

THAUANA LORENA SILVA MAGALHÃES

**EFEITO DA COCÇÃO ÚMIDA, GERMINAÇÃO E EXTRUSÃO DE MILHETO
(*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) NA QUALIDADE PROTEICA, SAÚDE
INTESTINAL, CONTROLE GLICÊMICO E SACIEDADE, *IN VIVO***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Hércia Stampini Duarte Martino

Coorientadores: Bárbara Pereira da Silva
Carlos Wanderlei P. de Carvalho
Izabela Maria M. de Carvalho

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

M188e
2023
Magalhães, Thauana Lorena Silva, 1991-
Efeito da cocção úmida, germinação e extrusão de milheto
(*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) na qualidade proteica, saúde
intestinal, controle glicêmico e saciedade, *in vivo* / Thauana Lorena
Silva Magalhães. - Viçosa, MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (169 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês

Inclui anexos.

Inclui apêndices.

Orientador: Hércia Stampini Duarte Martino.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Nutrição e Saúde, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.636>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Milheto - Processamento. 2. Alimentos - Teor protéico. 3.
Índice glicêmico. 4. Intestinos. I. Martino, Hércia Stampini Duarte,
1972-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição e
Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição. III. Título.

CDD 22. ed. 641.33171

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317


THAUANA LORENA SILVA MAGALHÃES

**EFEITO DA COCÇÃO ÚMIDA, GERMINAÇÃO E EXTRUSÃO DE MILHETO
(*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) NA QUALIDADE PROTEICA, SAÚDE
INTESTINAL, CONTROLE GLICÊMICO E SACIEDADE, *IN VIVO***


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 21 de julho de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **THAUANA LORENA SILVA MAGALHAES**
Data: 16/10/2023 10:37:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Thauana Lorena Silva Magalhães
Autora

Documento assinado digitalmente
 **HERCIA STAMPINI DUARTE MARTINO**
Data: 16/10/2023 09:15:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Hércia Stampini Duarte Martino
Orientadora

*Dedico este trabalho ao meu pai “in memorian”,
a minha mãe, ao meu irmão “in memorian” e a
toda minha família que, com muito carinho e
apoio, não mediram esforços para que eu
chegasse até esta etapa da minha vida. Aqui estão
os resultados dos seus esforços. Muito obrigada.
Eu amo vocês.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e aos meus irmãos pelo amor incondicional, carinho, tantos ensinamentos, e por me fazer acreditar que posso ir mais longe. À minha mãe por sempre me apoiar nos momentos difíceis e fazer o impossível para que eu chegasse até aqui. A toda minha família e amigos por sempre torcerem e acreditarem em mim e que, direta ou indiretamente, participaram da minha formação, o meu muito eterno agradecimento. Também agradeço ao meu namorado, André, e sua família pelo constante apoio e incentivo.

À minha orientadora, Hércia Stampini Duarte Martino, pela orientação, aprendizado, pela oportunidade e apoio durante todos os projetos que realizamos em conjunto, sempre com muita paciência e dedicação. Muito obrigada! A todos os que colaboraram, incluindo Carlos Wanderlei Piler Carvalho, Haira Guedes Lúcio, Bárbara Pereira da Silva, Renata Celi Lopes Toledo, Fátima Ladeira Mendes Duarte, Andressa de Assis, Lucimar Aguiar da Silva, Adriane Moreira Machado, Vinícius Parzanini Brilhante de São José e todos os bolsistas de iniciação científica, por toda ajuda e companheirismo nessa jornada.

Aos laboratórios: Laboratório de Nutrição Experimental (DNS), Laboratório de Análise de Alimentos (DNS), Laboratório de Metabolismo Energético e Composição Corporal (DNS). Aos voluntários e animais dos estudos, gratidão e respeito por terem proporcionado a realização deste trabalho.

Agradeço também ao programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, ao Departamento de Nutrição e Saúde e à Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) [código de financiamento 001], Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) [código de financiamento 001], Embrapa Tecnologia de Alimentos, Brasil [código de financiamento 13.16.05.043.00. 00], Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ/Brasil) [código de financiamento E-26/202.848/2017], Fundação Arthur Bernardes e ATTO Agrícola LTDA (ATTO Sementes, Randonópolis, Mato Grosso, Brasil), pela cooperação técnico-científica [número do auxílio 034/2022].

À banca examinadora pela disponibilidade, sugestões e contribuições para a melhoria deste trabalho. Minha gratidão eterna é extensiva a todos que me apoiaram, ajudaram e incentivaram de alguma forma.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

MAGALHÃES, Thauana Lorena Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2023. **Efeito da cocção úmida, germinação e extrusão de milho (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) na qualidade proteica, saúde intestinal, controle glicêmico e saciedade, *in vivo*.** Orientadora: Hércia Stampini Duarte Martino. Coorientadores: Bárbara Pereira da Silva, Carlos Wanderlei Piler de Carvalho e Izabela Maria Montezano de Carvalho.

O interesse por uma alimentação saudável impulsiona a demanda por alimentos e bebidas que ofereçam benefícios à saúde. Dentre esses alimentos, pode-se incluir o milho pérola, uma vez que seu potencial na alimentação humana é promissor. Torna-se necessário investigar como os diferentes métodos de processamento dos grãos de milhetos podem interferir na sua composição química e valor biológico. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes processamentos aplicados no milho pérola (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) sobre a qualidade proteica, saúde intestinal, controle glicêmico e saciedade, *in vivo*. Foram realizados dois estudos. Para o estudo I, 32 ratos *Wistar* machos (21 dias de idade) foram divididos em 4 grupos com 8 animais cada, sendo eles: controle caseína, apteico, farinha de milho não germinado e farinha de milho germinado. O estudo teve duração de 29 dias. Foram analisadas a composição química e a qualidade proteica das farinhas de milho, assim como as variáveis bioquímicas, murinométricas e de saúde intestinal dos animais experimentais. O estudo II se tratou de um estudo clínico agudo, simples-cego, randomizado, controlado e cruzado com 14 adultos euglicêmicos e eutróficos. Inicialmente, foram desenvolvidas, analisadas sensorialmente e quimicamente bebidas à base de farinha integral de milho extrudado. Em seguida, foi realizado um ensaio clínico, onde os participantes passaram por quatro sessões, durante as quais consumiram uma das seguintes opções: a bebida de milho extrudado, uma bebida controle de maltodextrina ou uma solução glicosada, sendo esta última administrada em duas sessões distintas. Foram avaliadas as respostas de glicemia, insulina e apetite durante um período de 2 horas, além de determinar o índice glicêmico das bebidas e analisar a ingestão alimentar nas 24 horas subsequentes a cada sessão. As farinhas de milho germinado e não germinado apresentaram um perfil adequado de aminoácidos essenciais, com exceção da lisina. Ainda, foram capazes de reduzir o ganho de peso, o índice de Lee e o pH das fezes, bem como melhorar a razão proteica líquida e o coeficiente de eficiência proteica, os níveis de glicose plasmática, ácido úrico, colesterol e triglicérides, aumentar a espessura e profundidade das criptas do cólon, a expressão de PepT1 e a produção de ácidos acético e propiônico nos ratos *Wistar*. No estudo clínico agudo, a bebida à base de farinha de milho extrudado sabor morango

apresentou melhor aceitação sensorial e foi classificada com índice glicêmico alto. Além disso, a bebida manteve as respostas glicêmicas e insulinêmicas, o controle do apetite e a ingestão alimentar estáveis entre os participantes, quando comparada à bebida controle. Em conclusão, o milho pérola oferece benefícios promissores para a saúde, como melhorias na composição corporal, na qualidade proteica, variáveis bioquímicas e saúde intestinal em animais, além de manter o controle glicêmico e a saciedade em humanos.

Palavras-chave: Cereal. Cozimento. Ácidos graxos de cadeia curta. Insulina. Indivíduos euglicêmicos.

ABSTRACT

MAGALHÃES, Thauana Lorena Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2023. **Effect of wet cooking, germination and extrusion of millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) on protein quality, intestinal health, glycemic control and satiety, *in vivo*.** Adviser: Hércia Stampini Duarte Martino. Co-advisers: Bárbara Pereira da Silva, Carlos Wanderlei Piler de Carvalho and Izabela Maria Montezano de Carvalho.

Interest in healthy eating is driving demand for foods and beverages that offer health benefits. Pearl millet can be included among these foods since its potential in human nutrition is promising. It is necessary to investigate how different millet grain processing methods can affect its chemical composition and biological value. The aim of this study was to evaluate the effect of different processing methods applied to pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) on protein quality, intestinal health, glycemic control, and satiety, *in vivo*. Two studies were carried out. For study I, 32 male *Wistar* rats (21 days old) were divided into 4 groups of 8 animals each: casein control, aprotic, ungerminated millet flour and germinated millet flour. The study lasted 29 days. The chemical composition and protein quality of the millet meals were analyzed, as well as the biochemical, murinometric and intestinal health variables of the experimental animals. Study II was an acute, single-blind, randomized, controlled, crossover clinical study with 14 euglycemic and eutrophic adults. Initially, beverages based on whole extruded millet flour were developed and analyzed sensorially and chemically. Next, a clinical trial was carried out in which participants underwent four sessions during which they consumed one of the following options: the extruded millet beverage, a maltodextrin control beverage or a glucose solution, the latter being administered in two separate sessions. Blood glucose, insulin and appetite responses were assessed over a 2-hour period, in addition to determining the glycemic index of the beverages and analyzing food intake over the 24 hours following each session. Germinated and non-germinated millet flours had an adequate profile of essential amino acids, except for lysine. They were also able to reduce weight gain, Lee's index and feces pH, as well as improve the net protein ratio and protein efficiency coefficient, plasma glucose, uric acid, cholesterol and triglyceride levels, increase the thickness and depth of colon crypts, PepT1 expression and the production of acetic and propionic acids in *Wistar* rats. In the clinical study, the strawberry-flavored extruded millet flour beverage showed better sensory acceptance and was classified as having a high glycemic index. In addition, the beverage kept glycemic and insulinemic responses, appetite control and food intake stable among the participants, when compared to the control beverage. In conclusion, pearl millet offers promising health benefits,

such as improvements in body composition, protein quality, biochemical variables, and intestinal health in animals, as well as maintaining glycemic control and satiety in humans.

Keywords: Cereal. Cooking. Short-chain fatty acids. Insulin. Euglycemic individuals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem ilustrativa de cultivo de milheto (<i>Pennisetum glaucum</i> (L.) R. Br.)	26
Figura 2 – Desenho experimental do estudo	45
Figura 3 – Desenho experimental do estudo I	53
Figura 4 – Tipos de fezes e características de acordo com a Escala de Bristol	61
Figura 5 – Delineamento experimental do estudo II	69

ARTIGO 1

Fig. 1 Effect of pearl millet intake on the biochemical variables in <i>Wistar</i> rats ($n = 8$) after 29 days	98
Fig. 2 Representations of the colon morphology of each treatment group are shown (Eosin-Hematoxylin stain)	100
Fig. 3 Effects of millet on the protein gene expression related to intestinal health in <i>Wistar</i> rats ($n = 8$)	101

ARTIGO 2

Figure 1. Experimental design of the acute clinical trial	122
Figure 2. Sensory evaluation of extruded millet beverages with different flavors ($n = 60$)	125
Figure 3. Graph of blood glucose and insulin values for participants who consumed the extruded millet test beverage and the maltodextrin control beverage ($n = 14$)	127
Figure 4. Habitual and test/control day energy intake ($n = 14$)	128
Figure 5. Subjective sensations of appetite and desire to eat specific types of food after an overnight fast and following the consumption of the beverage ($n = 14$)	129
Figure 6. Graph of the composite appetite score over time for participants food after an overnight fast and following the consumption of the beverage	130
Figure 7. Glycemic Index (GI) of different beverages	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química dos cereais	27
Tabela 2 – Composição de aminoácidos dos cereais	30
Tabela 3 – Composição das dietas experimentais	55
Tabela 4 – Composição das bebidas	63

ARTIGO 1

Table 1 Chemical characterisation of cooked whole pearl millet flours (dry basis)	95
Table 2 Effect of pearl millet intake on body, fecal dry weight and protein quality index of the Wistar rats ($n = 8$) for a period of 29 days	96
Table 3 Essential amino acid profile, chemical score (score AA), and PDCAAS according to the standard FAO (2013) ³¹ of the casein, cooked whole non-germinated and germinated millet flours	97
Table 4 Effect of pearl millet on intestinal health in Wistar rats ($n = 8$) for 29 days	99

ARTIGO 2

Table 1. Composition of the beverages	118
Table 2. Nutrient profile and composition of the beverages	119
Table 3. Baseline characteristics of the subjects ($n = 14$)	126

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus celsius
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrômetro
A5-LOX	Araquidonato 5-lipoxigenase
AC	Controle aprotéico
ACHO	Carboidrato disponível
AIN-93G	Dieta padrão para roedores em fase de crescimento
AKT	Proteína quinase B
ALT	Alanina amino transferase
AMPK	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
ANOVA	Análise de variância
AOAC	Associação de Produtos Químicos Agrícolas
AP	Aminopectidase
AST	Aspartato amino transferase
AUC	Área sob a curva de 2 horas
BBM	Membrana de borda de escova
BC	Coleta de sangue
BMI	Índice de massa corporal
C16:0	Ácido palmítico
C18:1	Ácido oleico
C18:2	Ácido linoleico
C18:3	Ácido alfa-linolênico
CC	Controle caseína
cDNA	DNA complementar
CDP	Punção digital capilar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CHO	Carboidrato
cm	Centímetro
CSS	Escore composto de saciedade
dL	Decilitro

DNS	Departamento de Nutrição e Saúde
EC	Miligramas de catequina
EMB	Bebida de milho extrudado
EMF	Farinha de milho extrudado
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
FAZ	Ácido graxo sintase
FER	Coefficiente de eficiência alimentar
FFQ	Questionário de frequência alimentar
g	Força g
g	Gramas
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAE	Miligramas de equivalente de ácido gálico
GI	Índice glicêmico
GIP	Polipeptídeo insulínico dependente de glicose
GLP-1	Peptídeo semelhante a glucagon 1
GM	Milho germinado
GMF	Farinha integral de milho germinado cozido
gN	Gramas de nitrogênio fecal
GR	Resposta glicêmica
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HFHF	Alta em gordura e alta em frutose
HMGCR	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase
HP	Alta proteína
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HTST	<i>High temperature short time</i>
iAUC	Área incremental abaixo da curva
IDF	Fibra alimentar insolúvel
IP1	Inositol monofosfato
IP2	Inositol difosfato
IP3	Inositol trifosfato
IP4	Inositol tetrafosfato

IP5	Inositol pentafosfato
IPAQ	Questionário para avaliação do nível de atividade física habitual
IR	Índice de refração
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
Kcal	Quilocaloria
Kg	Quilograma
L	Litro
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LIP	Lipídio
m	Metro
m ²	Metro quadrado
MCB	Bebida controle de maltodextrina
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetro de mercúrio
mRNA	RNA mensageiro
mTOR/S6K1	<i>Mammalian target of rapamycin/S6 kinase 1</i>
NCWS	Sensibilidade ao glúten não celíaca
NM	Milheto não germinado
nm	Nanômetro
NMF	Farinha integral de milho não germinado cozido
NPR	Razão proteica líquida
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PAL	Fenilalanina amônia-liase
PDCAAS	Escore químico corrigido pela digestibilidade
PepT1	Transportador de peptídeos 1
PER	Coefficiente de eficiência proteica
PFC	Consumo alimentar prospectivo
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
PTN	Proteína

PYY	peptídeo YY
ReBEC	Registro Brasileiro de Ensaio Clínicos
ROS	Espécie reativa de oxigênio
rpm	Rotação por minutos
RT-qPCR	Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SCFA	Ácido graxo de cadeia curta
SD	Desvio padrão
SDF	Fibra alimentar solúvel
SGLT1	Transportador de glicose dependente de sódio 1
SI	Sacarose isomaltase
SREBP-1C	Proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis
STAT3	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TC	Colesterol total
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TD	Digestibilidade verdadeira
TDF	Fibra alimentar total
TGL	Triglicerídeo
TIMagc	Sistema avançado de digestão gastrointestinal <i>in vitro</i>
TPC	Fenólico total
UA	Ácido úrico
UFV	Universidade Federal de Viçosa
VAS	Escala visual analógica
Vigitel	Vigilância de Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
XO	Xantina oxidase
C	Delta, variação
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	19
2 HIPÓTESES	22
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	24
4.1 Milhetos: produção e definição	24
4.2 Composição nutricional dos grãos de milheto	26
4.3 Qualidade proteica do milheto	28
4.4 Processamento dos grãos: germinação, cocção úmida e extrusão termoplástica	30
4.4.1 Germinação.....	31
4.4.2 Cocção úmida	33
4.4.3 Extrusão termoplástica	34
4.5 Milhetos: benefícios à saúde	37
4.5.1 Efeitos dos milhetos sobre a saúde intestinal	37
4.5.2 Efeitos do milheto sobre o controle glicêmico e insulinêmico.....	38
4.5.3 Efeitos dos milhetos sobre outras variáveis bioquímicas	40
4.5.4 Efeitos dos milhetos sobre o controle de ingestão alimentar.....	42
4.6 Atual utilização e perspectivas futuras no consumo humano de milhetos	43
5 MATERIAIS E MÉTODOS	45
5.1 Localização	45
5.2 Matéria-prima.....	46
5.3 Processo de germinação do milheto	46
5.4 Processo de extrusão do milheto	46
5.5 Tratamento térmico dos grãos de milheto não germinados e germinados.....	47
5.6 Preparo das farinhas integrais de milheto	47
<i>Estudo I</i>	48
5.7 Análise de composição centesimal.....	48
5.7.1 Umidade	48
5.7.2 Cinzas totais.....	48
5.7.3 Lipídios.....	48

5.7.4. Proteínas	49
5.7.5 Fibra alimentar.....	49
5.7.6 Determinação do teor de carboidratos e do valor calórico	50
5.8 Determinação do perfil de aminoácidos	51
5.9 Determinação de ácido fítico	51
5.10 Determinação de taninos.....	51
5.11 Determinação de fenólicos totais	52
5.12 Delineamento experimental	53
5.12.1 Cálculo amostral	54
5.12.2 Preparação e composição de dietas experimentais	54
5.11.3 Determinação da digestibilidade verdadeira.....	56
5.12.4 Determinação do coeficiente de eficiência proteica	56
5.12.5 Determinação da razão proteica líquida	57
5.12.6 Determinação do escore químico corrigido pela digestibilidade.....	57
5.12.7 Medidas murinométricas	57
5.12.8 Coeficiente de eficiência alimentar	58
5.12.9 Eutanásia.....	58
5.12.10 Análise bioquímica	58
5.12.11 Análises da saúde intestinal.....	59
5.12.11.1 Análise histológica	59
5.12.11.2 Extração de mRNA do tecido intestinal e síntese de cDNA	59
5.12.11.3 Determinação da expressão gênica de proteínas envolvidas na saúde intestinal por transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR)	59
5.12.11.4 pH do conteúdo cecal	60
5.12.11.5 Extração de ácidos graxos de cadeia curta	60
5.12.11.6 Escala de Bristol.....	61
5.13 Aspectos éticos	61
5.14 Análise estatística.....	61
<i>Estudo II</i>	62
5.15 Desenvolvimento das bebidas	62
5.16 Análise sensorial das bebidas teste.....	63
5.17 Composição química da bebida teste.....	64
5.17.1 Amido resistente.....	64

5.18 Fase do ensaio clínico agudo	65
5.19 Desenho do estudo	66
5.20 Determinação do índice glicêmico das bebidas	69
5.21 Aspectos éticos	69
5.22 Análises estatísticas	69
REFERÊNCIAS	71
RESULTADOS	86
Artigo 1: Germinated and non-germinated cooked whole millet (<i>Pennisetum glaucum</i> (L.) R. Br.) flours show a promising effect on protein quality, biochemical profile and intestinal health <i>in vivo</i>	86
Artigo 2: The effects of acute consumption of a beverage based on extruded whole grain pearl millet flour on glycemic and insulinemic control, food intake, and appetite sensation in adults: a randomized crossover clinical trial	114
6 CONCLUSÃO GERAL	141
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	142
ANEXOS	143
APÊNDICES	150

1 INTRODUÇÃO GERAL

O consumo alimentar populacional está mudando em direção a uma nutrição mais consciente e saudável, o que está gerando uma demanda por alimentos e bebidas com benefícios para o organismo, também conhecidos como alimentos funcionais (BERNARDO *et al.*, 2019; FERNANDES; SONAWANE; ARYA, 2018). Os cereais integrais desempenham um papel fundamental na base da pirâmide alimentar da maioria da população mundial, sendo fontes importantes de nutrientes, como proteínas, vitaminas, minerais, fibras alimentares e fitoquímicos, incluindo ácido fítico e compostos fenólicos. Embora esses compostos sejam geralmente considerados fatores antinutricionais devido à sua capacidade de formar complexos com nutrientes, como amido, proteínas e minerais, afetando sua biodisponibilidade, eles também possuem propriedades funcionais benéficas à saúde (FERNANDES; SONAWANE; ARYA, 2018; GUPTA *et al.*, 2017; SARITA; SINGH, 2016).

