação com o FN significativo ($r = 0,52$) (Tabela 4), e maior do que o valor encontrado por Dick, Walsh e Gilles (1974) ($r = 0,19$), que estudaram sete variedades de trigo *durum* e promoveram artificialmente a germinação. O aumento da atividade enzimática estimulada durante a germinação pré-colheita, acelera o metabolismo e promove a perda de matéria seca nos grãos. Às vezes a redução na matéria-seca não pode ser constatada no PH, mas já ocorreram alterações devido a atividade enzimática, capazes de provocar reduções nos valores de FN (MARES; MRVA, 2008). Isso possivelmente explica o fato de que mesmo tendo sofrido dano por chuva e tendo FN menor que 200 s algumas amostras apresentaram PH acima de 72.

O peso de mil sementes (PMS) não teve correlação significativa com o FN ($r = 0,06$) (Tabela 4), assim como ocorreu no estudo de Dick, Walsh e Gilles (1974). O PMS foi a variável que apresentou menor correlação com as demais variáveis (Tabela 4) e os valores variaram de 38,2 a 22,4 g,

típico de grãos considerados médios a muito pequenos (GUARIENTI, 1996). Estudo com 20 variedades de trigo no Rio Grande do Sul durante dois anos demonstrou que no ano de maior índice pluviométrico na fase de maturação dos grãos, 80% das amostras apresentaram redução de no máximo 20% do PMS, em relação ao ano de menor índice pluviométrico. Os valores variaram de 24,5 a 37 g para PMS (WENDT; CAETANO; NUNES, 2007).

Quanto às proteínas, os teores encontrados foram de 13,2 a 17,1% (Tabela 1), similares aos pesquisados por Vázquez *et al.* (2012) em amplo estudo na América Latina (23 genótipos) que encontraram valores de até 16,1%. Além disso, o processo de germinação estimulado pela chuva pode levar ao aumento na concentração de proteínas devido à perda de matéria seca que ocorre em grãos durante a germinação, em função do consumo de reservas principalmente de carboidratos (CUNHA; PIRES, 2004). Tian *et al.* (2010) maltearam aveia a 16 °C por 144 horas e observaram que os teores de proteína foram de 18,98% em grãos intactos e 22,02% nos grãos malteados.

Os menores percentuais de nitrogênio de aminoácidos livres e nitrogênio solúvel correspondem àquelas amostras com maiores valores de FN, numa relação inversa (Tabela 2). Quanto à variabilidade dessas alterações, nos estudos de Jin, Zhang e Du (2008) com maltes de trigo, os valores foram de 81,3 a 101,6 mg/100g de nitrogênio de aminoácidos livres, semelhantes aos observados nos dados desta pesquisa (de 54 a 157 mg/100g). Isso demonstra

que os trigos analisados tiveram a fração protéica alterada aos níveis de trigos submetidos à maltagem (germinação controlada). Os valores determinados neste trabalho são para extração a 45 °C, simulando um processo de mosturação e segundo Osman *et al.* (2002) menores teores ocorreriam em extração a frio (0 °C) ou em temperatura ambiente. Outros cereais também apresentam esse comportamento quando germinados, com aumento da atividade proteolítica e dos produtos da hidrólise, como observado em aveia (TIAN *et al.*, 2010).

Os resultados para nitrogênio solúvel e nitrogênio de aminoácidos livres tiveram a maior correlação entre si ($r = 0,93$) (Tabela 4) entre os parâmetros analisados. Além disso, o aumento em nitrogênio solúvel explica 86% ($r^2 =$ coeficiente de determinação) do aumento em nitrogênio de aminoácidos livres. Osman *et al.* (2002) em avaliação de atividade de endoproteases de maltes de cevada, independente da temperatura de obtenção do extrato, encontraram semelhante relação. A concentração de nitrogênio de aminoácidos livres é menor que a concentração de nitrogênio solúvel, pois as endoproteases hidrolisam as proteínas de reserva do endosperma primeiramente em peptídeos e na sequência carboxipeptidases e aminopeptidases completam a hidrólise em aminoácidos livres (JONES, 2005). O nitrogênio solúvel correspondeu entre 21,8 a 50,2% do total de nitrogênio proteico presente nos grãos (Tabela 2).