Nessa perspectiva, o milheto pérola (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.), gramínea pertencente à família da *Poaceae*, é uma excelente opção de cereal para incluir na alimentação. É importante ressaltar que o termo “milheto” abrange diversas variedades, porém, neste estudo, representa especificamente o milheto pérola, uma vez que é a única espécie botânica amplamente cultivada no Brasil, ocupando aproximadamente 5 milhões de hectares de área cultivada (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018).

Apesar de ainda não ser amplamente consumido pelos seres humanos, o milheto apresenta potencial funcional devido à sua relevante composição nutricional, que supera os teores de proteínas, lipídios, fibras e cinzas totais encontrados em cereais tradicionais como trigo, arroz e milho (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018). Os grãos integrais de milheto contêm teores médios de carboidratos variando entre 63,1 e 78,5% (TAYLOR, 2015), com predomínio de amido de digestão lenta (ANNOR *et al.*, 2017), fibra alimentar total entre 8,0 e 9,0%, principalmente do tipo insolúvel, proteínas em uma faixa de 8,6 a 19,4% e lipídios entre 1,5 e 6,8%, composto por cerca de 45% de ácido linoleico, 27% de ácido oleico e 21% de ácido palmítico. Além disso, os grãos de milheto são fontes de vitaminas do complexo B, minerais, como potássio, fósforo, magnésio, ferro e zinco e compostos bioativos, incluindo compostos fenólicos e fitatos (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018; TAYLOR, 2016; THEODORO *et al.*, 2021a).

A resolução RDC nº 493 de 15 de abril de 2021 (BRASIL, 2021) estabeleceu requisitos para a composição e rotulagem de alimentos que contenham cereais integrais, incluindo o milheto. Isso reconhece o milheto como um ingrediente alimentícios integral, promovendo sua

importância nutricional e versatilidade. Essa resolução ajuda a estabelecer padrões de qualidade e informações adequadas para produtos à base de milho, divulgando seus benefícios. Com essa mudança, o milho pode ser usado em diversas preparações, desde bebidas nutritivas até pães, bolos e biscoitos, proporcionando variedade de sabores e texturas aos consumidores (THEODORO *et al.*, 2021a). Além disso, ao ponderar a pouca existência de produtos sem glúten disponíveis no mercado (CHÁVEZ *et al.*, 2018), o milho se torna uma alternativa saudável para a alimentação de indivíduos celíacos e pessoas com sensibilidade ao glúten não celíaca (NCWS), visto ser um cereal isento de glúten (CHANDRASEKARA; SHAHIDI, 2012; HENROTTIN *et al.*, 2019), podendo se tornar uma substituição viável as farinhas sem glúten.

Vários benefícios para a saúde têm sido observados devido ao consumo dos milhentos, incluindo efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes *in vitro* e em animais (CHANDRASEKARA; SHAHIDI, 2012; DIAS-MARTINS *et al.*, 2018; THEODORO *et al.*, 2021b); antidiabéticos *in vitro* e em humanos e em animais (BARRETT; FARHADI; SMITH, 2018; PEI *et al.*, 2022; SUKAR *et al.*, 2020); hipolipemiante em animais (ALZHRANI *et al.*, 2022; THAKUR *et al.*, 2021; THAKUR; KUMAR; DHALIWAL, 2021); no controle das sensações de saciedade *in vitro* e em humanos (MONDAL *et al.*, 2022; REN *et al.*, 2018); redução de risco de obesidade e de distúrbios metabólicos em animais (ALZHRANI *et al.*, 2022; AMBATI; SUCHARITHA, 2019); e anticarcinogênicos *in vitro* e *in silico* (AGREGÁN *et al.*, 2022; SAINI *et al.*, 2021; ZHANG; LIU, 2015).

Nessa vertente, diferentes métodos de processamento, com destaque para a germinação, cocção úmida e extrusão, podem ser aplicados aos grãos de milho com o objetivo de diversificar a alimentação, assim como aumentar a qualidade nutricional, alterando a estrutura e concentração de fitoquímicos, neutralizando os compostos com potenciais efeitos adversos na absorção de nutrientes, contribuindo assim para a melhoria da digestibilidade e da biodisponibilidade de nutrientes no organismo humano (AGREGÁN *et al.*, 2022; CARDOSO *et al.*, 2015; DIAS-MARTINS *et al.*, 2018; SARITA; SINGH, 2016).

A cocção úmida aplicada aos grãos pode reduzir fitoquímicos com ação prejudicial na disponibilidade de nutrientes, uma vez que a maioria desses compostos são sensíveis ao calor e solubilizam facilmente (JHA; KRISHNAN; MEERA, 2015; NAZNI; SHOBANA, 2016). Ademais, estudos científicos *in vitro* e *in vivo* com diferentes espécies de milho demonstraram que a germinação foi responsável por reduzir teores de compostos fitoquímicos, como o ácido fítico de maior peso molecular, que pode prejudicar a biodisponibilidade de nutrientes. Esse fato proporcionou melhora da composição da microbiota intestinal e a função intestinal em ratos

(THEODORO *et al.*, 2022), aumento da qualidade proteica *in vitro* (KRISHNAN; DHARMARAJ; MALLESHI, 2012; SARITA; SINGH, 2016), da biodisponibilidade do amido *in vitro* (ANNOR *et al.*, 2017), da retenção de fibras alimentares *in vitro* (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018), de vitaminas do complexo B, dos minerais cálcio, ferro e zinco (KRISHNAN; DHARMARAJ; MALLESHI, 2012), maiores efeitos antioxidantes, potencializando o efeito biológico funcional desse grão em ratos (THEODORO *et al.*, 2021a). Segundo Mukhopadhyay e Bandyopadhyay (2003), a extrusão termoplástica reduz os fatores que podem se complexar com nutrientes, reduzindo sua biodisponibilidade e garante a segurança microbiológica do produto. Ademais, no caso específico do milho, a extrusão ainda traz benefícios adicionais, como a inativação de lipases, o que evita o ranço hidrolítico durante o armazenamento e aumenta a vida útil dos produtos (KACED; HOSENEY; MARSTON, 1984; SUMATHI; USHAKUMARI; MALLESHI, 2009), assim como aumenta a capacidade antioxidante (PESSANHA *et al.*, 2021) e a atividade anti-hiperglicêmica, ambos *in vitro*, por meio da redução de carboidratos facilmente digeríveis (BRENNAN *et al.*, 2012; PESSANHA *et al.*, 2021).

O desenvolvimento de alimentos e bebidas com milhetos surge como uma proposta interessante para a indústria alimentícia, especialmente em regiões semiáridas. No entanto, é fundamental realizar experimentos e ensaios clínicos para comprovar a eficácia e segurança alimentar desses produtos, garantindo assim sua qualidade e benefícios para a saúde dos consumidores. Até o momento não foram encontrados na literatura científica estudos a respeito dos efeitos do processo de germinação, combinado cocção úmida, aplicado à farinha de milho na qualidade proteica, na funcionalidade intestinal, nas variáveis bioquímicas e murinométricas de ratos *Wistar*, como também os efeitos da extrusão termoplástica nos grãos de milho pérola sobre o índice glicêmico (GI) e regulação glicêmica, insulinêmica, de saciedade e consumo alimentar, demonstrando, portanto, a necessidade de estudos nessas temáticas.

2 HIPÓTESES

Estudo I

A germinação, em adição à cocção úmida melhora a qualidade proteica da farinha de milho, assim como a funcionalidade intestinal e as variáveis bioquímicas de animais experimentais.

O consumo de dieta contendo 75% de farinha integral de milho germinado cozido ocasiona um menor ganho de peso e menor acúmulo de adipócitos que o consumo de dieta com farinha integral de milho não germinado cozido.

Estudo II

A bebida produzida à base de milho extrudado é caracterizada como bebida de médio índice glicêmico e com boa aceitação sensorial. Além disso, essa bebida é capaz de aumentar a saciedade, diminuir o consumo alimentar e manter os controles glicêmicos e insulínêmicos em indivíduos adultos euglicêmicos e eutróficos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de diferentes processamentos de milho pérola (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br., híbrido ADRg 9070) na qualidade proteica, saúde intestinal, controles glicêmico e insulinêmico, ingestão alimentar e sensação de apetite *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

Estudo I

- Determinar a composição centesimal e de compostos bioativos das farinhas integrais de milho germinado e não germinado cozidos;
- Investigar o efeito das farinhas integrais de milho germinado e não germinado cozidos sobre o consumo alimentar, ganho de peso e medidas murinométricas em ratos *Wistar*;
- Avaliar a qualidade proteica *in vivo* da farinha integral de milho germinado cozido e farinha integral de milho não germinado cozido;
- Avaliar o efeito do consumo da farinha integral de milho germinado e não germinado cozidos nas variáveis bioquímicas de ratos *Wistar*;
- Analisar os efeitos das farinhas integrais de milho na morfologia e funcionalidade intestinal em ratos *Wistar*.

Estudo II

- Desenvolver bebidas à base de farinha integral de milho extrudado;
- Avaliar a aceitação sensorial das bebidas;
- Determinar a composição centesimal das bebidas controle e à base de farinha integral de milho extrudado;
- Avaliar o efeito agudo da ingestão da bebida à base de farinha integral de milho extrudado nos controles glicêmico e insulinêmico, no apetite e na ingestão alimentar de adultos euglicêmicos e eutróficos;
- Determinar o índice glicêmico da bebida à base de farinha integral de milho extrudado e da bebida controle de maltodextrina.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Milhetos: produção e definição

Os cereais são sementes e/ou grãos que constituem a base da pirâmide alimentar da maior parte da população mundial e, por conseguinte, sua produção, disponibilidade e acesso tem ligação direta com a segurança alimentar das populações que o utilizam como alimento básico. Os cereais são responsáveis por fornecer energia ao organismo na forma de carboidratos e, quando consumidos inteiros, oferecem quantidades significativas de fibra alimentar, vitaminas e minerais que auxiliam na manutenção da saúde e redução de risco de doenças crônicas não transmissíveis (GUPTA *et al.*, 2017).

A produção agrícola de cereais é diretamente e negativamente afetada pelas mudanças climáticas globais, como o aumento da temperatura e a menor disponibilidade de água de irrigação (ALEXANDRATOS; BRUINSMA, 2012). Segundo a FAO *et al.* (2022), os fenômenos meteorológicos extremos ocasionados pelo aquecimento global, como a seca, as inundações e os ciclones, terão impacto significativo na redução da produção de alimentos agrícolas que, associado ao aumento populacional, poderá comprometer a segurança alimentar e nutricional em diversas regiões do mundo, em especial as subdesenvolvidas e as mais propensas às irregularidades climáticas. Ainda, de acordo com a FAO (2015), parte dos ecossistemas e recursos naturais em uso em todo o mundo são utilizados de forma insustentável e mostram sinais preocupantes de degradação, como esgotamento de nutriente do solo, erosão, desertificação, esgotamento das reservas de água doce, perda de floresta tropical e da biodiversidade. Assim, como pré-requisito para se alcançar a segurança alimentar global, em projeção para 2050, faz-se necessário ações e investimentos que garantam produções agrícolas e rurais mais sustentáveis (FAO, 2015). Ainda, em reconhecimento à relevância do milheto e como uma iniciativa para promover o seu consumo, a Assembleia Geral das Nações Unidas designou o ano de 2023 como o Ano Internacional do Milheto (UNITED NATIONS GENERAL ASSEMBLY, 2021). Este período representa uma oportunidade para aumentar a conscientização e direcionar a atenção em políticas públicas relacionadas aos benefícios nutricionais e à saúde oferecidos pelos milhetos, assim como sua capacidade de adaptação e resistência diante de condições climáticas desfavoráveis.

Dessa forma, dentre tantas possíveis soluções que visam combater os problemas citados, o milheto pérola (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) pode ser uma alternativa viável e bastante interessante, especialmente ao se tratar de regiões áridas e semiáridas, por apresentar boa

adaptação às temperaturas mais quentes e as condições climáticas adversas, assim como necessitar de baixos insumos nutritivos do solo de cultivo. A característica fisiológica que o coloca em vantagem frente a outros cereais é a presença de um extenso sistema radicular, permitindo a extração de nutrientes e água de forma mais eficiente das camadas mais profundas do solo (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018; DURÃES; MAGALHÃES; DOS SANTOS, 2003; TAYLOR, 2016).

Os principais países produtores de milhetos são a Índia, a China e o Níger, com cerca de 13, 3 e 2 milhões de toneladas produzidas, respectivamente, para o ano de 2021. Estima-se que o continente asiático e africano são os responsáveis por 96,7% da produção mundial de milhetos (FAOSTAT, 2022). É válido enfatizar, que os dados fornecidos pela FAOSTAT (2022) não diferenciam as diversas espécies desse cereal. Nessas regiões, o milheto é extensivamente e habitualmente consumido na alimentação humana como ingrediente dos mais diversos alimentos e bebidas tradicionais (TAYLOR, 2016).

No Brasil, a espécie de milheto mais difundida é a *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. Sua entrada ocorreu pelo estado do Rio Grande do Sul, em 1929, e logo foi se expandindo por todo o País. O cerrado é a região com maior expansão dessa gramínea, por conta das características geográficas e climáticas (DUARTE; GARCIA, 2016). Ainda, Durães *et al.* (2003) aponta que a região nordeste pode ser um nicho interessante na prospecção do cultivo de milheto no País, devido à sua extensa área semiárida, cerca de 60% do território total. Contudo, estima-se que o cultivo de milheto no País visa, quase que exclusivamente, a alimentação animal na forma de forragem, planta de cobertura e produção de grãos para ração, não havendo estímulo para consumo humano (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018; DURÃES; MAGALHÃES; DOS SANTOS, 2003).

O milheto, espécie *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br., é um cereal de grãos pequenos que recebe diferentes denominações ao redor do mundo. Na Nigéria, na língua Hausa, é chamado de *gero*; na Índia (língua híndi), é conhecido como *bajra*; no Níger, na língua Djerma, é chamado de *hegni*; no Mali, recebe o nome de *sanyo*; na Namíbia, é conhecido como *mahangu*; no Sudão, em árabe, é chamado de *dukhon*; no Brasil, é conhecido como milheto-pérola, capim-charuto e pasto-italiano; nos Estados Unidos, é chamado de *pearl millet*, *bulrush millet* e *cattail Millet*; na França, recebe o nome de *mil du Soudanou petit mil*; na Espanha, é chamado de *mijo perla*; na Europa, recebe as denominações de *candle millet* e *dark millet*; e em alguns países árabes, é conhecido como *duhum* (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018; TAYLOR, 2016).

Essa gramínea é considerada de baixo porte (ATTO SEMENTES, 2021) e possui colmos, folhas, raízes, panículas, inflorescências e grãos, como exemplificado na figura 1. As panículas são estruturas de forma espiralada ou cilíndrica que contém cerca de 870 a 3.000 grãos de milheto, e normalmente, possuem diâmetro de 2 a 3 cm e comprimento que varia entre 15 e 45 cm (DURÃES; MAGALHÃES; DOS SANTOS, 2003).

Figura 1 – Imagem ilustrativa de cultivo de milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.)



Fonte: ATTO Sementes (2021).

A estrutura do grão se assemelha a outros cereais, como o milho e o sorgo. Contudo, destaca-se o tamanho do germe que é relativamente grande, quando comparado aos demais (TAYLOR, 2016). Os grãos do milheto possuem formas ovoides, comprimento de até 2 mm e peso variando de 3 a 15 g. Ainda podem apresentar coloração entre o amarelo, cinza, marrom ou roxo (DURÃES; MAGALHÃES; DOS SANTOS, 2003).

4.2 Composição nutricional dos grãos de milheto

As características físico-químicas dos grãos do milheto podem ser influenciadas por diversos fatores, tais como o genótipo, às condições climáticas, o teor de nutrientes no solo, o manuseio pós-colheita, o tipo de processamento, entre outros (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2015). A composição química dos grãos de milheto em comparação a diferentes cereais são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Composição química dos cereais

Componentes (g/100 g)	Milheto ^a	Arroz ^b	Milho ^b	Trigo ^b
Carboidratos	71,6	79,95	74,26	75,36
Fibra alimentar total	8,5	1,3	7,3	12,7
Proteínas	14,5	7,13	9,42	10,69
Lipídios	5,1	0,66	4,74	1,99
Cinzas	2,0	0,64	1,2	1,54

Fontes: ^a *Pennisetum glaucum* (L) R. Br., por Taylor (2016); ^b USDA (2019).

Os grãos de milho, no geral, são constituídos, em sua maior parte, por carboidratos (71,6%), predominantemente na forma de amido de digestão lenta (ANNOR *et al.*, 2017). Esse resultado é inferior aos demais cereais analisados, como arroz (79,95%), milho (74,26%) e trigo (75,36%). O teor médio de fibra alimentar total nos grãos de milho é de 8,5%, se destacando a fibra insolúvel, valor esse superior ao do arroz (1,3%) e do milho (7,3%) e inferior ao trigo (12,7%) (tabela 1).

Os teores de proteínas são o segundo maior componente do milho (14,5%), maior que o arroz (7,13%), o milho (9,42%) e o trigo (10,69%) (tabela 1). Dentre os aminoácidos, destaca-se a alta concentração de ácido glutâmico, cerca de 23 g/100 g de N (OSMAN, 2011; SALEEM *et al.*, 2023), presente na fração de prolamina (FAO, 1995) e que está relacionado com a produção de ácido γ -aminobutírico (GABA) que apresenta funções no organismo, como a redução de sintomas na menopausa (HAN *et al.*, 2015), efeitos antidepressivos, sedativos e tem um bom efeito sobre a doença neural, como Parkinson, Huntington, Alzheimer e esquizofrenia (KIM; YOON, 2023). Sawhney e Naik (1969) analisaram e caracterizaram a distribuição das frações proteicas no grão de milho. A albumina variou de 6,1 a 26,5% (média de 15,1%), globulina de 3,5 a 14,7% (média 8,7%), prolamina de 21,3 para 38,0% (média 30,2%) e glutelina de 23,8 a 37,7% (média de 30,3%) (FAO, 1995).

A quantidade de lipídio na espécie *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. (5,1%) é maior que a encontrada nos demais cereais comparados, arroz (0,66%), trigo (1,99%) e milho (4,74%) (tabela 1). Essa característica é fundamentada em razão do maior desenvolvimento do germe que compõe, aproximadamente, 21% do grão integral. O perfil de lipídio do milho é caracterizado pela presença predominante de ácidos graxos insaturados e poli-insaturados. O ácido linoleico (C18:2) representa de 39% a 45% do total de lipídios, seguido pelo ácido oleico (C18:1) com uma proporção de 21% a 27%. O ácido palmítico (C16:0) está presente em uma

faixa de 20% a 21%. Em menor quantidade, o ácido alfa-linolênico (C18:3) contribui com aproximadamente 3% do total de lipídios (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018; NANI *et al.*, 2015; TAYLOR, 2016).

O teor de cinzas do milheto (2%) é maior em comparação ao arroz (0,64%), trigo (1,54%) e milho (1,2%) (tabela 1), com concentração de minerais na camada de aleurona, germe e pericarpo. Dentre diversos minerais, os encontrados em quantidades consideráveis são cálcio (41 mg/100 g), ferro (10,8 mg/100 g), fósforo (375 mg/100 g), potássio (460 mg/100 g) e magnésio (125 mg/100 g) (RAGAE; ABDEL-AAL; NOAMAN, 2006; SALDIVAR, 2003; TAYLOR, 2016).

Por fim, os principais compostos bioativos encontrados nos grãos do milheto são os compostos fenólicos. O milheto pérola pode conter entre 3,80 mg e 7,32 mg/g de fenólicos totais (SALAR; PUREWAL, 2017). O conteúdo de tanino condensado entre cultivares (RAI *et al.*, 2008; SAWAYA; KHALIL; SAFI, 1984) é bastante variável, divergindo de 25,09 a 138,45 mg de catequina equivalente/100 g de amostra (SALAR; PUREWAL, 2017). Entre os ácidos fenólicos, destaca-se o ácido ferúlico e p-cumárico (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018; SIROHA; SANDHU; KAUR, 2016) e entre o ácido fítico, o mio-inositol hexafosfato, e C-glicosilflavonas, tais como apigenina, glucosilvitexina, glucosilorientina e vitexina (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018; GUPTA *et al.* 2017; TAYLOR, 2016). A literatura científica estima uma faixa entre 588 e 1.382 mg por 100 g de grãos para o conteúdo de ácido fítico (TAYLOR, 2016). Esses compostos fitoquímicos podem ser encontrados na camada de aleurona e no germe do grão de milheto (KRISHNAN; DHARMARAJ; MALLESHI, 2012; LIANG; LIANG, 2019; TAYLOR, 2016).

4.3 Qualidade proteica do milheto

As proteínas desempenham uma função fundamental ao suprir as necessidades do organismo em relação à disponibilidade de aminoácidos e, conseqüentemente, de nitrogênio. Esses componentes são utilizados na síntese de proteínas, bem como na produção de diversos outros compostos nitrogenados envolvidos em funções específicas. Essas funções incluem a regulação hormonal, a transmissão de sinais nervosos, as reações enzimáticas, a estruturação do DNA e do RNA, entre outras (FAO, 1995; GIORA, 2015). A avaliação da qualidade das proteínas desempenha um papel importante na determinação de recomendações proteicas adequadas. Isso envolve a análise de vários fatores, como o valor biológico dos aminoácidos, a digestibilidade e a eficiência na disponibilidade e utilização desses nutrientes. Essa avaliação

contribuiu para estabelecer diretrizes nutricionais mais precisas relacionadas ao consumo de proteínas (COSTA *et al.*, 2014; DUTRA-DE-OLIVEIRA; MARCHINI, 1998).

A qualidade de uma proteína é tida em função do padrão de distribuição de frações proteicas, tais como albumina, globulina, prolamina e glutelina e, principalmente, da composição dos aminoácidos essenciais, ou seja, os aminoácidos não sintetizados pelo organismo humano (FAO, 1995). O escore químico, um método *in vitro*, expressa a quantidade desses aminoácidos essenciais em relação à proteína de referência, geralmente as proteínas do ovo e do leite humano. Porém, esse tipo de análise não considera a digestibilidade das proteínas e a biodisponibilidade dos aminoácidos dentro do organismo (COSTA *et al.*, 2014; FAO, 1995).

Em consideração, a utilização de ensaios biológicos (*in vivo*) para avaliação da qualidade de proteínas são importantes e essenciais, à vista da complexidade fisiológica do organismo, tornando possível medir aminoácidos utilizados pelos animais e, em consequência, a biodisponibilidade dos mesmos. Dessa forma, o presente estudo teve como metodologia escolhida a biológica *in vivo* para a avaliação da qualidade proteica de farinhas integrais de milho (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.), germinado e não germinado cozidos, utilizando as técnicas baseadas no balanço de nitrogênio, como a digestibilidade verdadeira (TD) e no crescimento dos animais, por meio do coeficiente de eficiência proteica (PER) e da razão proteica líquida (NPR) (COSTA *et al.*, 2014).

Tradicionalmente, o milho é uma boa fonte de aminoácidos essenciais, principalmente os sulfurados, metionina e cisteína, sendo lisina seu aminoácido limitante. Contudo, estudos recentes têm relatado níveis inversos, com variedades mais altas para lisina (3,1 g/100 g de proteína), conteúdo considerado mais elevado quando comparados a outros cereais. Esse valor mais alto é atribuído ao maior tamanho do germe do milho, possuindo altas concentrações de globulinas e albuminas ricas em lisina, arginina, histidina e aminoácidos de enxofre (FAO, 1995; TAYLOR, 2016). Dias-Martins *et al.* (2018) avaliaram o conteúdo de aminoácidos e seus teores para diferentes tipos de cereais (tabela 2).

Tabela 2 – Composição de aminoácidos dos cereais

Aminoácidos (g/100g de proteína)	Milho pérola	Arroz	Milho	Trigo
Leucina	10,7	8,2	12,3	6,8
Isoleucina	4,4	4,1	3,6	3,3
Valina	4,9	5,8	5,1	4,3
Treonina	4,0	3,5	3,8	2,8
Lisina	3,1	3,5	2,8	2,7
Fenilalanina	4,4	5,3	4,9	5,2
Tirosina	3,0	5,3	4,1	2,1
Triptofano	1,4	1,2	0,7	1,3
Metionina	1,1	2,4	2,1	1,7
Cisteína	1,5	1,8	1,8	2,0

Fonte: Dias-Martins *et al.* (2018).

Até o momento, não foram encontradas pesquisas científicas *in vivo* que analisaram o efeito da germinação na qualidade proteica de farinha de milho cozidos da espécie *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. O estudo de Singh *et al.* (1987) avaliou a digestibilidade proteica verdadeira de três diferentes linhagens de alta proteína (HP) de milho *Pennisetum americanum* (L.) Leeke em ratos. Como resultado, a digestibilidade verdadeira foi semelhante para todos os genótipos e variou entre 94 e 97%. O valor biológico e a utilização líquida da proteína foram menores, devido aos baixos teores de lisina, contudo, a proteína utilizável foi maior. Ao avaliar a mesma espécie de milho, Dassenko (1980) concluiu que os ratos alimentados com farinha de milho crua apresentaram maior digestibilidade proteica do que os ratos alimentados com farinha de trigo crua. Entretanto, a digestibilidade e PER foram menores quando a farinha de milho foi ofertada em forma de *chapatti* (pão típico da culinária indo-portuguesa), resultado este creditado ao longo tempo de cozimento que pode ter resultado em danos térmico à proteína (FAO, 1995).

4.4 Processamento dos grãos: germinação, cocção úmida e extrusão termoplástica

As técnicas de processamento em grãos após a colheita são amplamente utilizadas com a intenção de diversificar os alimentos e melhorar a função tecnológica e a qualidade nutricional por meio da redução do impacto negativo dos compostos fitoquímicos, quanto à digestibilidade e à biodisponibilidade de nutrientes, no organismo humano (MOLLAKHALILI-MEYBODI *et al.*, 2022; SARITA; SINGH, 2016). Os diversos métodos são classificados quanto à sua natureza, como física (moagem, decorticação, cozimento, torrefação, branqueamento, extrusão

e *popping*), química (tratamento com ácido) e biológica (fermentação e germinação) (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018; SARITA; SINGH, 2016).

4.4.1 Germinação

O processo de germinação engloba uma série de eventos fisiológicos e bioquímicos que ocorre em três etapas básicas quando as condições são favoráveis. Essas etapas incluem a embebição, a germinação propriamente dita e a secagem (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018). Segundo a literatura científica, durante a etapa de embebição, as sementes são imersas em água em temperatura ambiente por um período de aproximadamente 8 horas, para que haja encharcamento das mesmas, ativando o metabolismo celular para iniciação da fase vegetativa, a germinação. Em seguida, ocorre a etapa de germinação, na qual as sementes são mantidas em uma temperatura habitualmente entre 24 °C e 28 °C, e geralmente por um período de 24 a 48 horas. Durante essa fase, ocorrem várias mudanças bioquímicas, como a ativação de enzimas, a síntese de novos compostos e a quebra de moléculas de reserva, como amido e proteínas, para fornecer energia e nutrientes para o crescimento da planta. Aproximadamente, com 16 horas do início da germinação, ocorre a emergência e o crescimento da radícula na região proximal do hilo das sementes, seguida do desenvolvimento da plúmula e da bainha de coleóptilo. Após a germinação, a etapa final é a secagem. Nessa fase, as sementes são normalmente submetidas a uma temperatura de cerca de 50 °C, sob o sol ou estufa com circulação de ar, para remover o excesso de umidade e interromper os processos metabólicos. A secagem adequada é importante para reduzir a umidade dentro das sementes para faixas abaixo de 10% e assim, cessar a fase vegetativa, bem como evitar o crescimento de microrganismos e garantir a preservação das sementes germinadas (DURÃES; MAGALHÃES; DOS SANTOS, 2003; TAYLOR, 2016).

Durante a germinação, enzimas hidrolíticas são reativadas, em conjunto com a síntese de outras, exercendo diversas funções dentro do grão, tais como alterações bioquímicas, modificações estruturais e síntese de novos compostos que podem resultar no aumento da estabilidade e da qualidade nutricional do milho. Por exemplo, entre os processos enzimáticos durante a germinação, há ativação de enzimas como amilases e proteases o que pode facilitar a quebra do amido em açúcares fermentáveis e a degradação de proteínas (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018). Essas alterações podem ainda melhorar as propriedades tecnológicas do milho, como a facilidade de moagem, a capacidade de gelatinização do amido, a absorção de água e a melhora na textura do produto. Portanto, o processo de germinação de milho com o objetivo de agregar valor a diversos produtos alimentícios pode desempenhar um papel significativo no

desenvolvimento econômico, além de aumentar a segurança alimentar e nutricional, sendo possível obter produtos de melhor qualidade, com textura mais agradável e características sensoriais aprimoradas (ABAH *et al.*, 2020; SHARMA *et al.*, 2018).

Além disso, esse processamento dos grãos pode levar à transformação e desfosforilação parcial de fitoquímicos, resultando em formas mais antioxidantes. Por exemplo, a desfosforilação do ácido fítico por meio de fitases endógenas pode levar à produção de compostos como penta-fosfato (IP⁵), tetra-fosfato (IP⁴), tri-fosfato (IP³) e possivelmente inositol difosfato (IP²) e mono-fosfato (IP¹) (BURBANO *et al.*, 1995; GAN *et al.*, 2017; OWHERUO; IFESAN; KOLAWOLE, 2019; TAYLOR; DUODU, 2015; ZHOU; ERDMAN, 2009). E, segundo Sandberg, Carlsson e Svanberg (1989), o IP⁵ e IP⁶ são os compostos com maior efeito negativo na biodisponibilidade, pois quanto maior o grau de fosforilação do mio-inositol, maior é o seu poder de complexação com aminoácidos e minerais. Os demais compostos formados têm menor capacidade de ligar-se a minerais por exemplo, ou mesmo, os complexos formados são mais solúveis. Os fosfatos de inositol encontrados nos grãos correspondem, aproximadamente, a 90% na forma hexa-fosfórica, com os 10% restantes referentes à soma das frações penta-, tetra- e tri-fosfórica, de acordo com Cúneo, Amaya-Farfan e Carraro (2000).

Até o momento, achados científicos *in vitro* concluíram que o processo de germinação aplicado em diferentes variedades de milho foi responsável por reduzir teores de compostos fitoquímicos com ação negativa na biodisponibilidade de nutrientes, tais como polifenóis e ácido fítico, o que proporcionou aumento da qualidade proteica (KRISHNAN; DHARMARAJ; MALLESHI, 2012; SARITA; SINGH, 2016), de vitaminas do complexo B e dos minerais cálcio, ferro e zinco (KRISHNAN; DHARMARAJ; MALLESHI, 2012). Contudo, outros estudos concluíram que houve um aumento do teor de fitoquímicos de cereais e leguminosas germinadas (YU; GANG, 1998) e, que a atuação do fitato durante o processo de germinação pode estar associada a atividade aumentada e aprimorada da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), responsável por catalisar vias de biossíntese dos diferentes fitoquímicos (NKHATA *et al.*, 2018).

Além dessas questões, a presença do composto glicosil flavona no milho pode ter um efeito inibitório sobre a enzima peroxidase da tireoide, que é responsável pela produção dos hormônios tireoidianos, podendo ocasionar hipotireoidismo (MEZZOMO; NADAL, 2016). Porém, Theodoro *et al.* (2021) ao utilizarem farinha de milho germinado durante 10 semanas em ratos com dieta alta em gordura e frutose (HFHF), não observaram alterações nos hormônios

triodotironina (T3) e tiroxina (T4). Sendo assim, é possível sugerir que a presença da germinação no grão não induziu hipotireoidismo no modelo animal estudado.

Apesar das divergências, faz-se necessário mais estudos acerca da germinação e seus efeitos sobre os fitoquímicos. Essa abordagem tem potencial para melhorar a qualidade nutricional dos alimentos, especialmente quando consideramos a cadeia de produção. A germinação é um método interessante devido à sua simplicidade, rapidez e baixo custo, dispensando a necessidade de equipamentos complexos. Portanto, mais pesquisas são necessárias para explorar o uso da germinação como uma técnica viável na produção de alimentos com maior valor nutricional. Destaca-se que as mudanças na composição de nutrientes dos grãos podem sofrer variações em função das variedades de milho, das safras, das condições climáticas e do solo de cultivo, assim como os critérios dos procedimentos realizados durante a germinação, como a água de imersão, a temperatura e o tempo utilizados (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018; TAYLOR, 2016).

4.4.2 Cocção úmida

O cozimento por calor úmido de cereais é amplamente reconhecido por proporcionar uma série de benefícios. O processo de aplicação de calor úmido envolve a aplicação de calor e água para preparar os cereais antes do consumo, resultando em alterações significativas nas propriedades nutricionais e sensoriais dos alimentos (BURATTI *et al.*, 2020).

O processo de cocção úmida desempenha um papel crucial na melhoria das propriedades tecnológicas dos cereais, incluindo textura, sabor e aparência dos alimentos, além de aumentar a digestibilidade em cereais. Durante o processo de aquecimento, uma das principais mudanças que ocorrem é a gelatinização do amido, tornando-o mais agradável ao paladar e mais facilmente digerível pelo organismo (XIE *et al.*, 2020). Essa gelatinização resulta em uma quebra mais eficiente dos carboidratos complexos em açúcares simples, facilitando a absorção e utilização dos nutrientes pelo corpo (ENGLYST *et al.*, 1999). Porém, esse processo, seguido de arrefecimento, também pode transformar parte do amido em uma forma mais resistente à digestão enzimática no intestino delgado. O resfriamento subsequente dos cereais submetidos ao cozimento por calor úmido, leva à formação de estruturas cristalinas conhecidas como amido retrogradado. Essas estruturas contribuem para a formação de amido resistente, caracterizado por uma absorção mais lenta (KAIMAL; MUJUMDAR; THORAT, 2021; ZHANG *et al.*, 2021).

Além disso, a cocção úmida de cereais pode ter efeitos desejáveis e indesejáveis sobre seus teores de nutrientes e fitoquímicos. Durante o aquecimento, pode ocorrer a redução de fitoquímicos, que podem interferir na absorção de nutrientes pelo organismo (JHA; KRISHNAN; MEERA, 2015). O cozimento também facilita a liberação de nutrientes dos grãos, aumentando sua disponibilidade para o corpo (CARMODY; WRANGHAM, 2009). Porém, esse processamento pode ocasionar perdas de nutrientes hidrossolúveis, como por exemplo, vitamina A, D, E e K (COE; SPIRO, 2022).

É importante ressaltar que o tempo e a forma de cozimento podem afetar os benefícios obtidos. O cozimento excessivo ou em altas temperaturas pode levar à perda de nutrientes, portanto, é recomendado o uso de métodos de cozimento adequados e controlados para preservar ao máximo o valor nutricional dos cereais (BURATTI *et al.*, 2020).

No estudo *in vitro* realizado por Nazni e Shobana (2016) sobre os efeitos de diferentes tratamentos térmicos aplicados nos milhetos *barnyard* (*Echinochloa spp.*) e *foxtail* (*Setaria italica*), foi observado que o tempo prolongado de cozimento resultou em maiores perdas no teor total de compostos fenólicos. Isso pode ser atribuído à decomposição desses compostos ou à sua perda durante o processo de cozimento, uma vez que a maioria dos compostos bioativos é relativamente instável ao calor e facilmente solubilizada.