Os açúcares redutores (Tabela 2) aumentaram com a diminuição do FN ($r = -0,81$) (Tabela 4). A perda

Tabela 1 - Valores de *falling number* (FN), peso hectolitro (PH), peso de mil sementes (PMS), proteína para amostras de trigo (*Triticum aestivum*) de diferentes variedades e localidades que sofreram germinação pré-colheita

Amostra	FN (s)	PH (kg hL ⁻¹)	PMS (g)	Proteína (% b.s.)
Pardela-Mariópolis (PR)	180 ± 2 a	70 ± 0 e	25,45 ± 0,07 d	15,4 ± 0,0 c,d,e
CD 150-Mariópolis (PR)	163 ± 1 b	76 ± 0 b,c	25,51 ± 0,09 d	16,9 ± 0,1 a,b
CD 150-Honório Serpa (PR)	155 ± 3 b	76 ± 0 b,c	27,85 ± 0,08 c	16,0 ± 0,0 b,c,d
Cristalino-Mariópolis (PR)	129 ± 3 c	78 ± 0 a	19,46 ± 0,07 f	16,8 ± 0,1 a,b
CD 150-Coronel Vivida (PR)	123 ± 5 c	76 ± 0 b,c	26,27 ± 0,09 d	15,3 ± 0,1 c,d,e
Mirante-Mariópolis (PR)	106 ± 2 d	69 ± 0 e	23,75 ± 0,07 e	13,2 ± 0,0 g
Mirante-Pato Branco (PR)	80 ± 3 e	77 ± 0 a,b	32,77 ± 0,12 a	15,0 ± 0,0 d,e,f
Quartzo-Erechim (RS)	78 ± 3 e,f	62 ± 1 g	30,42 ± 0,07 b	17,8 ± 0,1 a
Pardela-Coronel Vivida (PR)	76 ± 3 e,f,g	63 ± 1 g	19,41 ± 0,04 g	16,6 ± 0,2 a,b,c
Pardela-Honório Serpa (PR)	71 ± 3 e,f,g	69 ± 0 e	30,93 ± 0,06 b	17,1 ± 0,1 a,b
Guamirim-Cruz Alta (RS)	64 ± 0 f,g	66 ± 0 f	20,62 ± 0,07 f	14,6 ± 0,0 e,f
Guamirim-Ijuí (RS)	62 ± 0 g	73 ± 1 d	19,55 ± 0,07 f	14,3 ± 0,0 e,f,g
Marfim-Mariópolis (PR)	62 ± 0 g	54 ± 1 h	16,27 ± 0,05 g	13,7 ± 0,0 f,g
F	651,6**	475,1**	336,3**	28,9**

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade; **Significativo ao nível de 1%

Tabela 2 - Valores de nitrogênio total, nitrogênio solúvel, nitrogênio de aminoácidos livres e açúcares redutores de amostras de trigo (*Triticum aestivum*) de diferentes variedades e localidades que sofreram germinação pré-colheita