Em resumo, o cozimento de cereais oferece uma série de benefícios, incluindo aumento da digestibilidade, melhoria do valor nutricional, aumento da palatabilidade, além de facilitar o processamento e preparo dos alimentos. O conhecimento desses benefícios pode auxiliar na promoção de uma alimentação saudável e na busca por melhores práticas culinárias.

4.4.3 Extrusão termoplástica

Os mais diversos alimentos processados por extrusão termoplástica (aplicação da combinação das energias mecânica e térmica) são consumidos cotidianamente pela população de todas as faixas etárias, são produzidos uma grande variedade de alimentos prontos para o consumo, devido à sua versatilidade de tipos de produtos, como os *snacks* doces e salgados (salgadinhos), cereais matinais, proteínas vegetais texturizadas, alimentos infantis, farinhas pré-cozidas, emulsões, bases para bebidas e sopas, entre outros (HARPER, 1989; MARQUES *et al.*, 2018). Vale ressaltar que, a partir deste ponto, será adotado o termo genérico "extrusão" para se referir ao processo de extrusão termoplástica, uma vez que a produção de massas alimentícias de trigo ou macarrão utiliza a extrusão a frio, ou seja, não envolve a aplicação de calor típica da extrusão termoplástica.

Atualmente, muitos estudos têm se dedicado à pesquisa de alimentos e bebidas que possam ser elaborados por meio do uso do processo de extrusão, com o intuito de desenvolver formulações mais saudáveis e capazes de atender às necessidades nutricionais e de saúde dos consumidores. Dentre as propriedades nutricionais, físico-químicas e funcionais, destacam-se a prevenção ou redução da destruição dos nutrientes, melhora da digestibilidade da proteína e modificações estruturais no amido e nos fitoquímicos (CARDOSO *et al.*, 2015; PESSANHA *et al.*, 2021). Além disso, o processamento adequado por meio de técnicas como a extrusão também desempenha um papel crucial na redução de fatores com impactos negativos na biodisponibilidade de nutrientes, como o ácido fítico e os polifenóis de maiores peso moleculares, bem como de atividades enzimáticas indesejáveis, como inibidores de tripsina, e outros componentes, como lecitinas que podem comprometer a qualidade nutricional e funcional dos alimentos (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2012; MARQUES *et al.*, 2018). Essa preocupação é de extrema relevância em diversas aplicações de extrusão, visando assegurar a obtenção de produtos com propriedades desejáveis e seguros para consumo, além dos benefícios econômicos, como o baixo custo de processamento, alta produtividade e versatilidade de produção (MARQUES *et al.*, 2018).

A extrusão de alimentos é um processo integrado que combina várias operações em um único sistema, sendo elas transporte, mistura, cisalhamento e cozimento, permitindo assim a transformação de biopolímeros nativos presentes em cereais em novos biopolímeros funcionais (COMETTANT-RABANAL *et al.*, 2021; GANJYAL, 2020). A extrusão também pode envolver alta temperatura e curto tempo (*high temperature short time* – HTST) (CAMIRE; KRUMHAR, 2009; GUTKOSKI, 1997). Trata-se de um processo termomecânico, no qual os materiais passam por transformações físicas e químicas por meio da aplicação de pressão mecânica e aquecimento. Isso é realizado por meio de parafusos rotativos e tambores aquecidos, resultando no rompimento estrutural do amido. Em seguida, os materiais são moldados ao serem forçados a passar por uma matriz localizada na saída da extrusora (MARQUES *et al.*, 2018).

No que diz respeito às alterações físico-químicas causadas pelo cozimento por extrusão de materiais amiláceos, o grânulo de amido sofre destruição parcial ou completa por meio do rompimento estrutural, dextrinização e despolimerização. Tais modificações estão diretamente relacionadas ao teor de água envolvido no processamento (RAMASHIA *et al.*, 2019). Essas transformações têm impacto nas características finais do produto, como maior expansão, textura, viscosidade, solubilidade, gelatinização e capacidade de absorção de água (BERK,

2018; FERREIRA; CAPRILES; CONTI-SILVA, 2021; SINGH; GAMLATH; WAKELING, 2007), o que pode levar a uma melhoria nas propriedades tecnológicas do milho. É um processamento interessante ao se tratar da completa interação entre os componentes sólidos e a água, como é o caso de bebidas produzidas a partir de cereais (MOURA *et al.*, 2011).

Pessanha *et al.* (2021) desenvolveram pão integral utilizando misturas de farinhas cruas e extrudadas de milho (*Pennisetum glaucum*). Os autores observaram que o uso de extrusão aumentou a capacidade antioxidante ($215,2 \pm 1,9 \mu\text{M Trolox/g}$) e a inibição enzimática ($96,31 \pm 0,005$) em relação ao produto elaborado a partir de farinha crua. Ademais, ao avaliarem a atividade anti-hiperglicêmica *in vitro*, encontraram que a extrusão proporcionou um alimento com atividade anti-hiperglicêmica superior ao hipoglicêmico comercial utilizado (ACARBOSE[®]), sugerindo que pode ser utilizado em dietas com restrição de carboidratos.

No estudo de Brennan *et al.* (2012) foi investigado o potencial de utilização de pseudocereais (amaranto, milho e trigo sarraceno) como alternativas aos produtos à base de cereais convencionais em *snacks* extrudados, na modulação da resposta glicêmica *in vitro*. Eles observaram que a digestibilidade de carboidratos (impacto glicêmico) dos cereais matinais foi significativamente reduzida com o uso do amaranto, milho e trigo sarraceno. Os cereais matinais contendo pseudocereais foram capazes de reduzir de forma significativa tanto a fração de carboidratos facilmente digeríveis quanto a fração de carboidratos de digestão lenta.

Contudo, os estudos encontrados, em sua maioria, são realizados por meio de métodos *in vitro* e voltados para a avaliação das propriedades físico-químicas, texturais (NAGARAJU; TIWARI; SHARMA, 2020; SOBOWALE; KEWUYEMI; OLAYANJU, 2021; YANG *et al.*, 2022) e sensoriais (ONYEOZIRI *et al.*, 2021). Não foram encontrados estudos que avaliaram os efeitos da extrusão sobre os grãos de milho (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) no controle glicêmico, ingestão alimentar e sensação de apetite em humanos.

Ao mesmo tempo em que alguns estudos têm revelado os potenciais benéficos da extrusão na redução dos níveis de glicemia, a literatura científica também aponta que o tratamento por extrusão pode resultar em um índice glicêmico (GI) mais elevado, devido ao alto rompimento estrutural do amido, particularmente sobre a ramificação das moléculas de amilopectinas, causado pelo calor, cisalhamento mecânico e pressão envolvidos. No entanto, é possível controlar as variáveis de temperatura, pressão, umidade e tempo durante o processo de extrusão, a fim de minimizar o rompimento estrutural do amido durante a extrusão e, conseqüentemente, a digestibilidade, o que pode levar à produção de alimentos com baixo GI. Essa abordagem é benéfica para o manejo e a prevenção do diabetes tipo 2 (ZHANG *et al.*,

2021). Portanto, é essencial considerar esses fatores ao utilizar a extrusão como uma estratégia para desenvolver alimentos mais saudáveis e adequados para indivíduos que buscam controlar seus níveis de glicose no sangue.

4.5 Milhetos: benefícios à saúde

4.5.1 Efeitos dos milhetos sobre a saúde intestinal

Cereais integrais exercem ações promotoras à saúde intestinal, por meio de diversos componentes funcionais, tais como as fibras alimentares solúveis e insolúveis, polissacarídeos, peptídeos e compostos fitoquímicos, ocasionando diversas modificações a nível de microbiota e seus metabólitos, produção de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), morfologia e funcionalidade do intestino, como aumento de proteína intestinais envolvidas no transporte de nutrientes (DA SILVA *et al.*, 2019; HARTONO *et al.*, 2014; PRIYA *et al.*, 2023; WANG *et al.*, 2022).

As fibras alimentares são carboidratos não hidrolisados por enzimas digestivas humanas que atuam como prebióticos e afetam a estrutura e funcionamento intestinal. Quando esses polissacarídeos chegam, principalmente, no intestino grosso são utilizados em grande parte como combustível pela microbiota, e ainda podem determinar a composição do microbioma. A forma e o tipo de fibra alimentar podem alterar a resposta do microbioma, mas em linhas gerais, uma dieta rica em fibras está associada a um microbioma que se fundamenta em uma microbiota que utiliza mais polissacarídeos, resultando em menos produtos de fermentação de proteínas e menos presença de bacteroides e clostrídios (CHRISTODOULIDES *et al.*, 2016; FRAME; COSTA; JACKSON, 2020). Durante a fermentação das fibras, especialmente no cólon proximal, há a produção de SCFA, em sua maioria de butirato, acetato e propionato, e de forma menos abundante, valerato e caproato (FRAME; COSTA; JACKSON, 2020; HOLSCHER, 2017). Esses SCFA servem para diversas vias metabólicas, tanto de forma local, quanto sistêmica. Eles podem ser usados como substrato enérgicos pelos colonócitos, ocasionando maior desenvolvimento e diferenciação, além de prevenir a carcinogênese e inflamação nessas células, alterar a permeabilidade intestinal, melhorando a produção de muco (KASHYAP *et al.*, 2013; O'CONNOR; O'HERLIHY; O'TOOLE, 2014). Também, são capazes de melhorar a função de barreira intestinal, aumentando proteínas de transporte envolvidas na absorção de água e de nutrientes. Além disso, a maior produção de SCFA causa uma alteração no perfil de pH para níveis mais ácidos, o que pode acarretar a redução do crescimento de bactérias que

podem causar doenças e aumentar a microbiota benéfica (FRAME; COSTA; JACKSON, 2020).

Nesse contexto de saúde intestinal, o milho apresenta diversos potenciais benefícios. A suplementação de milho *foxtail* (rabo de raposa) por 10 semanas atenuou a inflamação do cólon e reduziu o risco de câncer colorretal associado à colite em 40 camundongos, por meio dos metabólitos microbianos (derivados de indol e ácidos graxos de cadeia curta), produzidos pela microbiota dos animais alimentados com milho rabo de raposa, que causaram maior ativação dos receptores intestinais hidrocarbonetos arilo e receptor acoplado à proteína G, bem como inibiram a fosforilação de STAT3 (do inglês: *signal transducers and activators of transcription*) pelos metabólitos microbianos do milho de rabo de raposa (ZHANG *et al.*, 2020). O consumo de milho germinado (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) durante 10 semanas, associado a uma dieta alta em gordura e frutose (HFHF), foi capaz de aumentar a produção do SCFA propionato, melhorar a morfologia e a função intestinal, aumentando concentração de ácidos graxos de cadeia curta com propionato, a profundidade e espessura da cripta intestinal e a contagem de células caliciformes, além de reduzir o pH fecal e a excreção urinária de manitol em ratos *Wistar* com alteração metabólica (THEODORO *et al.*, 2022).

4.5.2 Efeitos do milho sobre o controle glicêmico e insulinêmico

Conceitua-se resposta glicêmica (GR) como a “resposta pós-prandial de glicose no sangue (mudança na concentração) provocada quando um alimento ou refeição que contém carboidratos é ingerido” (AUGUSTIN *et al.*, 2015; MUSA-VELOSO *et al.*, 2021). Quando se trata do termo carboidrato disponível, este pode ser definido como a porção de carboidrato presente nos alimentos que é digerido, absorvido e metabolizado como sacarídeos. O índice glicêmico (GI) pode ser precisamente definido pelo método ISO (do inglês: *International Organization for Standardization*) 26642:2010 (ISO, 2010), tratando-se da resposta glicêmica ocasionada por uma porção de um alimento que represente 25 g ou 50 g de carboidratos disponíveis, em relação a resposta glicêmica ocasionada por 25 g ou 50 g de um carboidrato de referência (glicose ou pão de trigo branco) sendo expresso em porcentagem (AUGUSTIN *et al.*, 2015). Dessa forma, o índice glicêmico pode ser entendido como uma porcentagem (ou índice) que representa a qualidade dos carboidratos presentes nos alimentos. Se os carboidratos são rapidamente digeridos, absorvidos e metabolizados, considera-se alimentos de alto GI (≥ 70), enquanto os que sofrem de forma mediana são intitulados de médio GI (56-69). E os

carboidratos lentamente digeridos, absorvidos e metabolizados são considerados de baixo GI (≤ 55), com base em uma escala de glicose (CHIAVAROLI *et al.*, 2021).

Além disso, logo após a uma refeição, os carboidratos ingeridos aumentam as concentrações de glicose no sangue e insulina em diferentes níveis, a depender do GI, como intuito de gerenciar o controle glicêmico. Inicialmente, ao consumir refeições com alto GI ocorre maior aumento dos níveis de glicose e insulina no sangue, do que após uma refeição de médio ou baixo GI, ocasionado a absorção de nutrientes, inibição da produção hepática de glicose e supressão da lipólise. Visando a redução da glicemia pós-prandial, existem diferentes estratégias dietéticas que podem auxiliar. Essas abordagens perpassam, por exemplo, pela redução da porcentagem energética da ingestão de carboidratos, aumento da ingestão de nutrientes que retardam o esvaziamento gástrico (exemplificando, proteína, gordura e fibra alimentar) ou a redução do GI de alimentos com carboidratos, seja reduzindo o cozimento do amido ou pelo aumento do teor de fibras alimentares (AUGUSTIN *et al.*, 2015).

As fibras alimentares vêm ganhando cada vez mais destaque devido aos potenciais efeitos prebióticos benéficos, com consequências na redução de riscos de incidência de distúrbios metabólicos, devido às suas ações no aumento da motilidade do sistema digestivo e na capacidade de retardar a absorção de glicose, entre outros benefícios (JEW *et al.*, 2015; WHO, 2014). Nessa vertente de controle glicêmico, muitos estudos foram feitos com diferentes espécies de milho. Theodoro *et al.* (2021) observaram que a alimentação com milho pérula germinado cru (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) durante 10 semanas foi capaz de reduzir de forma significativa a gliconeogênese, hiperinsulinemia e adiposidade em ratos induzidos a obesidade e a resistência insulínica, devido à presença de fibra alimentar na matriz e por meio da maior expressão do receptor de insulina e de mRNA da proteína quinase B (AKT), da proteína fosfo-AKT1, de proteína quinase ativada (AMPK) e de fosfofrutoquinase, associado a maior expressão de piruvato quinase.

Singh *et al.* (2020) trouxeram evidências de que uma dieta à base de milho ocasionou um declínio significativo na glicemia de jejum e na glicemia pós-prandial de 2 horas e hemoglobina glicada em 60 indivíduos com diabetes *mellitus*, possivelmente devido a composição e propriedades enzimática inibitórias dos fenólicos presentes na semente, que podem ter resultado na inibição da α -glucosidase e da amilase pancreática. Essas enzimas são cruciais no controle da homeostase da glicose, pois hidrolisam a glicose e o amido, respectivamente, levando a uma prevenção tanto a hiperglicemia pós-prandial quanto a progressão para o diabetes *mellitus* e a toxicidade da glicose nas células pancreáticas

(SHOBANA; SREERAMA; MALLESHI, 2009). Um estudo clínico agudo de Hayes *et al.* (2021b) realizado em 16 indivíduos adultos saudáveis com diferentes preparações a base de milho pérola decorticado (cuscuz de milho comercial, cuscuz de milho feito por conta própria e mingau de milho grosso) encontraram que todos os alimentos à base de milho tiveram resposta glicêmica menor que o arroz branco polido. Para complementar o ensaio em humanos foi avaliado os perfis de pressão gástrica de experimentos TIMagc (*in vitro*), e não foi encontrado confirmação que o cuscuz de milho se quebraria rapidamente no estômago, formando uma pasta viscosa que retardaria a digestão do amido e nem que poderiam reduzir a taxa de esvaziamento gástrico e, conseqüentemente, diminuir a glicemia pós-prandial. Portanto, com base nessa constatação, concluiu-se que a viscosidade não é provavelmente a responsável pela redução da glicemia causada pelos alimentos à base de milho. Possivelmente, as estruturas intactas da parede celular do grão de milho, o aumento das interações intermoleculares levou à formação de matrizes mais densas, além da presença de compostos fenólicos no milho que podem ter contribuído com uma menor resposta glicêmica pós-prandial. Pressupõe-se então que os alimentos à base de milho podem ser uma fonte viável de carboidratos de digestão lenta para moderar a glicemia pós-prandial (KAIMAL; MUJUMDAR; THORAT, 2021; PRIYA *et al.*, 2023; SALEEM *et al.*, 2023).

4.5.3 Efeitos dos milhetos sobre outras variáveis bioquímicas

A dislipidemia, juntamente com outros fatores como elevação do ácido úrico (NISKANEN *et al.*, 2004; YU; CHENG, 2020), obesidade, inflamação, estresse oxidativo, resistência insulínica, hipertensão, sedentarismo e outros, aumenta o risco de doenças cardiovasculares. Estratégias para tratar ou prevenir a aterosclerose incluem reduzir lipoproteína de baixa densidade (LDL), colesterol total, triglicerídeos e aumentar lipoproteína de alta densidade (HDL) (FALUDI *et al.*, 2017; IZAR *et al.*, 2021; PRÉCOMA *et al.*, 2019).

O ácido úrico (UA) é o produto do metabolismo da purina em macacos e humanos, em que a enzima xantina oxidase (XO) catalisa a oxidação da hipoxantina em xantina e da xantina em ácido úrico, e em condições fisiológicas a síntese e a excreção de UA são equilibradas no organismo (YU; CHENG, 2020). Quando os níveis de ácido úrico ultrapassam a faixa normal de homeostase, podem ocorrer depósitos de cristais de urato monossódico nas articulações e tecidos moles, caracterizado como gota (ROSPLESZCZ *et al.*, 2020).

Indicações científicas apontam que o consumo de milho, independente da espécie, auxiliam na redução dos níveis de ácido úrico (JAYAWARDANA *et al.*, 2021), LDL, colesterol

total e triglicerídeos, bem como na manutenção do perfil lipídico (RAO DAYAKAR *et al.*, 2018; SAINI *et al.*, 2021), devido a possíveis alterações bioquímicas e, até mesmo, de expressão gênica causada pela abundância de fibras alimentares e fitoquímicos (LI *et al.*, 2019).