Amostras ⁽¹⁾	Nitrogênio total (mg/g grão b.s.)	Nitrogênio solúvel (mg/g grão b.s.)	Nitrogênio de aminoácidos livres (mg/g grão b.s.)	Açúcares redutores (g/100g b.s.)
Pardela-Mariópolis(PR)	26,9 ± 0,4 c,d,e	7,3 ± 0,5 d,e	0,61 ± 0,01 f	0,20 ± 0,00 f
CD 150-Mariópolis(PR)	29,6 ± 0,5 a,b	6,4 ± 0,2 e	0,57 ± 0,02 f,g	0,20 ± 0,01 f
CD 150-Honório Serpa(PR)	28,1 ± 0,4 b,c,d	6,9 ± 0,2 d,e	0,58 ± 0,01 f,g	0,23 ± 0,00 f
Cristalino-Mariópolis(PR)	29,4 ± 0,8 a,b	6,5 ± 0,3 e	0,56 ± 0,03 f,g	0,19 ± 0,01 f
CD 150-Coronel Vivida(PR)	26,8 ± 1,2 c,d,e	6,2 ± 0,3 e	0,54 ± 0,00 g	0,29 ± 0,02 d,e
Mirante-Mariópolis(PR)	23,1 ± 0,3 g	9,1 ± 0,3 c	0,82 ± 0,00 d	0,29 ± 0,01 e
Mirante-Pato Branco(PR)	26,4 ± 0,1 d,e,f	7,3 ± 0,4 d,e	0,68 ± 0,01 e	0,29 ± 0,01 e
Quartzo-Erechim(RS)	31,3 ± 0,4 a	7,9 ± 0,2 d	0,88 ± 0,01 d	0,45 ± 0,02 c
Pardela-Coronel Vivida(PR)	29,2 ± 1,5 a,b,c	10,7 ± 0,3 b	1,25 ± 0,01 c	0,33 ± 0,01 d,e
Pardela-Honório Serpa(PR)	30,1 ± 0,8 a,b	7,1 ± 0,5 d,e	0,60 ± 0,03 f,g	0,34 ± 0,02 d
Guamirim-Cruz Alta(RS)	25,6 ± 0,0 e,f	9,9 ± 0,2 c	0,70 ± 0,00 e	0,51 ± 0,01 b
Guamirim-Ijuí(RS)	25,1 ± 0,3 e,f,g	11,9 ± 0,2 a,b	1,46 ± 0,02 b	0,52 ± 0,02 b
Marfim-Mariópolis (PR)	24,1 ± 0,4 f,g	12,1 ± 0,2 a	1,57 ± 0,05 a	0,62 ± 0,02 a
F	26,98**	75,5**	638,7**	147,9**

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade; ⁽¹⁾As amostras estão dispostas em ordem decrescente de *falling number*; **Significativo ao nível de 1%

de viscosidade, detectada pelo FN indica hidrólise prévia dos polímeros que compõem o amido e consequente aumento de açúcares. Da Silva *et al.* (2008) em estudo de germinação de trigo em *stress* salino a 25 °C, constataram que nas sementes germinadas sem solução de NaCl, os teores de açúcares redutores nas duas variedades estudadas aumentaram de 0,2 mg/g para 0,55 mg/g no oitavo dia. Em trigo malteado por 24 horas a 30 °C, foi constatado aumento de até 6 vezes na concentração de açúcares livres (SUHASINI; MURALIKRISHNA; MALLESHI, 1997) e, em aveia, houve incremento da concentração de açúcares nas primeiras 48 horas de germinação a 16 °C, em função da atividade das amilases sobre o amido (TIAN *et al.*, 2010).

À medida que houve redução nos valores de FN, houve uma tendência de aumento da atividade da α -amilase (Tabela 3) tendo sido encontrado coeficiente de correlação negativo ($r = -0,80$) (Tabela 4) que explica 64% da redução do FN. Entretanto, a relação entre FN, α -amilase e germinação pré-colheita ainda não está completamente elucidada. Em 77 amostras de trigo da Bélgica, foi observado que aquelas com atividade de α -amilase entre 0 e 1 UC/g, o FN variou de 150 a 450 s; assim como amostras que apresentaram FN abaixo de 150 s, apresentaram atividade de α -amilase variando de 0,5 a 6,5 UC/g. No mesmo trabalho, variação semelhante foi observada com relação a

atividade enzimática e o pico de viscosidade medido com viscoamílografo Brabender (LENARTZ *et al.*, 2002). Henry, Martin e Blakeney (1987) utilizaram o método *Phadebas* e ao estudarem três variedades de trigo encontraram correlação ($r = 0,99$), afirmando que atividades da ordem de 10-20 mU/g eram capazes de reduzir o FN.

Entre as enzimas analisadas, a β -amilase (Tabela 3) foi a que apresentou o menor coeficiente de correlação com o FN ($r = -0,04$) (Tabela 4), o que já havia sido indicado por Perten (1984). Os resultados encontrados foram de 86,2 a 201,7 UB/g, a menor variação encontrada para as enzimas estudadas. Estudo de caracterização enzimática com 59 genótipos de diferentes espécies e subespécies de trigo em duas safras, os autores encontraram um CV% de 30% para a atividade de β -amilase (HIDALGO *et al.*, 2013). Em aveia e cevada malteadas em condições de temperatura que variaram de 10 a 20 °C e períodos de germinação de 48 a 144 horas, a atividade de β -amilase pouco variou (HÜBNER *et al.*, 2010). Tal comportamento pode ser explicado, em parte, porque a β -amilase ocorre na forma livre ou ligada (WU *et al.*, 2011) e necessita da ação de enzimas proteolíticas para ativá-la.

As β -glucanases (Tabela 3) apresentaram coeficiente de correlação negativo com o FN ($r = -0,71$) (Tabela 4), pois há aumento na atividade enzimática durante a germinação. Em cevada malteada a 15 °C e utilizando o kit *Azo-Barley-glucan* (Megazyme), os valores iniciais foram de 0,2 U/g no grão intacto e

alcançou 1,1 U/g em uma das variedades estudada depois da maltagem (MAYOLLE *et al.*, 2012). A absorção de água e a difusão têm influencia na taxa de migração das enzimas que degradam as paredes celulares (MAYOLLE *et al.*, 2012), e a chuva com o grão no ponto de colheita oferece esta condição. A β -glucanase é uma das primeiras enzimas a apresentar aumento de atividade durante a germinação da cevada (KUNTZ; BAMFORTH, 2007) e

a ativação reduz a viscosidade de pastas (WOOD, 2007), o que é detectado no teste de FN e explica a correlação encontrada. A atividade de β -glucanase teve correlação de $r=0,69$ (Tabela 4), com açúcares redutores, pois a hidrólise das β -glucanas gera terminais redutores (JOHANSSON *et al.*, 2006). As variações entre as diferentes amostras já foram observadas em outro estudo, já que a atividade da β -glucanase varia com a fonte (HÜBNER *et al.*, 2010).

Tabela 3 - Atividade enzimática de α -amilase, β -amilase, β -glucanase e protease para amostras de trigo (*Triticum aestivum*) de diferentes variedades e localidades que sofreram germinação pré-colheita