O milho dedo de raposa e o milho *proso* (*Panicum miliaceum*), ou milho painço, foram capazes de reduzir significativamente os níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total e LDL em ratos *Sprague-Dawley* hiperlipidêmicos após 5 semanas de consumo das dietas com milho, demonstrando assim o potencial na prevenção de doenças cardiovasculares (LEE *et al.*, 2010). Chen *et al.* (2017) conduziram um estudo para investigar o efeito dos hidrolisados de proteína de milho rabo de raposa em diferentes formas (crua, extrudada e fermentada) na redução da pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos. Após 4 semanas, os pesquisadores observaram que esses hidrolisados de proteína de milho rabo de raposa foram capazes de reduzir significativamente a pressão sanguínea, embora não tenham influenciado os níveis de TG, TC, HDL e LDL. Os hidrolisados de milho rabo de raposa cru e extrudado se mostraram mais eficazes nesse aspecto. Esse efeito benéfico foi atribuído à diminuição da atividade da enzima conversora de angiotensina e aos níveis reduzidos de angiotensina II. Relatos anteriores indicam que a expressão aumentada dessas substâncias está relacionada à ocorrência e ao desenvolvimento da aterosclerose (LIU *et al.*, 2012), pois hipertensão, hiperlipidemia interagem entre si (DE LOMBERA ROMERO *et al.*, 1998). Um estudo realizado por Li *et al.* (2019) teve como objetivo investigar os efeitos do extrato etanólico de milho rabo de raposa e do grão integral no metabolismo lipídico em ratos alimentados com uma dieta rica em gordura ao longo de 4 semanas. Os resultados revelaram que a suplementação de milho teve um impacto significativo na redução dos níveis de colesterol total, alterando os perfis de lipídios e regulando negativamente a expressão dos genes SREBP-1C (proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis), FAS (ácido graxo sintase) e HMGCR (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase). Esses efeitos resultaram na inibição da síntese de colesterol e triglicerídeos, além de melhorar os distúrbios metabólicos lipídicos. Além disso, estudos *in vitro* utilizando diferentes extratos de variedades do milho *finger* (*Eleusine coracana*), ou milho dedo, como *Ravi*, *Rawana* e *Oshadha*, demonstraram propriedades anti-inflamatórias. Esses extratos foram capazes de reduzir as atividades de enzimas como araquidonato 5-lipoxigenase (A5-LOX) e xantina oxidase, indicando um potencial efeito preventivo em distúrbios inflamatórios, incluindo reações alérgicas, doença inflamatória intestinal e a biossíntese de ácido úrico (JAYAWARDANA *et al.*, 2021).

4.5.4 Efeitos dos milhetos sobre o controle de ingestão alimentar

O controle alimentar é complexo e regulado por componentes homeostáticos, impulsionados pelo eixo cérebro-intestino-tecido adiposo (GONZALEZ-IZUNDEGUI *et al.*, 2021), e hedônicos, estimulados por fatores cognitivos, de recompensa e emocionais (BERTHOUD, 2011). A fome e a saciedade são fases que também regulam o apetite, sendo que a fome pode ser entendida como a sensação que encoraja a iniciação do consumo alimentar, e é descrita como um incomodo vazio no abdômen, enquanto a saciedade é o período de tempo em que a sensação de plenitude persiste, ou seja, aos eventos pós-prandial que determinam o tempo para a próxima refeição. Experimentalmente, a saciedade pode ser medida pela escala analógica visual (VAS) e pela duração do período de jejum entre as refeições (CIFUENTES; ACOSTA, 2022; GONZALEZ-IZUNDEGUI *et al.*, 2021).

O consumo de cereais integrais tem sido associado a efeitos benéficos no processo de regulação da ingestão alimentar (ALYAMI *et al.*, 2019). As fibras alimentares são conhecidas por induzir à saciedade e reduzir o apetite, o que conseqüentemente inibe a consumo de alimentos (POUTANEN *et al.*, 2017). Estudos científicos mostram que uma alimentação rica em fibras alimentares leva a modificações na composição microbiana que estão associadas a uma diminuição do apetite, provavelmente, por estimular hormônios supressores do apetite, como leptina e peptídeo YY (FRAME; COSTA; JACKSON, 2020; O'CONNOR; O'HERLIHY; O'TOOLE, 2014). Além disso, as fibras alimentares também têm a capacidade de retardar o esvaziamento gástrico, exercendo um efeito sacietogênico. Esse efeito pode ser explicado pelas vias de regulação endócrina resultantes do aumento da viscosidade do conteúdo gástrico e da distensão gástrica causada pela capacidade da fibra em reter água quando ingerida. Além disso, a interação dos ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), produzidos durante a fermentação de prebióticos pela microbiota intestinal, com o sistema nervoso central também pode desempenhar um papel nessa regulação (FROST *et al.*, 2014; HERVIK; SVIHUS, 2019).

O estudo realizado por Ren *et al.* (2018) revelou que a ingestão de milho rabo de raposa ao longo de um período de 12 semanas resultou em um aumento significativo nos níveis de leptina no sangue de 70 indivíduos com tolerância à glicose prejudicada. Os níveis de leptina aumentaram de $8,3 \pm 6,4$ para $9,6 \pm 7,0$ ng/ml. Esse aumento indica que o milho possui a capacidade de suprimir o apetite e reduzir a ingestão de energia, possivelmente por meio da modulação de sinais no sistema nervoso e do metabolismo da glicose no sangue. Além disso, a sensação de saciedade foi alcançada também por meio do retardo no esvaziamento gástrico e do alto teor de fibras presentes no milho. Contudo, não foram encontrados estudos em que

houve medições de grelina, um hormônio peptídico orexigênico produzido e secretado pelo estômago em resposta ao jejum. Esse hormônio desencadeia a sensação de apetite, a ingestão de alimentos e o ganho de peso corporal (WANG *et al.*, 2021).

Alyami *et al.* (2019) investigaram o efeito de um mingau de milho pérola em comparação com um mingau de aveia escocês nas respostas gastrointestinais, hormonais e do apetite em 26 indivíduos adultos saudáveis. Os autores observaram que o mingau de milho pérola aumentou o volume gástrico, reduziu a resposta do polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) e melhorou as respostas hormonais para peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1) e peptídeo YY (PYY) comparáveis ao mingau de aveia. Assim, os autores chegaram à conclusão de que o milho pode ser uma opção sustentável com efeitos benéficos na saciedade e na saúde comparáveis aos da aveia.

A hidrólise enzimática pode ser retardada por diversos fatores, incluindo a integridade da estrutura da parede celular e as diferenças na composição química. Matrizes densas contendo componentes como fibras, proteínas, lipídios, fenólicos e minerais podem causar aglomeração macromolecular, o que pode dificultar a ação das enzimas digestivas. Estudos realizados *in vitro* com o milho sobre o consumo de grãos integrais demonstraram que a matriz densa presente nesses alimentos pode desacelerar a amplitude gástrica (HAYES, 2021a; MONDAL *et al.*, 2022). Essa resistência às enzimas digestivas pode levar a uma maior taxa de digestão e absorção no trato gastrointestinal, o que pode influenciar diretamente no controle da saciedade e, conseqüentemente, ajuda a combater a obesidade e os distúrbios metabólicos (AMBATI; SUCHARITHA, 2019).

Portanto, é essencial realizar uma investigação detalhada sobre como a composição dos grãos de *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br., bem como os processamentos, podem interferir na regulação do apetite.

4.6 Atual utilização e perspectivas futuras no consumo humano de milhetos

Vários estudos indicam que os milhetos possuem um potencial promissor para ser amplamente utilizado no mercado alimentício humano, indo além de seu papel tradicional como cultura de subsistência em muitos países, incluindo o Brasil (TAYLOR, 2016), por apresentar muitos nutrientes principais e secundários, como macronutrientes, vitaminas e minerais, bem como compostos antioxidantes, como fenólicos totais e ácido fítico. A literatura científica tem mostrado pesquisas que trazem funções promotoras à saúde, tais como propriedades anti-inflamatórias (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018; TAYLOR, 2016; THEODORO *et al.*, 2021a),

hipoglicemiante (ANNOR *et al.*, 2015; DIAS-MARTINS *et al.*, 2018; SHUKLA; SRIVASTAVA, 2014), na saciedade (ALYAMI *et al.*, 2019; HAYES *et al.*, 2021b) e até mesmo anticancerígenas (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2015). Outro ponto de interesse é o fato dos milhetos serem naturalmente isentos de glúten, tornando-os uma alternativa na alimentação de indivíduos celíacos e pessoas com sensibilidade ao glúten não celíaca (NCWS) (CHANDRASEKARA; SHAHIDI, 2012). Além do mais, os milhetos apresentam alta capacidade de adaptação a mudanças climáticas, tão presentes atualmente no mundo. O aquecimento e condições de seca, associado à crescente expansão populacional e, conseqüentes, debates acerca da disponibilidade de alimentos e da segurança alimentar e nutricional, tornam ainda mais pertinente a utilização desse cereal na alimentação humana e, particularmente no Brasil (TAYLOR, 2016).

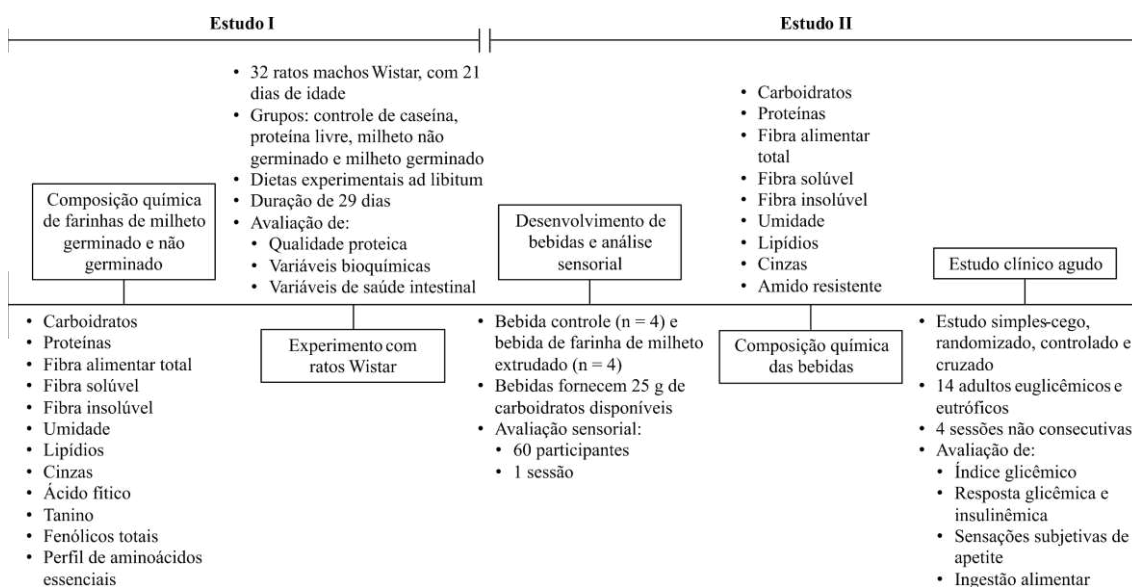
Então, diante desse panorama, torna-se imprescindível a realização de mais estudos e a implementação de estratégias para promover e incentivar o consumo de milhetos na alimentação dos brasileiros. Isso inclui a adoção de políticas públicas que estimulem o cultivo e consumo do grão, o apoio a pesquisas e instituições dedicadas ao estudo da composição nutricional dos milhetos, investigação dos efeitos dos processamentos, realização de ensaios biológicos e clínicos, bem como o desenvolvimento de novos produtos alimentícios à base de milhetos. Essas medidas contribuirão para a consolidação dos milhetos como uma opção alimentar presente nas refeições dos brasileiros (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018).

Dessa forma, destaca-se mais uma vez a importância do presente estudo, tendo em vista que foram analisadas diversas vias *in vivo* e potenciais benefícios do milheto pérola submetido a diferentes condições de processamento.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi dividido em dois estudos: (I) a investigação dos efeitos das farinhas integrais de milho não germinado e germinado cozidos sobre a qualidade proteica, variáveis bioquímicas e saúde intestinal em ratos *Wistar* machos recém desmamados e (II) o desenvolvimento, avaliação da aceitação sensorial e caracterização química de uma bebida à base de farinha integral extrudada de milho pérola, determinação do índice glicêmico e avaliação dos efeitos do seu consumo na resposta glicêmica, insulinêmica, na sensação subjetiva do apetite e no consumo alimentar de adultos eutróficos (figura 2).

Figura 2 – Desenho experimental do estudo



Fonte: Autoria própria.

5.1 Localização

O presente trabalho foi desenvolvido no Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizado em Viçosa – MG. No Laboratório de Desenvolvimento de Novos Produtos (DNS/UFV), foram realizados os processos de produção das farinhas integrais de milho não germinado, germinado e extrudado, bem como o desenvolvimento das bebidas e a realização da análise sensorial das mesmas. As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Experimental (DNS/UFV) e em parceria com o Laboratório de Análise de Alimentos (DNS/UFV). A Embrapa Agroindústria de Alimentos, localizada no Rio de Janeiro, RJ, realizou os processos de germinação, extrusão e a determinação do perfil dos aminoácidos dos grãos de milho. Os ensaios biológico e clínico

foram realizados no Laboratório de Nutrição Experimental (DNS/UFV).

5.2 Matéria-prima

Os grãos de milho (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.), híbrido ADRg 9070 (Atto Sementes, Rondonópolis, MT), utilizados no experimento na forma de não germinados, germinados e extrudados, foram colhidos no município de Itiquira (MT), 2ª safra/2021 e fornecidos pela Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ).

5.3 Processo de germinação do milho

Para o estudo I a germinação ocorreu de forma a utilizar grãos com índice de germinação de 99%. Estes foram embebidos em água (1:3 grãos para água) por 1 hora, e depois a água foi drenada seguindo a metodologia de Theodoro *et al.* (2021). Os grãos foram germinados em câmara de fermentação (National Mfg. Co., Lincoln, EUA) com temperatura controlada de 30 °C e umidade relativa de 90%. Após 24 horas, os grãos foram secos em estufa com circulação de ar (Hauber Macanuda, Joinville, Brasil) a 55 °C por 18 horas, até que atingissem um teor de umidade final inferior a 12%.

5.4 Processo de extrusão do milho

Para a obtenção dos extrudados expandidos do estudo II, utilizou-se grãos integrais de milho não germinado com teor de umidade de 11%. Esses grãos foram submetidos ao processo de moagem em duas etapas. Inicialmente, passaram por um moinho de disco LM3600 (Perten Instruments AB, Huddinge, Suécia) ajustado para a abertura de 0 e, posteriormente, foram moídos em um moinho de martelo LM3100 (Perten Instruments AB, Huddinge, Suécia) com uma peneira de abertura de 0,8 mm. A farinha resultante foi processada em uma extrusora co-rotativa de dupla rosca modelo Evolum HT25 (Cletral Inc., Firminy, França), que possui rosca com diâmetro de 25 mm, relação comprimento: diâmetro de 40:1 e dez zonas de aquecimento com temperatura controlada operando na velocidade de rotação de 500 rpm e equipada com matriz de único furo circular com 8 mm de diâmetro. O perfil de temperatura, a partir da zona de alimentação, foi fixado em diferentes valores: 30, 30, 40, 80, 110, 110, 110, 110, 110, 110 e 110 °C. A farinha integral de milho foi inserida na zona de alimentação da extrusora, por meio de um alimentador gravimétrico de perda de peso, modelo GRMD15 (Schenck Process, Darmstadt, Alemanha) e a alimentação foi ajustada para 10 kg/h usando uma rosca dupla. A vazão foi mantida constante e definida de acordo com os parâmetros necessários,

sendo monitorada pelo software Schenck Process Easy Serve (Schenck Process, Darmstadt, Alemanha). A água deionizada foi injetada, ajustando-se a vazão de água (L/h), entre a primeira e a segunda zona da extrusora por meio de uma porta com diâmetro interno de 5,25 mm usando uma bomba dosadora de êmbolo Super K PP 6.35 (DKM Clextral Inc., Firminy, França) para atender à umidade de 12%. A configuração da rosca da extrusora pode ser acessada no trabalho de Vargas-Solórzano *et al.* (2014). Em seguida, os extrusados foram submetidos a um processo de secagem em uma estufa com circulação de ar a 60 °C, por um período de 2 horas. Após a secagem, foram embalados e transportados por via terrestre para a Universidade Federal de Viçosa, campus Viçosa. Os extrudados foram porcionados em embalagens plásticas, utilizando uma balança digital modelo 9094C/5 (Toledo, São Paulo, Brasil). Em seguida, as embalagens foram lacradas por meio de uma máquina seladora, etiquetadas e armazenadas em um freezer a -20 °C, até o momento da produção da farinha integral.

5.5 Tratamento térmico dos grãos de milho não germinados e germinados

Visando mimetizar a forma potencial de consumo humano dos grãos de milho, um tratamento térmico (cozimento úmido) foi aplicado aos grãos anteriormente à etapa de preparo das farinhas integrais. Os grãos de milho não germinados e germinados utilizados no estudo I deste trabalho foram cozidos, com base no protocolo proposto por Dias-Martins *et al.* (2018), com algumas adaptações. O processo de cozimento convencional aconteceu em panela aberta à 180 °C por 40 minutos e nas proporções grão/água de 1:4 para os grãos de milho não germinado e 1:5 para os de milho germinado. Após, ocorreu a secagem dos grãos cozidos em estufa de circulação de ar à 50 °C por 24 horas (DIAS-MARTINS *et al.*, 2018; PUSHPARAJ; UROOJ, 2014).

5.6 Preparo das farinhas integrais de milho

A produção das farinhas integrais de milho, incluindo não germinado cozido (NMF), germinado cozido (GMF) e extrudado (EMF), foi baseada na metodologia utilizada por Theodoro *et al.* (2021). Os grãos referentes a cada processamento foram moídos em moinho de martelos, modelo MA-090CFT (Marconi, São Paulo, Brasil) a 3000 rpm, contendo uma peneira de aberturas de 1,0 mm para a aquisição das farinhas integrais utilizadas no estudo. As três farinhas integrais obtidas foram acondicionadas em sacos de polietileno, devidamente rotuladas e armazenadas em freezer (-20 °C).

Estudo I

5.7 Análise de composição centesimal

Foi realizada análise da composição química centesimal das NMF e GMF, em triplicata e de acordo com os procedimentos padrões descritos pela AOAC (2019).

5.7.1 Umidade

A determinação de umidade foi realizada pelo método de secagem em estufa, deixando as amostras a 105 °C, por um período de 24 h. As amostras foram pesadas em placa de *petri* antes da secagem e depois desta, seguindo protocolo proposto pela AOAC (2019). O percentual de umidade foi calculado pela diferença entre peso inicial e final de cada amostra, multiplicado por 100.

5.7.2 Cinzas totais

O teor de cinzas foi determinado por meio da metodologia descrita pela AOAC (2019). 2,5 gramas de cada amostra da farinha integral de milho (NMF e GMF) foi pesado, seguida da incineração em mufla, com temperatura entre 300 °C e 600 °C, durante 9 horas. Após a incineração, as cinzas foram armazenadas em dessecador, até que atingissem temperatura ambiente. A diferença de peso correspondeu às cinzas totais de cada amostra. A porcentagem (%) de cinzas totais foi calculada pela diferença entre peso inicial e final da amostra, multiplicado por 100.