Amostras ⁽¹⁾	α -amilase ⁽²⁾ (UC/g)	β -amilase ⁽³⁾ (UB/g)	β -glucanase (U/kg grão)	Protease (U atividade/g grão)
Pardela-Mariópolis(PR)	25,3 \pm 1,8 h	172,8 \pm 3,4 b	18,1 \pm 1,3 h	0,029 \pm 0,002 e
CD 150-Mariópolis(PR)	35,6 \pm 3,2 g,h	151,7 \pm 3,5 c	32,8 \pm 1,8 g	0,043 \pm 0,001 c,d
CD 150-Honório Serpa(PR)	50,5 \pm 0,6 e,f,g	173,3 \pm 10,0 b	29,1 \pm 1,8 g	0,034 \pm 0,002 e
Cristalino-Mariópolis(PR)	45,8 \pm 2,7 e,f,g	123,2 \pm 3,1 d	36,7 \pm 0,3 g	0,037 \pm 0,002 d,e
CD 150-Coronel Vivida(PR)	43,6 \pm 1,8 f,g	124,5 \pm 2,8 d	47,7 \pm 1,4 f	0,049 \pm 0,002 c
Mirante-Mariópolis(PR)	91,1 \pm 4,5 d	199,6 \pm 12,5 a	72,4 \pm 0,4 e	0,045 \pm 0,004 c,d
Mirante-Pato Branco(PR)	56,4 \pm 2,7 e,f	190,1 \pm 2,5 a,b	94,1 \pm 2,5 c	0,046 \pm 0,004 c
Quartzo-Erechim(RS)	59,2 \pm 2,7 e	188,2 \pm 5,3 a,b	31,6 \pm 2,1 g	0,046 \pm 0,003 c
Pardela-Coronel Vivida(PR)	119,9 \pm 6,8 b,c	186,1 \pm 9,4 a,b	82,4 \pm 4,0 d	0,058 \pm 0,003 b
Pardela-Honório Serpa(PR)	121,5 \pm 4,8 b	86,2 \pm 4,3 e	118,6 \pm 3,5 b	0,043 \pm 0,001 c,d
Guamirim-Cruz Alta(RS)	155,8 \pm 6,1 a	201,7 \pm 4,4 a	70,7 \pm 3,2 e	0,075 \pm 0,002 a
Guamirim-Ijuí(RS)	117,7 \pm 6,6 b,c	146,8 \pm 4,1 c	90,7 \pm 1,4 c,d	0,058 \pm 0,001 b
Marfim-Mariópolis(PR)	104,9 \pm 4,6 c,d	150,3 \pm 2,7 c	187,7 \pm 3,8 a	0,072 \pm 0,004 a
F	108,7**	119,8**	691,3**	74,1**

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. (1) As amostras estão dispostas em ordem decrescente de *falling number*. (2) Unidade Ceralpha. (3) Unidade Betamyl. **Significativo ao nível de 1%

Tabela 4 - Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis⁽¹⁾ estudadas em variedades de trigos que sofreram germinação pré-colheita (* p<0,05; ** p<0,01)

	FN	PH	PMS	P	NS	NAL	AR	α A	β A	β G	PT
FN	-	0,52**	0,06 ^{ns}	0,20*	-0,64**	-0,61**	-0,81**	-0,80**	-0,04 ^{ns}	-0,72**	-0,74**
PH	-	-	0,06 ^{ns}	0,16 ^{ns}	-0,66**	-0,64**	-0,72**	-0,50**	-0,24 ^{ns}	-0,58**	-0,62**
PMS	-	-	-	-0,02 ^{ns}	-0,07 ^{ns}	0,01 ^{ns}	-0,20 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	-0,36*	0,25 ^{ns}	0,16 ^{ns}
P	-	-	-	-	-0,52**	-0,38*	-0,37*	-0,29 ^{ns}	-0,31 ^{ns}	-0,42**	-0,41*
NS	-	-	-	-	-	0,93**	0,77**	0,67**	0,26 ^{ns}	0,65**	0,68**
NAL	-	-	-	-	-	-	0,74**	0,50**	0,14 ^{ns}	0,66**	0,59**
AR	-	-	-	-	-	-	-	0,69**	0,11 ^{ns}	0,69**	0,83**
α A	-	-	-	-	-	-	-	-	0,07 ^{ns}	0,61**	0,75**
β A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,19 ^{ns}	0,20 ^{ns}
β G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,65**
PT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

⁽¹⁾Variáveis: FN-falling number, PH-peso hectolitro, PMS-peso de mil sementes, P-proteína, NS-nitrogenio solúvel, NAL-nitrogenio de aminoácidos livres, AR-açúcares redutores, α A-atividade de α -amilase, β A-atividade de β -amilase, β G-atividade de β -glucanase, PT-atividade de protease