5.7.3 Lipídios

A extração de lipídios foi realizada em aparelho Soxhlet, com éter de petróleo como solvente. Os procedimentos de extração de lipídios seguiram o protocolo proposto pela AOAC (2019). Pesaram-se 5 gramas de cada amostra seca em estufa, em papel de filtro, e foram transferidos para o aparelho extrator tipo Soxhlet. A extração ocorreu por 8 horas em chapa elétrica aquecida. Após, os balões com o resíduo extraído foram transferidos para uma estufa com circulação de ar à 105 °C por 24 horas. Após o resfriamento em dessecador, as amostras foram pesadas. O teor de lipídios (%) foi calculado pelo teor de lipídios na amostra, dividido pelo peso da amostra e multiplicando por 100.

5.7.4. *Proteínas*

A análise de proteínas foi realizada pelo método de micro Kjeldahl. Os procedimentos de extração de proteína seguiram o protocolo proposto pela AOAC (2019). Pesou-se 0,5 g de cada amostra de farinha integral seca de milho, adicionou-se 3 ml de ácido sulfúrico e 1 g de mistura digestora. As amostras foram aquecidas em bloco digestor, seguido da destilação do extrato utilizando NaOH 50% e 3 ml de ácido bórico.

Realizou-se uma titulometria de neutralização, onde: o número de miliequivalente do ácido = número de miliequivalente da base, ou seja, n° de meq do HCl = n° de meq do N (ml do ácido x normalidade do ácido = peso N (g) / meq do N) peso N (g) = ml do ácido x normalidade do ácido x 0,014 e peso N (mg) = ml do ácido x normalidade do ácido x 14. A porcentagem de proteína total foi obtida pela multiplicação do teor de N (nitrogênio), encontrado pela titulação, pelo fator de 6,25.

5.7.5 *Fibra alimentar*

Os teores de fibra alimentar total (TDF), fibra alimentar insolúvel (IDF) e fibra alimentar solúvel (SDF) da amostra foram determinados pelo método enzimático gravimétrico (AOAC, 2019). A TDF foi obtida por meio da relação entre os valores de SDF e IDF considerando-se a base em que cada amostra foi utilizada (úmida ou seca) e fazendo as devidas correções.

Para a determinação de fibras alimentares houve tratamento prévio de cada amostra utilizando a combinação de enzimas e soluções tampões em diferentes níveis de pH e temperaturas, para completa remoção do amido e parcial remoção da proteína. O kit enzimático utilizado foi o SIGMA[®] Total Dietary Fiber Assay contendo três enzimas (alfa-amilase termoestável, protease e amiloglucosidase). As amostras digeridas foram submetidas à determinação de fibra alimentar insolúvel, seguida da fibra alimentar solúvel, ambas por meio de sistema de filtração à vácuo. Após, as amostras foram secas em estufa com circulação de ar à 105 °C por 8 horas, resfriadas em dessecador, até que atingissem temperatura ambiente, e pesadas. Dessa etapa foram obtidos os valores utilizados para os cálculos de determinação das fibras alimentares.

O cálculo utilizado para determinação da quantidade de fibra insolúvel da amostra encontra-se abaixo:

$$\text{IDF \%} = \frac{\text{RI} - \text{P} - \text{C} - \text{BI}}{\text{m}} \times 100$$

Onde,

RI = Média do resíduo insolúvel da amostra (mg);

P = Média de proteína do RI (mg);

C = Média de Cinzas do RI (mg);

m = Média do peso das amostras (mg);

BI = RI_B - P_B - C_B;

RI_B = Média do resíduo insolúvel do branco (mg);

P_B = Média de proteína do RI_B (mg);

C_B = Média de cinzas do RI_B (mg).

O cálculo utilizado para determinação da quantidade de fibra solúvel da amostra encontra-se abaixo:

$$\text{SDF \%} = \frac{\text{RS} - \text{P} - \text{C} - \text{BS}}{m} \times 100$$

Onde,

RI = Média do resíduo solúvel da amostra (mg);

P = Média de proteína do RS (mg);

C = Média de Cinzas do RS (mg);

m = Média do peso das amostras (mg);

BS = RS_B - P_B - C_B;

RS_B = Média do resíduo solúvel do branco (mg);

P_B = Média de proteína do RS_B (mg);

C_B = Média de cinzas do RS_B (mg).

5.7.6 Determinação do teor de carboidratos e do valor calórico

A quantidade de carboidratos foi calculada por diferença, em que todos os percentuais encontrados para proteínas, fibra alimentar, lipídios, umidade e cinzas foram somados e depois subtraídos de 100%.

Os valores calóricos das farinhas integrais de milho foram calculados a partir dos teores de proteínas, lipídios e carboidratos, utilizando os coeficientes específicos que consideram o calor de combustão e a digestibilidade. O cálculo do valor calórico foi obtido por

meio dos princípios propostos por Merrill e Watt (1955), e calculados de acordo com o sistema Atwater: 4 - 9 - 4 kcal/g para os valores de proteínas, lipídios e carboidratos, respectivamente.

$$\text{Valor Calórico (\%)} = (A \times 4) + (B \times 9) + (C \times 4)$$

Onde,

A = Valor de Proteínas;

B = Valor de Lipídios;

C = Valor de Carboidratos.

5.8 Determinação do perfil de aminoácidos

A análise do perfil de aminoácidos de cada farinha integral de milho foi realizada no Laboratório de Bioquímica da Embrapa Agroindústria de Alimentos, localizada no Rio de Janeiro – RJ, de acordo com os métodos AOAC 994.12/2000 (AOAC, 2000) e Liu *et al.* (1995). Os resultados foram comparados ao perfil de aminoácidos essenciais da caseína, que foi utilizada como proteína padrão, bem como às necessidades diárias de aminoácidos essenciais para crianças com idade entre 6 meses e 3 anos propostos pela FAO (2013).

5.9 Determinação de ácido fítico

A concentração de ácido fítico foi determinada por cromatografia de troca iônica e espectrometria (LATTA; ESKIN, 1980) com modificações (ELLIS; MORRIS, 1986). Para a extração do ácido fítico, foram pesados 0,5 g de cada farinha integral de milho e adicionados 5 ml de HCl 2,4%, permanecendo sob agitação horizontal por 12 horas a 250 rpm. O extrato foi centrifugado a 2.865 g (Hermle, modelo Z216MK, Alemanha) por 15 minutos. Posteriormente, o extrato foi analisado de acordo com um kit específico (procedimento de ensaio padrão da K-PHYT 08/14 Megazyme, Irlanda). O ácido fítico foi determinado colorimetricamente por espectrofotômetro MultiskanTM GO (Thermoscientific, Waltham, EUA) a 655 nm. Uma curva analítica de ácido fítico foi preparada em concentrações de 10–100 L/mL, para expressar a concentração de ácido fítico em g/100 g de farinha integral de milho.

5.10 Determinação de taninos

A determinação dos taninos foi realizada pela reação de vanilina/HCl (BURNS, 1971) com modificações (MAXSON; ROONEY, 1972; PRICE; SCOYOC; BUTLER, 1978). Foram

pesadas 200 mg de cada farinha integral de milho e adicionada uma solução de 10 mL de HCl a 1% em metanol. Os tubos foram colocados em agitador automático MA093 (Marconi, Piracicaba, Brasil) (80 g, 20 min., 30 °C) para extração do tanino. Em seguida, foram centrifugados em centrífuga modelo Z216MK (Hermle, Wehingen, Alemanha) a 2.865 g por 20 minutos. Alíquotas de 1 mL de sobrenadante foram adicionadas a 2,5 mL de solução de vanilina a 1% em metanol e 2,5 mL de solução de HCl a 8% em metanol. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermoscientific, Waltham, EUA) a 500 nm. Os resultados foram expressos em miligramas de catequina por grama de amostra (mg EC/g) de acordo com a curva analítica de catequina. Para a construção da curva, 200 mg de catequina foram pesados em frasco volumétrico (200 mL) e o volume foi completado com metanol. Retiraram-se as alíquotas de 5, 10, 20, 25 e 50 mL de solução concentrada e a leitura da absorbância foi feita nas mesmas condições descritas para as amostras.

5.11 Determinação de fenólicos totais

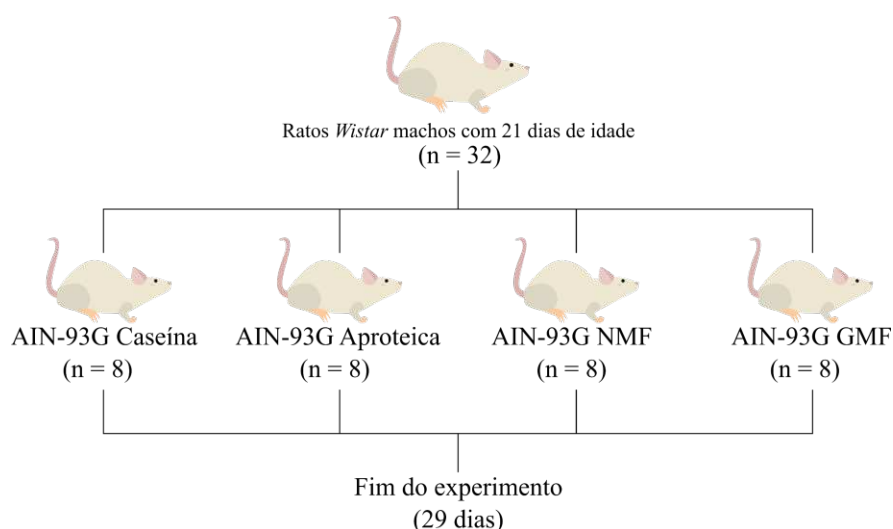
Para preparação do extrato, foi pesado 1 g de amostra em tubo. Em seguida, foi realizada a suspensão da amostra em 10 mL de solução contendo 80% de acetona. Os tubos foram colocados em um agitador automático e agitados por 2 horas para promover a extração dos compostos desejados. Após esse período, a solução foi submetida a uma centrifugação de 10 minutos a 1.008 g. O sobrenadante resultante foi transferido para outro tubo e armazenado sob refrigeração até o momento das análises (AWIKA *et al.*, 2003). A determinação do conteúdo total de compostos fenólicos nas farinhas integrais foi realizada utilizando o método do reagente de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). Para a análise, foram adicionados 500 µL de extrato a uma solução de Folin-Ciocalteu a 20% (500 µL) e uma solução de carbonato de sódio a 7,5% (500 µL). Em seguida, a solução foi agitada em vórtex e deixada em repouso por 30 minutos, à temperatura ambiente (25 °C). A absorbância foi medida em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermoscientific, Waltham, EUA) a 765 nm. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando uma curva analítica obtida por meio da leitura da absorvância de soluções com diferentes concentrações de ácido gálico. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (mg GAE/g).

5.12 Delineamento experimental

Trinta e dois ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*), da linhagem *Wistar*, recém-desmamados e com 21 dias de idade, foram adquiridos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, MG. Os animais foram transportados em caixas de polietileno, com até cinco ratos em veículo com ar condicionado até o Laboratório de Nutrição Experimental, situado no Departamento de Nutrição e Saúde da UFV, onde ocorreram os procedimentos experimentais.

Os animais foram divididos por meio de randomização em quatro grupos experimentais, de modo que a média de peso entre os grupos não excedeu 5 gramas. Os animais foram alocados em gaiolas individuais, com temperatura controlada de 22 ± 3 °C e fotoperíodo de 12 horas, onde receberam água e suas respectivas dietas experimentais *ad libitum*. Os animais foram distribuídos em 4 grupos experimentais: (I) controle caseína (CC) que recebeu dieta padrão AIN-93G; (II) controle aprotéico (AC) que recebeu dieta AIN-93G isenta de proteína; (III) grupo milho não germinado (NM) que recebeu dieta AIN-93G com 75% da proteína proveniente de farinha integral de milho não germinado cozido (NMF) em substituição a proteína da dieta; e (IV) grupo milho germinado (GM) que recebeu dieta AIN-93G com 75% da proteína proveniente de farinha integral de milho germinado cozido (GMF) em substituição a proteína da dieta (figura 3). O peso corporal e o consumo alimentar dos animais foram registrados semanalmente por meio de balança digital durante o período experimental de quatro semanas.

Figura 3 – Desenho experimental do estudo I



NMF (farinha integral de milho não germinado); GMF (farinha integral de milho germinado). Fonte: Autoria própria.

5.12.1 Cálculo amostral

Para calcular o número de repetições estimado utilizou-se o cálculo do “n” amostral para estudos descritivos conforme detalhado por Fontelles *et al.* (2010). Não foi realizado experimento prévio para cálculo do número de repetições ideal, pois seria necessário a utilização de animais adicionais. Portanto, utilizou-se dados de um estudo publicado em que ratos *Wistar* receberam dieta AIN-93G, semente de chia não tratada e tratada termicamente e farinha de chia não tratada e com tratamento térmico (DA SILVA *et al.*, 2016). Considerou-se $\alpha=5\%$, e, portanto, um $z\frac{\alpha}{2} = 1,96$, conforme utilizado nos estudos de saúde (FONTELLES *et al.*, 2010). Para calcular o tamanho amostral, utilizou-se a seguinte equação:

$$n = \frac{s^2}{(\underline{x}-\mu)^2} \times (z\frac{\alpha}{2})^2 \rightarrow n = \frac{(26,85)^2}{(19)^2} \times (1,96)^2 \rightarrow n = 7,67 \text{ animais/grupo.}$$

Onde,

n = Número de animais por grupo;

s^2 = Variância dos dados de referência;

$\underline{x} - \mu$ = Diferença máxima razoável, admitida entre a média obtida da amostra e a verdadeira média da população;

$z\frac{\alpha}{2}$ = Erro alfa do tipo I, determinado por meio da tabela de valores críticos da distribuição normal gaussiana.

Assim, o número de repetições calculado foi de 7,67 animais por grupo. Portanto, considerando-se possíveis perdas, optou-se por utilizar 8 animais por grupo. Dado que havia 4 grupos experimentais, foram necessários um total de 32 animais.

5.12.2 Preparação e composição de dietas experimentais

A composição das dietas foi baseada na dieta AIN-93G, segundo Reeves, Nielsen e Fahey (1993), tomando a composição química da farinha integral de milho não germinado e de milho germinado e adaptando a dieta para prover 9,5% de proteína. Elaborou-se uma dieta padrão caseína, uma apteica e duas dietas utilizando farinha de milho, de acordo com a metodologia proposta por Silva *et al.* (2020). Nas dietas em que se utilizaram as farinhas integrais de milho cozido (NMF e GMF), houve a substituição de 75% da fonte proteica da dieta. De posse do resultado das composições centesimais das farinhas integrais de milho

cozidos, a determinação de 75% foi escolhida ponderando o maior percentual possível de proteína advindo das farinhas integrais de milho cozido e da recomendação de ingestão dietética descrita por Reeves, Nielsen e Fahey (1993), em especial a de fibra alimentar (5 g/100 g). Dessa forma, optou-se por ofertar 75% da proteína por meio das farinhas integrais de milho e aumentar a recomendação de fibra alimentar de todos os grupos experimentais para 6,99 g/100 g de dieta. Todas as dietas foram formuladas de modo que fossem isocalóricas e isoproteicas (tabela 3).

Tabela 3 – Composição das dietas experimentais

Ingredientes (g/100g)	Dietas Experimentais			
	AIN-93G Caseína	AIN-93G Aproteica	AIN-93G + NMF	AIN-93G + GMF
Caseína	12,02	0,00	3,00	3,00
GMF	0,00	0,00	0,00	55,58
NMF	0,00	0,00	55,31	0,00
Maltodextrina	13,20	13,20	13,20	13,20
Amido de Milho	45,74	57,76	7,78	8,54
Sacarose	10,00	10,00	10,00	10,00
Óleo de Soja	7,00	7,00	4,70	4,58
Celulose	6,99	6,99	0,96	0,05
Mix Minerais	3,50	3,50	3,50	3,50
Mix de Vitaminas	1,00	1,00	1,00	1,00
L-cistina	0,30	0,30	0,30	0,30
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Composição das dietas (%)				
Carboidratos	68,94	80,96	66,15	65,98
Proteínas	9,50	0,00	9,49	9,50
Lipídios	7,00	7,00	7,00	7,00
Densidade calórica (kcal/g)	3,8	3,9	3,7	3,6

NMF (farinha integral de milho não germinado); GMF (farinha integral de milho germinado).

Todos os ingredientes foram pesados em balança semi-analítica da marca GEHACA[®] (São Paulo, Brasil), modelo BG2000, misturados manualmente e peneirados em peneiras de plástico. Os ingredientes foram homogeneizados em bateadeira industrial da marca Leme[®] por 15 minutos. As dietas foram acondicionadas em sacos de polietileno, devidamente rotulados e armazenados em freezer (-20 °C). A concentração real de proteína de cada dieta foi determinada pelo método micro Kjeldhal (conforme detalhado no tópico 5.7.4), usando o fator de 6,25.

5.11.3 Determinação da digestibilidade verdadeira

Para a determinação da digestibilidade verdadeira (TD), as dietas foram marcadas com índigo carmim na proporção 200 mg de índigo carmim/100 g de dieta experimental e oferecidas aos animais no 8º e 12º dia, segundo o método da AOAC (2019). As fezes foram coletadas do 9º ao 13º dia em recipientes individuais para cada animal.

Ao término do experimento, realizou-se a análise de umidade das fezes, pelo método de secagem em estufa, deixando a amostra em estufa a 105 °C, por 24 horas até que a amostra atingisse peso constante. Em placa de *petri* foi pesado 10 gramas da amostra antes da secagem e depois desta, seguindo protocolo proposto pela AOAC (2019). Em seguida, as amostras secas foram trituradas em multiprocessador para seguir a determinação da concentração de nitrogênio, pelo método micro Kjeldahl, com amostras em triplicata, segundo AOAC (2019), conforme detalhado no tópico 5.7.4. A digestibilidade verdadeira foi calculada a partir da quantidade de nitrogênio ingerido na dieta, a quantidade excretada nas fezes e a perda metabólica nas fezes, que corresponde ao nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica. O cálculo da TD foi feito de acordo com a seguinte equação (BENDER; DOELL, 1957):

$$(\%) \text{ TD} = \frac{I - (F - FK)}{I} \times 100$$

Onde,

TD = Digestibilidade;

I = Nitrogênio ingerido pelo grupo com dieta teste;

F = Nitrogênio fecal do grupo com dieta teste;

FK = Nitrogênio fecal do grupo com dieta aprotéica.

5.12.4 Determinação do coeficiente de eficiência proteica

O coeficiente de eficiência proteica (PER) foi determinado por meio do método de Osborne, Mendel e Ferry (1919) e de acordo com a AOAC (2019), utilizando a seguinte equação:

$$\text{PER} = \frac{\text{Ganho de peso (g) do grupo teste}}{\text{Proteína consumida (g) pelo grupo teste}}$$

5.12.5 Determinação da razão proteica líquida

A razão proteica líquida (NPR) foi determinada de acordo com Bender e Doell (1957), pela seguinte equação:

$$\text{NPR} = \frac{\text{Ganho de peso GI (g)} + \text{Perda de peso GII (g)}}{\text{Proteína consumida GI (g)}}$$

Onde,

GI = Grupo em dieta proteica;

GII = Grupo em dieta aprotéica.