A atividade das proteases (Tabela 3) aumentou com a redução do FN ($r = -0,74$) (Tabela 4) porque a atividade proteolítica pode ser incrementada durante o período inicial do processo germinativo. Em trabalho avaliando proteases em variedades de trigo, Edwards *et al.* (1989) submetem espigas de trigo à chuva em um simulador e depois de observarem sinais visíveis de germinação, constataram que em 40% das variedades estudadas, a atividade das proteases reduziu em comparação com os grãos não germinados. Em maltagem de sorgo a 25 °C por 6 dias, a atividade proteolítica, depois de um pico, apresentou no sexto dia de germinação a mesma atividade do primeiro (EVANS; TAYLOR, 1990). A extração das proteases foi realizada em uma única etapa em nosso trabalho, enquanto estudos com sorgo indicaram que a atividade de uma única extração era menor que a atividade total (EVANS; TAYLOR, 1990).

A atividade proteolítica foi analisada em eletroforese (Figura 1) onde é nítido que as frações entre 40 e 30 KDa aumentam de intensidade a medida que há redução do valor de FN. As amostras com valores de FN menores que 100 s (amostras 16; 23; 20; 4; 21; 22 e 7) apresentaram um maior número de bandas intermediárias entre 70 e 40 Kda. (Tabela 4). A amostra quatro apresenta também uma banda próxima a 20 KDa de baixa intensidade. Pesquisa sobre hidrólise de gliadina durante a germinação de trigo constatou que utilizando gliadina como substrato com incubação a 30 °C por 1

hora com proteases, houve a formação de peptídeos menores e completa redução das frações com mais de 43 KDa (BOTTARI *et al.*, 1996). Também Mokhawa, Kerapeletswe-Kruger e Ezeogu (2013) em análise de SDS-PAGE de proteínas de sorgo, observaram que depois da maltagem a 30 °C, oito variedades estudadas apresentaram quase completa digestão das bandas com mais de 30 KDa. Neste trabalho, as amostras foram coletadas do campo e não foram submetidas a condições controladas e nenhuma apresentava indícios externos evidentes do processo de germinação. Do ponto de vista tecnológico essas informações são importantes, pois as gliadinas exercem papel fundamental nas propriedades de massas alimentícias.

CONCLUSÕES

As amostras colhidas e selecionadas apresentaram redução dos valores de *falling number* acompanhada por aumento da concentração de açúcares redutores, de nitrogênio solúvel e de nitrogênio de aminoácidos livres. Tais mudanças estavam relacionadas com o incremento da atividade enzimática sobre carboidratos estruturais e de reserva e sobre proteínas de reserva que foram constatadas neste trabalho. Parâmetros como peso hectolitro e peso de mil sementes não servem como indicativo da ocorrência de germinação pré-colheita.

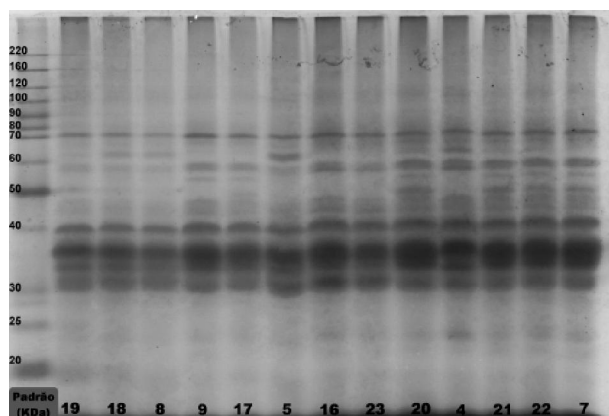
AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa de doutorado concedida ao primeiro autor. Às empresas COOPERATIVA BATAVO, BUNGE, CAMISC, COAMO, COOPERATIVA TRADIÇÃO, COTRIJUC, COTRISA, COTRIJUÍ, MOINHO TRADIÇÃO que forneceram as amostras de trigo.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. **Approved methods of the American Association of Cereal Chemists**, 10 ed., v 1 e 2. St. Paul: AACC, 2000, v 1,2.
- BARNARD, A.; SMITH, M. F. The effect of rainfall and temperature on the preharvest sprouting tolerance of winter wheat in the dryland production areas of the Free State Province. **Field Crops Research**, v. 112, n. 2/3, p. 158-164, 2009.
- BIDDULPH, T. B. *et al.* Seasonal conditions influence dormancy and preharvest sprouting tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) in the field. **Field Crops Research**, v. 107, n. 2, p. 116-128, 2008.