5.12.6 Determinação do escore químico corrigido pela digestibilidade

O escore químico corrigido pela digestibilidade (PDCAAS) foi determinado comparando a concentração do primeiro aminoácido essencial limitante na proteína teste e a concentração desse aminoácido na proteína padrão. O escore químico (método *in vitro*) obtido foi corrigido pela digestibilidade fecal da proteína teste (método *in vivo*), utilizando a seguinte equação (SCHAAFSMA, 2005):

$$\text{PDCAAS} = \text{Escore químico (CS)} \times \text{Digestibilidade verdadeira (TD)}$$

5.12.7 Medidas murinométricas

A determinação das medidas murinométricas dos animais experimentais foram aferidos no início e ao final do estudo. Dentre elas, foram medidas o comprimento nasoanal, o ganho de peso, índice de Lee e a circunferência abdominal.

O peso foi mensurado por pesagem em balança de precisão modelo M2K (Marte, Minas Gerais, Brasil). O comprimento nasoanal (NA) foi aferido, com fita métrica inelástica, entre a região anal até o nariz do animal. A circunferência abdominal foi aferida também com fita métrica inelástica, no ponto médio entre o crânio e os membros pélvicos do animal. O índice de Lee é um método utilizado para analisar os índices de adiposidade em animais, e foi calculado ao final do experimento por meio da fórmula (REYNÉS *et al.*, 2014):

$$\text{Índice de Lee} = \sqrt[3]{\frac{\text{BW (g)}}{\text{NA (cm)}}}$$

Onde,

BW = Peso corporal do animal;

NA = Comprimento nasoanal.

5.12.8 Coeficiente de eficiência alimentar

O coeficiente de eficiência alimentar (FER) foi mensurado pela relação entre o ganho de peso (g) dos animais e a quantidade total de dieta consumida (g) (NKRUMAH *et al.*, 2006):

$$FER = \frac{WII - WI (g)}{TDC (g)}$$

Onde,

WII = Peso final (g) do animal;

WI = Peso corporal do animal no início do experimento em gramas;

TDC = Consumo total de dieta ingerida no período experimental (g).

5.12.9 Eutanásia

Ao final da 4ª semana experimental, após jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com Isoflurano (Isoforine, Cristália®) e eutanasiados por punção cardíaca. O sangue foi coletado em tubos heparinizados para análises bioquímicas e centrifugados a 1.006 g, 4 °C, 10 minutos para obtenção do soro e plasma.

Foram coletados e pesados o duodeno, cólon e conteúdo cecal, seguidos de armazenamento para análises posteriores. As amostras de cólon foram colocadas em solução de formaldeído 10% para posterior análise histológica. O conteúdo do ceco, o duodeno e as porções restantes do cólon foram coletados e armazenados em ultrafreezer a temperatura de -80 °C até o início das análises.

5.12.10 Análise bioquímica

A determinação das análises bioquímicas foi realizada no plasma sanguíneo. Foram analisados aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT), ácido úrico, glicose plasmática, triglicerídeos (TGL), colesterol total (TC), lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL). As análises foram realizadas por métodos colorimétricos utilizando kits disponíveis comercialmente de acordo com as instruções do

fabricante (Bioclin[®], Belo Horizonte, Brasil) e analisados em aparelho espectrofotômetro 606 Evolution (Thermo Scientific[®], Califórnia, EUA).

5.12.11 Análises da saúde intestinal

5.12.11.1 Análise histológica

Fragmentos das porções intestinais do cólon ascendente foram coletados dos animais de cada grupo experimental, fixados em lâminas histológicas. Foram obtidos cortes histológicos transversais semi-seriados com 3 µm de espessura em micrótomo automático e, posteriormente, foram submetidos à coloração pela técnica com hematoxilina/eosina. As lâminas foram montadas e analisadas em microscópio de luz CX31 Olympus CX31 (Olympus, Tóquio, Japão). As imagens foram obtidas em câmera digital SC 020 por meio do software Analysis GETIT (Olympus, Tóquio, Japão), para posterior visualização e medição das alturas das criptas, espessura das criptas, espessuras das camadas musculares circulares e longitudinais, bem como o número das células caliciformes nas criptas. Foi avaliado 20 campos por animal, sendo realizada uma medida em cada campo, o que totalizou 120 medidas por grupo experimental. As imagens das secções histológicas foram capturadas com objetiva de 10X e 20X. As medidas foram analisadas com auxílio do aplicativo Image Pro-Plus[®] versão 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, EUA).

5.12.11.2 Extração de mRNA do tecido intestinal e síntese de cDNA

O duodeno foi macerado em nitrogênio líquido sob condições livres de RNase e as amostras foram aliqüotadas para extração de RNA total. O RNA total foi extraído com o reagente TRIzol (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EUA). O mRNA extraído foi usado para sintetizar o cDNA com o kit de transcrição reversa M-MLV (Invitrogen Corp., Grand Island, NY, EUA) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

5.12.11.3 Determinação da expressão gênica de proteínas envolvidas na saúde intestinal por transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR)

Os níveis de expressão gênica de mRNA no tecido duodenal envolvidos na saúde intestinal foram analisados por RT-qPCR. O master mix SYBR Green PCR da Applied Biosystems (Foster City, CA) foi empregado e as análises foram realizadas no StepOne™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, EUA) por meio do sistema de medição envolvendo Software SYBR-Green Fluorescence e Primer Express (Applied

Biosystems, Foster City, CA, EUA). Sequências de primers senso e antissenso para cada gene foram ordenadas (Choma Biotechnologies) para amplificar a aminopeptidase (AP): TCTCTCCTCAAACCACATGAA (direto), AGTTCAGGGCCTTCTCATATTC (reverso); sacarose isomaltase (SI): CCTCCAGAACACAATCCCTATAC (direta), GGAGAGGTGAGATGGGATTAGA (reversa); transportador de peptídeo 1 (PepT1): CCTGGTCGTCTGCATCATATT (direto), TTCTTCTCATCCTCATCGAACTG (reverso); proteína de transporte de sódio-glicose 1 (SGLT1): CATCCAGTCCATCACCAGTTAC (direto), CAATCAGGAAGCCGAGAATCA (reverso). As expressões relativas dos níveis de mRNA foram normalizadas por beta-actina de controle endógeno: TTCGTTGCCGGTCCACACCC (forward), GCTTTGCACATGCCGGAGCC (reverse). Todas as etapas foram realizadas em condições livres de RNase.

5.12.11.4 pH do conteúdo cecal

Para análise de pH das fezes, foi utilizado o conteúdo cecal de cada animal. 400 miligramas de amostra do conteúdo cecal foi diluída em 4 mililitros água deionizada e homogeneizada em agitador modelo vórtex mixer (Vixar, Plymouth, Inglaterra). O valor de pH foi obtido por meio de pHmetro digital, de acordo com metodologia proposta por Grancieri *et al.* (2017).


5.12.11.5 Extração de ácidos graxos de cadeia curta

Para a extração e análise das amostras de fezes, utilizou-se o seguinte protocolo: 500 mg do conteúdo do ceco foram homogeneizados em 1 mL de água Milli-Q utilizando um vortex. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e as etapas subsequentes seguiram o procedimento descrito por Siegfried, Ruckemann e Stumpf (1984). Após a preparação das amostras, realizaram-se análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando um cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 Dual acoplado a um detector de índice de refração (IR) Shodex RI-101, mantido a 40 °C. A coluna utilizada foi uma coluna de exclusão iônica Phenomenex Rezex ROA, com dimensões de 300 × 7,8 mm, também mantida a 40 °C. A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5 mM, com uma vazão de 0,7 mL/min. Para a construção da curva de calibração, utilizaram-se padrões dos ácidos acético, propiônico e butírico.

5.12.11.6 Escala de Bristol

As avaliações e anotações sobre a consistência das fezes foram medida por meio da escala de Bristol (CRISTOBAL; BARRERA, 2018; DOS SANTOS *et al.*, 2017; O'DONNELL; VIRJEE; HEATON, 1990). A escala descritiva e visual de sete pontos categoriza 7 tipos de fezes (figura 4).

Figura 4 – Tipos de fezes e características de acordo com a Escala de Bristol

Tipo	Imagem	Descrição
1		Grânulos duros e separados como nozes (difíceis de evacuar)
2		Em forma de salsicha, mas granuladas.
3		Semelhante a uma salsicha, mas com rachadura em sua superfície.
4		Como salsicha ou cobra, lisa e macia.
5		Gotas macias com bordas bem demarcadas (fáceis de evacuar)
6		Pedaços macios com bordas irregulares, fezes pastosas.
7		Líquidas, sem pedaços sólidos, totalmente líquidas

Fonte: dos Santos *et al.* (2017).

Quanto à cor, adotou-se, a seguinte classificação: (1) fezes marrom-escuras; (2) fezes castanho-claras; (3) fezes amareladas; (4) fezes descoloridas; (5) fezes de cor preta; (6) fezes de cor vermelha; (7) fezes esverdeadas, classificação adaptada a proposta por Silveira Júnior (1988). A validade da escala foi confirmada por Hammer e Phillips (1993).

5.13 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), processo nº 49/2021 (anexo A). Todos os procedimentos experimentais com os animais foram realizados em consonância com os princípios éticos na experimentação animal.

5.14 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão. Os tratamentos experimentais foram dispostos em um delineamento inteiramente casualizado com oito repetições ($n = 8$). A pressuposição homogeneidade de variâncias entre os grupos foi checada

por meio da consistência e distribuição das variáveis por meio dos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov.

Os tratamentos dos dados destes grupos foram realizados utilizando a análise de variância one-way ANOVA. Posteriormente, procedeu-se a comparação das médias pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. Independente da significância da interação entre os fatores optou-se pelo desdobramento dos fatores para estudo de seus efeitos. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism versão 8.0 (Massachusetts, Estados Unidos) considerando o nível de 5% de significância.

Estudo II

O ensaio clínico agudo foi realizado para a determinação do índice glicêmico da bebida funcional à base de milho e avaliação dos efeitos do seu consumo na resposta glicêmica e insulinêmica, bem como no apetite e consumo alimentar de adultos euglicêmicos e eutróficos. Esse ensaio clínico foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição Experimental (DNS/UFV), campus Viçosa – MG.

5.15 Desenvolvimento das bebidas

No Laboratório de Desenvolvimento de Novos Produtos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Viçosa, realizou-se o desenvolvimento das bebidas. Foram desenvolvidas oito bebidas (tabela 4), sendo elas as bebidas testes e as bebidas controles, com quatro sabores diferentes: bebida controle contendo maltodextrina (MCB; $n = 4$) e bebida teste contendo farinha de milho pérola extrudado (EMB; $n = 4$). Os ingredientes foram pesados em balança digital modelo 9094C/5 (Toledo, São Paulo, Brasil) e, em seguida, misturados com o auxílio de um *mixer* BMX201 (Britânia, Curitiba, Brasil) por um período de 1 minuto, à temperatura ambiente. O volume final de cada bebida atingiu aproximadamente 290 mL. O objetivo imediato foi utilizar essas bebidas (MCB e EMB) no estudo de intervenção aguda e avaliar o potencial da bebida de farinha de milho extrudado para consumo pela população em geral. Ambas as bebidas continham 25 g de carboidratos disponíveis (ISO, 2010), calculado com base na caracterização química e nutricional do milho e nas informações nutricionais dos rótulos dos demais ingredientes utilizados na preparação. Observaram-se quaisquer mudanças na cor e textura das bebidas que pudessem ser causadas pelos ingredientes utilizados em sua composição.

Tabela 4 – Composição das bebidas

Ingredientes (g)	Bebida de milho	Bebida controle
Água filtrada (mL)	250,00	250,00
Farinha de milho extrudado	30,00	0,00
Maltodextrina	0,00	21,00
Flavorizante		
Goiaba	7,00	7,00
Laranja	8,00	8,00
Maracujá	8,00	8,00
Morango	7,00	7,00

5.16 Análise sensorial das bebidas teste

Foram recrutados aleatoriamente participantes no campus Viçosa da UFV, por meio de anúncios, panfletos e cartazes, para participarem da análise sensorial dos quatro diferentes sabores da bebida com farinha integral de milho pérola extrudado. A pesquisa foi composta por indivíduos que concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme a resolução 196/96 do Conselho Nacional da Saúde (apêndice A). Foram selecionados 60 voluntários (homens e mulheres) com idades entre 18 e 75 anos, não treinados, interessados e disponíveis, que não tinham diabetes *mellitus* ou alergias a nenhum dos componentes das bebidas. Não foram incluídos os indivíduos que não atenderam aos critérios de inclusão mencionados acima, presença de efeitos adversos que os impedia de ingerir as bebidas ou manifestação de desejo de não participar da análise.

Os testes foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento de Novos Produtos do DNS/UFV, conduzidos em cabines individuais, as amostras foram rotuladas com um código de três dígitos não consecutivos e apresentadas aos consumidores de forma simultânea e monádica. Cada amostra foi avaliada individualmente, seguindo o delineamento de blocos inteiramente casualizados. Os participantes receberam um copo de água à temperatura ambiente e uma escala hedônica de nove pontos, variando de (1) desgostei extremamente a (9) gostei extremamente, para avaliar os atributos relacionados a aparência, sabor, textura e impressão global. Além disso, a atitude dos consumidores em relação à intenção de compra foi avaliada por meio de uma escala de 5 pontos, variando de 1 (certamente compraria) a 5 (certamente não compraria) (apêndice B). A bebida com maior aceitação sensorial foi selecionada para análise da composição química centesimal e para um estudo clínico agudo.

5.17 Composição química da bebida teste

A bebida formulada com farinha integral de milho pérola extrudado melhor aceita sensorialmente foi analisada quanto a carboidratos totais, proteínas, lipídios, fibra alimentar solúvel e insolúvel, valor calórico e fenólicos totais, juntamente com a bebida controle, conforme protocolo proposto no tópico metodológico 5.7 e 5.11. Além disso, foram realizadas análises dos carboidratos disponíveis, calculados pela subtração da quantidade de fibras alimentares dos carboidratos totais do alimento (SALES-CAMPOS *et al.*, 2010) e a quantificação de amido resistente, conforme descrito no tópico 5.17.1. A composição da bebida controle de maltodextrina foi determinada teoricamente com base nas informações nutricionais fornecidas nos rótulos dos ingredientes usados em sua preparação.

5.17.1 Amido resistente

O teor de amido resistente foi determinado utilizando-se uma digestão simulada com α -amilase pancreática e amiloglicosidase para extrair os componentes diferentes do amido resistente, como o amido solubilizado. A leitura indireta da fração do componente de interesse foi realizada em espectrofotômetro MultiskanTM GO (Thermo Fisher Scientifics, Waltham, EUA) a 510 nm, seguindo os procedimentos recomendados pelo kit enzimático da Megazyme® (AOAC, 2019).

Para hidrolisar e solubilizar o amido não resistente nas amostras de farinha de milho (100 \pm 5 mg), foram pesados duplicatas em tubos e adicionados 4 mL de solução de α -amilase pancreática contendo amiloglicosidase a 1%. Os tubos foram agitados em vórtex e incubados em banho-maria a 37 °C por 16 horas, com agitação contínua a 200 rpm. Em seguida, os hidrolisados foram tratados com 4 mL de etanol 99%, agitados em vórtex e centrifugados em centrífuga do modelo 204 NR (FANEM®, São Paulo, Brasil), por 10 minutos a 1.000 x g. O sobrenadante resultante foi descartado, e o precipitado foi ressuspensão em 2 mL de etanol 50% sob agitação em vórtex. Em seguida, foram adicionados mais 6 mL de etanol 50%, com nova agitação e centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante gerado foi descartado, e essas etapas de ressuspensão do precipitado, centrifugação e descarte do sobrenadante foram repetidas. Após o descarte, os tubos foram invertidos cuidadosamente em papel absorvente para remover o excesso de líquido.

Os sedimentos resultantes da centrifugação foram tratados com 2 mL de solução de KOH 2 M para dissolver o amido resistente sob agitação vigorosa em banho de gelo por 20 minutos. Em seguida, as soluções foram neutralizadas com 8 mL de solução de acetato de sódio

1,2 M (pH 3,8) e adicionadas de 0,1 mL de amiloglicosidase. Após agitação em vórtex e incubação em banho-maria a 50 °C por 30 minutos, com agitação em vórtex a cada 10 minutos para hidrolisar o amido derivado do amido resistente em D-glicose, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1.000 x g. O sobrenadante resultante foi diluído com água destilada em balões volumétricos de 50 mL. Aliquotas de 0,1 mL dos diluídos foram adicionadas a 3,0 mL do reagente de determinação de glicose (GOPOD) e incubadas em banho-maria a 50 °C por 20 minutos para medir a D-glicose. Amostras de branco (acetato de sódio, pH 4,5) e de padrão (D-glicose) também foram adicionadas ao GOPOD e incubadas nas mesmas condições. O teor de amido resistente foi medido indiretamente pela leitura da absorbância da D-glicose a 510 nm em um espectrofotômetro Evolution 60S (Thermo Scientific®, Califórnia, EUA). Foi utilizada a planilha disponível na plataforma online fornecida pelo Kit <www.megazyme.com> para o cálculo do conteúdo de amido resistente nas amostras.

5.18 Fase do ensaio clínico agudo

Os participantes foram recrutados por meio de anúncios na comunidade local e nas mídias sociais. Antes do início do estudo, todos os voluntários foram submetidos a uma avaliação de recrutamento, que incluiu: (1) questionário estruturado contendo perguntas relativas à idade, peso, estatura, hábito alimentar e estilo de vida, histórico pessoal e familiar de doenças (apêndice C) e, (2) questionário para avaliação do nível de atividade física habitual (IPAQ) (AINSWORTH *et al.*, 2000) (anexo B). Nesta fase, avaliaram-se as características antropométricas, como o peso, a estatura e o percentual de gordura corporal por bioimpedância do modelo BC-558 (Tanita®, Tóquio, Japão), a pressão arterial com um monitor de pressão arterial autoinflável modelo HEM-7200 (Omron, Quioto, Japão), a ingestão habitual por meio da aplicação de um questionário de frequência alimentar (FFQ) (apêndice D) e três registros alimentares de 24 horas (apêndice E), anotados em dias diferentes, não consecutivos, sendo dois decorrente de segunda-feira até sexta-feira e um de sábado ou domingo.