Figura 1 - Gel de eletroforese SDS-PAGE de gliadinas de amostras de trigo (*Triticum aestivum*) de diferentes variedades e localidades que sofreram germinação pré-colheita*



*As amostras estão dispostas do maior (esquerda) para o menor *falling number* (direita). Amostras: 19-Pardela-Mariópolis; 18-CD 150-Mariópolis; 8-CD 150-Honório Serpa; 9-Cristalino-Mariópolis; 17-CD-150-Coronel Vivida; 5-Mirante-Mariópolis; 16-Mirante-Pato Branco; 23-Quartzo-Erechim; 20-Pardela-Coronel Vivida; 4-Pardela-Honório Serpa; 21-Guamirim-Cruz Alta; 22-Guamirim-Ijuí; 7-Marfim-Mariópolis

- BOTTARI, A. *et al.* Major proteinase hydrolysing gliadin during wheat germination. **Phytochemistry**, v. 43, n. 1, p. 39-44, 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 38 de 30 de novembro de 2010. Regulamento Técnico do Trigo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, n. 29, Brasília, DF, 01 dez 2010. Seção 1. p. 2.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regra para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.
- CUNHA, G. R.; PIRES, J. L. F. **Germinação pré-colheita em trigo**. Passo Fundo: Embrapa, 2004. 320 p.
- DA SILVA, R. N. *et al.* Composição química de sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) submetidas a estresse salino na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 1, p. 215-220, 2008.
- DICK, J. D.; WALSH, D. E.; GILLES, K. A. The effect of field sprouting on the quality of durum wheat. **Cereal Chemistry**, v. 51, p. 180-188, 1974.
- EUROPEAN BREWERY CONVENTION. **Analytica EBC**. Nürnberg: Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag, 2005.
- EDWARDS, R. A. *et al.* Enzymes from rain-damaged and laboratory germinated wheat I. Effects on product quality. **Journal of Cereal Science**, v. 10, n. 2, p. 157-167, 1989.
- EVANS, D. J.; TAYLOR, J. R. N. Influence of cultivar and germination conditions on proteolytic activities in sorghum malt. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 96, n. 6, p. 399-402, 1990.
- FELÍCIO, J. C. *et al.* Rendimento e processo germinativo do grão na espiga de genótipos de trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 3, p. 289-294, 2002.
- GUARIENTI, E. M. **Qualidade industrial do trigo**. Passo Fundo: Embrapa, 1996. 36 p.
- HENRY, R. J.; MARTIN, D. J.; BLAKENEY. Reduction of the α -amylase content of sprouted wheat by pearling and milling. **Journal of Cereal Science**, v. 5, n. 2, p. 155-166, 1987.
- HIDALGO, A. *et al.* Polyphenol oxidase, alpha-amylase and beta-amylase activities of *Triticum monococcum*, *Triticum turgidum* and *Triticum aestivum*: a two-year study. **Journal of Cereal Science**, v. 58, n. 1, p. 51-58, 2013.
- HÜBNER, F. *et al.* The influence of germination conditions on beta-glucan, dietary fibre and phytate during the germination of oats and barley. **European Food Research Technology**, v. 231, n. 1, p. 27-35, 2010.
- JIANG, G. L.; XIAO, S. Factorial cross analysis of pre-harvest sprouting resistance in white wheat. **Field Crops Research**, v. 91, n. 1, p. 63-69, 2005.
- JOHANSSON, L. *et al.* Hydrolysis of β -glucan. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 71-79, 2006.
- JONES, B. L. Endoproteases of barley and malt. **Journal of Cereal Science**, v. 42, n. 2, p. 139-156, 2005.
- JIN, Y.; ZHANG, K.; DU, J. Effects of wheat protein content on endosperm composites and malt quality. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, n. 4, p. 289-293, 2008.
- KUNTZ, R. J.; BAMFORTH, C. W. Time course for the development of enzymes in barley. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 113, n. 2, p. 196-205, 2007.
- LENARTZ, J. *et al.* Is the Hagberg falling number always linked to the α -amylase activity of wheat? In: COURTIN, C. M.; VERAVERBEKE, W. S.; DELCOUR, J. A. **Recent advances in enzymes in grains processing**. Leuven: Laboratory of Food Chemistry, 2002. p. 29-31.
- MALDONADE, I. R. *et al.* Protocolo para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson. Brasília: Embrapa, 2013. 4 p. (**Comunicado Técnico**, 86)
- MARES, D.; MRVA, K. Late-maturity α -amylase: low falling number in wheat in the absence of preharvest sprouting. **Journal of Cereal Science**, v. 47, n. 1, p. 6-17, 2008
- MAYOLLE, J. E. *et al.* Water diffusion and enzyme activities during malting of barley grains: a relationship assessment. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 3, p. 358-365, 2012.
- MOKHAWA, G.; KERAPELETSWE-KRUGER, C. K.; EZEUGU, L. I. Electrophoretic analysis of malting degradability of major sorghum reserve proteins. **Journal of Cereal Science**, v. 58, n. 1, p. 191-199, 2013.
- OSMAN, A. M. *et al.* Characterization and assessment of the role of barley malt endoproteases during malting and mashing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 108, n. 1, p. 62-67, 2002.
- PEÑA, R. J.; GONZÁLEZ, H. G.; CERVANTES, F. Relationship between Glu-D1/Glu-B3 allelic combinations and bread-making quality related parameters commonly used in wheat breeding. In: GLUTEN WORKSHOP, 8., 2004. Cambridge. **Proceedings...** Cambridge: Royal Society, 2004. p. 156-157.
- PERTEN, H. A modified falling number method suitable for measuring both cereal and fungal alpha-amylase activity. **Cereal Chemistry**, v. 61, p. 108-111, 1984.
- SARATH, G. *et al.* **Proteolytic enzymes: a practical approach**. Oxford: IRL Press at Oxford University Press, 1989. cap. 3, p. 25-55.
- SUHASINI, A. W.; MURALIKRISHNA, G.; MALLESHI; N. G. Free sugars and non-starch polysaccharide contents of good and poor malting varieties of wheat and their malts. **Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 537-540, 1997.
- TIAN, B. *et al.* Physicochemical changes of oat seeds during germination. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1195-1200, 2010.
- VÁZQUEZ, D. *et al.* Influence of cultivar and environment on quality of Latin American wheats. **Journal of Cereal Science**, v. 56, n. 2, p. 196-203, 2012.
- WENDT, W.; CAETANO, V. R.; NUNES, C. D. M. Rendimento de grãos e fatores de produção de trigo em função da ocorrência de precipitação pluviométrica na fase reprodutiva. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. 4 p. (**Comunicado técnico**, 163).
- WOONTON, B. W. *et al.* Changes in germination and malting quality during storage of barley. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 111, n. 1, p. 33-41, 2005.
- WOOD, P. J. Cereal β -glucans in diet and health. **Journal of Cereal Science**, v. 46, n. 3, p. 230-238, 2007.
- WU, M. J. *et al.* Polymorphism and pedigree analysis of β -amylase isozymes in Australian wheat. **Journal of Cereal Science**, v. 53, n. 3, p. 362-370, 2011.