Foram incluídos no estudo indivíduos de ambos os sexos: (1) euglicêmicos (glicemia capilar de jejum variando de 70 a 99 mg/dL), (2) com ingestão regular de desjejum, (3) índice de massa corporal (BMI) entre 18,5 e 24,9 kg/m² e percentual de gordura corporal entre 20 e 30%, para o gênero feminino, e entre 12 e 20%, para o masculino (RUBIO HERERRA *et al.*, 2007), (4) idade entre 18 e 60 anos, (5) e nível de atividade física leve (AINSWORTH *et al.*, 2000). Entre os critérios de não inclusão foram: (1) fumantes, (2) consumo de álcool superior a 2 doses/dia (> 50 g de etanol/dia), (3) presença de diabetes tipo 1 ou 2 ou pré-diabetes (glicemia

de jejum entre 100 e 125 mg/dL), (4) história familiar de primeiro grau de diabetes *mellitus*; (5) uso de medicamentos que afetam a glicemia, o metabolismo energético ou o apetite, (6) uso de medicamentos, ervas ou dietas para redução do apetite e do peso corporal, (7) instabilidade de peso (ganho ou perda de mais ou menos 3 kg nos 3 meses anteriores ao início do estudo), (8) alteração recente do nível de atividade física, (9) aversão ou intolerância aos alimentos fornecidos no estudo, (10) existência ou histórico de doenças digestivas, hepáticas, renais, cardiovasculares, da tireoide ou inflamatórias recentes, diagnóstico de câncer no ano anterior, (11) relato de transtornos alimentares e, (12) ser gestante ou lactante. Os critérios de exclusão durante o ensaio foram: (1) se ausentar do ensaio por duas semanas consecutivas, (2) apresentar desconfortos durante as análises, como por exemplo, ânsia de vômito, enjoo e sensação de desmaio ou (3) por surgimento de algum dos critérios de não inclusão anteriormente citados.

5.19 Desenho do estudo

Trata-se de um ensaio clínico agudo simples-cego, randomizado, controlado e crossover. O cálculo do tamanho amostral foi baseado em Mera *et al.* (1998), considerando a área incremental abaixo da curva (iAUC) e o desvio padrão (SD) (iAUC= 629,8 ± 124) da resposta glicêmica pós-prandial como variável principal de acordo com os valores publicados por Morgan *et al.* (1990). Considerando-se também o poder estatístico de 80% ($\alpha < 0,20$; $\alpha = 1,363$) e uma diferença (E) de 10% da iAUC (629,8 x 0,10= 62,98). Acrescentou-se 10% sobre o valor encontrado devido às possíveis perdas, conforme fórmula a seguir:

$$n = \frac{2 \times (\alpha \times DP)^2}{E^2} \rightarrow n = \frac{2 \times (1,363 \times 124)^2}{62,98^2} \rightarrow n = 14,4 + 10\% \rightarrow n = 16 \text{ voluntários.}$$

Dessa forma, resultou-se em um tamanho amostral de 16 voluntários nesta fase do estudo. No entanto, fizeram parte do presente estudo 14 adultos euglicêmicos e eutróficos após a exclusão durante o estudo devido ao surgimento de fatores que impediram a continuidade na pesquisa.

Com o objetivo de minimizar possíveis interferências na resposta glicêmica, todos os voluntários consumiram um jantar padrão, que foi fornecido, na noite anterior a cada bebida testada. O jantar padronizado consistiu em 200 mL de suco de uva e 170 g de lasanha de frango (composta por 30 g de massa de lasanha e 60 g de frango desfiado, preparados com molho de tomate, cebola, alho, sal, óleo de soja, milho verde e mussarela, que forneceram 336 kcal, 61,4% de carboidratos, 23,4% de proteínas, 15,2% de lipídios). A composição nutricional dessa

refeição foi determinada de acordo com as informações do rótulo e as tabelas de composição nutricional (NEPA; UNICAMP, 2011). Além disso, para reduzir a variabilidade dentro do sujeito, os participantes foram instruídos a evitar o exercício físico 24 horas antes do teste e o consumo de álcool 48 horas antes do teste. Os voluntários se apresentaram ao laboratório após um jejum noturno de 10 horas para participarem de quatro sessões experimentais em dias não consecutivos, com um período de *washout* de pelo menos 2 dias. Ainda durante o jejum, avaliou-se a medida de peso corporal, bem como os níveis de glicemia, insulina e a sensação subjetiva de apetite. Em cada sessão, os participantes ingeriram uma das bebidas teste (MCB ou EMB) ou uma solução glicosada (contendo 25 g de glicose anidra em 250 mL de água filtrada), sendo esta última administrada em duas sessões. Todos os participantes consumiram suas respectivas bebidas dentro de um período de até 15 minutos. As bebidas foram preparadas com a mesma cor e sabor, com exceção da solução glicosada, e foram servidas em copos com tonalidade escura e fosca para minimizar possíveis condicionamentos visuais e gustativos. Utilizou-se o desenho de blocos randomizados (<www.random.org>) para determinar a ordem em que as bebidas foram consumidas por cada voluntário. Os voluntários permaneceram no laboratório por um período de 2 horas para a medição da glicemia pós-prandial, controle insulinêmico e avaliação das sensações subjetivas de apetite (figura 5). Durante este período não foi permitido aos participantes o consumo de qualquer alimento ou bebida.

Coletou-se amostras de sangue venoso em quatro momentos distintos: tempo 0 (jejum), 30, 60 e 120 minutos após o consumo da bebida, para avaliar a concentração sérica de insulina. As coletas foram realizadas por um enfermeiro e o sangue foi coletado em tubos contendo gel e ativador de coágulo. As amostras foram armazenadas sob refrigeração (0 a 4 °C) até o final das 2 horas de coleta. Após esse período, procedeu-se a centrifugação à 3.500 rpm, por 10 minutos, o soro foi separado e armazenado a -20 °C, sendo posteriormente encaminhado a um laboratório de análises clínicas da região para a medida da concentração de insulina. Por punção digital capilar foram coletadas amostras de sangue em diferentes momentos, incluindo -5 e 0 minutos (estado de jejum), além de 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após o consumo de cada bebida ou da carga de glicose. A concentração sérica de glicose foi medida usando o glicosímetro Accu-Chek Performa®. A área incremental sob a curva (iAUC) para a glicose e para a insulina foi calculada de 0 a 120 minutos, usando método trapezoidal, seguindo o protocolo da FAO (1998).

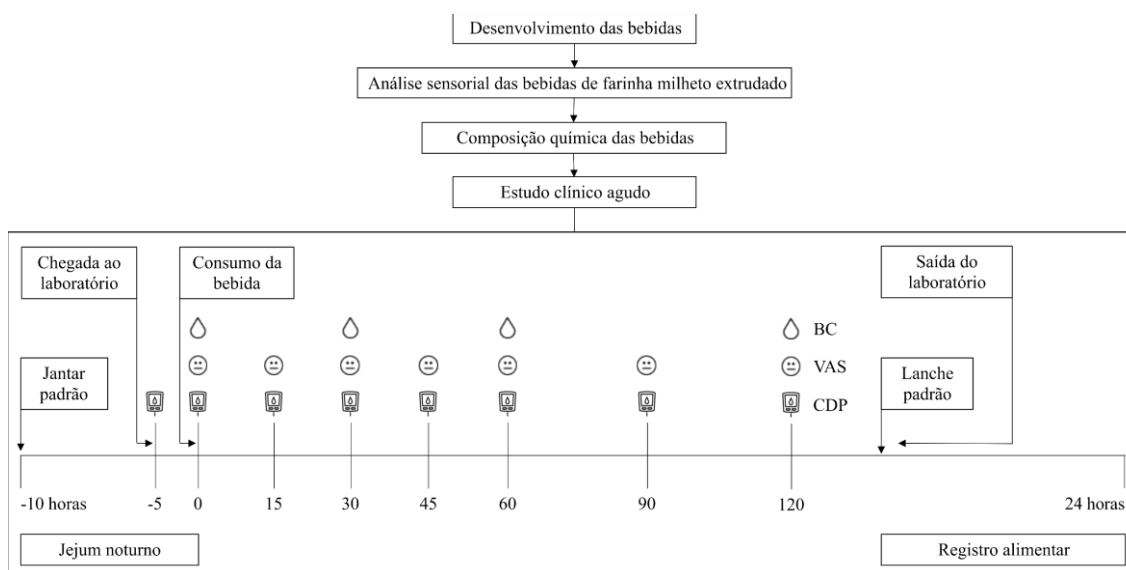
Para avaliar as sensações subjetivas do apetite, os participantes receberam as bebidas testadas sem identificação. Escalas visuais analógicas (VAS) de 100 mm (FLINT *et al.*, 2000)

foram usadas para avaliar essas variáveis (anexo C). As questões avaliaram fome, saciedade, plenitude, desejo de comer algo salgado, doce, gorduroso ou saboroso e consumo alimentar prospectivo (PFC). Os participantes foram instruídos por assistentes de pesquisa treinados sobre como preencher o VAS e foram solicitados a preencher a VAS em jejum (0 minutos) e, subsequentemente, aos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a ingestão das bebidas teste. As escalas foram pontuadas medindo a distância (em cm) a partir do ponto 0 com uma régua. Pontuações mais baixas de apetite estão associadas a uma maior supressão do apetite. As respostas da sensação de apetite foram avaliadas pelo cálculo da área sob a curva de 2 horas (AUC) pelo método trapézio (MATTHEWS *et al.*, 1990). Além disso, o escore composto de saciedade (CSS) foi calculado em cada momento da medida utilizando a seguinte equação:
$$\text{CSS (cm)} = (\text{saciedade} + \text{plenitude} + (100 - \text{PFC}) + (100 - \text{fome}))/4.$$
 Um CSS mais alto está associado a uma maior sensação de saciedade e uma subsequente menor motivação para comer (GILBERT *et al.*, 2012).

Para calcular todos os valores de iAUC no estudo, incluindo glicose, insulina, VAS e CSS, foi aplicada uma correção subtraindo os valores basais individuais das medições subsequentes, com o propósito de obter as variações (Δ).

Após a realização dessas avaliações, os participantes foram convidados a consumir um lanche padronizado *ad libitum*. Esse lanche foi o mesmo em todos os dias do estudo. Caso o participante decidisse não realizar essa refeição, ele foi aconselhado a manter esse comportamento nos outros dias de teste. Tal conduta é necessária para se evitar que variações de consumo afetem a avaliação da ingestão alimentar na primeira refeição após a saída do laboratório. Após a realização do lanche, os participantes foram liberados para seguir suas atividades diárias normais, em condições de vida livre, e foram solicitados a registrar os tipos e quantidades de alimentos consumidos nas 24 horas seguintes. Os participantes foram encorajados a manter o nível constante de atividade física e estilo de vida durante todo o estudo.

Utilizou-se um formulário específico para registrar a ingestão alimentar nas 24 horas após o consumo de cada bebida testada. As informações registradas incluíam o horário e o local das refeições, bem como os tipos e quantidades de alimentos consumidos, que puderam ser medidas em gramas ou em medias caseiras (apêndice E). Para garantir a precisão do registro alimentar, cada registro foi revisado na presença do voluntário. Os dados de gramas e ingestão calórica, macronutrientes e fibras alimentares registrados nos formulários foram analisados usando o software Avanutri[®] (Rio de Janeiro, Brasil).

Figura 5 – Delineamento experimental do estudo II

BC (coleta de sangue); VAS (escala visual analógica); CDP (punção digital capilar). Fonte: Autoria própria.

5.20 Determinação do índice glicêmico das bebidas

O método de cálculo da área sob a curva de resposta glicêmica foi utilizado para determinar o índice glicêmico de cada bebida. Esse cálculo envolve a comparação da área abaixo da curva de resposta glicêmica do alimento teste (MCB e EMB) com a média do alimento referência (glicose anidra) (FAO, 1998; ISO, 2010). A razão resultante foi multiplicada por 100 para expressar o GI em percentual. A média foi calculada com o GI dos quatorze indivíduos.

5.21 Aspectos éticos

O protocolo desse estudo II foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa (CEP/UFV), número do parecer 5.574.130, CAAE 53831921.5.0000.5153 (anexo D). Todos os voluntários foram devidamente esclarecidos quanto aos objetivos do projeto e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido antes de serem incluídos (apêndice F). Este estudo foi registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC), disponível em: <<http://www.ensaiosclinicos.gov.br>>, número de registro RBR-2tx7m8v.

5.22 Análises estatísticas

Os dados do teste sensorial foram submetidos a one-way análise de variância ANOVA, seguida do teste Tukey a 5% de significância. Para as demais variáveis, aplicaram-se os testes

de Kolmogorov–Smirnov e de Levene a fim de avaliar a normalidade da distribuição e a homoscedasticidade das variâncias, respectivamente. A análise de variância ANOVA-*two way* de medidas repetidas foi aplicada, seguida por teste de Bonferroni. Os dados foram apresentados como média e desvio padrão. As análises foram realizadas nos *softwares* GraphPad prism versão 8.0 (Dotmatics, Massachusetts, Estados Unidos) e Statistical Package for the Social Science (SPSS) versão 22.0 (IBM®, Nova Iorque, USA). O nível α de 5% foi considerado significativo.

REFERÊNCIAS

- ABAH, C. R. *et al.* Sorghum Grains: Nutritional Composition, Functional Properties and Its Food Applications. **European Journal of Nutrition & Food Safety**, v. 12, n. 5, p. 101–111, 2020.
- AGREGÁN, R. *et al.* The Effects of Processing Technologies on Nutritional and Anti-nutritional Properties of Pseudocereals and Minor Cereal. **Food and Bioprocess Technology**, v. 16, n. 5, p. 961–986, 2022.
- AINSWORTH, B. E. *et al.* Compendium of Physical Activities: an Update of Activity Codes and MET Intensities. **Medicine and science in sports and exercise**, 2000.
- ALEXANDRATOS, N.; BRUINSMA, J. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. [*s. l.*], 2012.
- ALYAMI, J. *et al.* Glycaemic, gastrointestinal, hormonal and appetitive responses to pearl millet or oats porridge breakfasts: a randomised, crossover trial in healthy humans. **British Journal of Nutrition**, v. 122, n. 10, p. 1142–1154, 2019.
- ALZAHIRANI, N. S. *et al.* Anti-Hyperlipidemia, Hypoglycemic, and Hepatoprotective Impacts of Pearl Millet (*Pennisetum glaucum* L.) Grains and Their Ethanol Extract on Rats Fed a High-Fat Diet. **Nutrients**, v. 14, n. 9, p. 1791, 2022.
- AMBATI, K.; SUCHARITHA, K. V. Millets-review on nutritional profiles and health benefits. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 10, p. 33943–33948, 2019.
- ANNOR, G. A. *et al.* Effects of the amount and type of fatty acids present in millets on their in vitro starch digestibility and expected glycemic index (eGI). **Journal of Cereal Science**, v. 64, p. 76–81, 2015.
- ANNOR, G. A. *et al.* Why do millets have slower starch and protein digestibility than other cereals?. **Trends in Food Science & Technology**, v. 66, p. 73–83, 2017.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. Gaithersburg: [*s. n.*], 2019.
- AOAC. **Official Methods of Analysis: Section 994.12.14th**. Washington, D.C., USA: [*s. n.*], 2000.
- ATTO SEMENTES. Híbridos de Milheto Graníferos. **Manual Técnico**, ATTO Sementes, [*s. l.*], 2021.
- AUGUSTIN, L. S. A. *et al.* Glycemic index, glycemic load and glycemic response: An International Scientific Consensus Summit from the International Carbohydrate Quality

- Consortium (ICQC). **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 25, n. 9, p. 795–815, 2015.
- AWIKA, J. M. *et al.* Screening Methods To Measure Antioxidant Activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 23, p. 6657–6662, 2003.
- BALASUBRAMANIAN, S. *et al.* Effect of selected dehulled legume incorporation on functional and nutritional properties of protein enriched sorghum and wheat extrudates. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 5, p. 572–579, 2012.
- BARRETT, A. H.; FARHADI, N. F.; SMITH, T. J. Slowing starch digestion and inhibiting digestive enzyme activity using plant flavanols/tannins— A review of efficacy and mechanisms. **LWT**, v. 87, p. 394–399, 2018.
- BENDER, A. E.; DOELL, B. H. Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. **British Journal of Nutrition**, v. 11, n. 2, p. 138–139, 1957.
- BERK, Z. **Food Process Engineering and Technology**. 3. ed. [S. l.]: Academic press, 2018. *E-book*.
- BERNARDO, C. O. *et al.* Impact of extruded sorghum genotypes on the rehydration and sensory properties of soluble beverages and the Brazilian consumers' perception of sorghum and cereal beverage using word association. **Journal of Cereal Science**, v. 89, p. 102793, 2019.
- BERTHOUD, H. R. Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: who is the boss?. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 21, n. 6, p. 888–896, 2011.
- BRASIL. **Resolução RDC nº 493, de 15 de abril de 2021**. Brasília: [s. n.], 2021.
- BRENNAN, M. A. *et al.* Amaranth, millet and buckwheat flours affect the physical properties of extruded breakfast cereals and modulates their potential glycaemic impact. **Starch - Stärke**, v. 64, n. 5, p. 392–398, 2012.
- BURATTI, S. *et al.* Influence of Cooking Conditions on Nutritional Properties and Sensory Characteristics Interpreted by E-Senses: Case-Study on Selected Vegetables. **Foods**, v. 9, n. 5, p. 607, 2020.
- BURBANO, C. *et al.* Determination of phytate and lower inositol phosphates in Spanish legumes by HPLC methodology. **Food Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 321–325, 1995.
- BURNS, R. E. Method for Estimation of Tannin in Grain Sorghum¹. **Agronomy Journal**, v. 63, n. 3, p. 511–512, 1971.
- CAMIRE, M. E.; KRUMHAR, K. Chemical and nutritional changes in foods during extrusion. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 29, n. 1, p. 35–57, 2009.

- CARDOSO, L. de M. *et al.* Phenolic compounds profile in sorghum processed by extrusion cooking and dry heat in a conventional oven. **Journal of Cereal Science**, v. 65, p. 220–226, 2015.
- CARMODY, R. N.; WRANGHAM, R. W. Cooking and the human commitment to a high-quality diet. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v. 74, p. 427–434, 2009.
- CHANDRASEKARA, A.; SHAHIDI, F. Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated in vitro digestion and microbial fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 1, p. 226–237, 2012.
- CHÁVEZ, D. *et al.* Sorghum, an alternative cereal for gluten-free product. **Revista chilena de nutrición**, v. 45, n. 2, p. 169–177, 2018.
- CHEN, J. *et al.* Effect of foxtail millet protein hydrolysates on lowering blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Nutrition**, v. 56, n. 6, p. 2129–2138, 2017.
- CHIAVAROLI, L. *et al.* Effect of low glycaemic index or load dietary patterns on glycaemic control and cardiometabolic risk factors in diabetes: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **BMJ**, v. 374, n. 11, p. 16, 2021.
- CHRISTODOULIDES, S. *et al.* Systematic review with meta-analysis: effect of fibre supplementation on chronic idiopathic constipation in adults. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 44, n. 2, p. 103–116, 2016.
- CIFUENTES, L.; ACOSTA, A. Homeostatic regulation of food intake. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 46, n. 2, p. 101794, 2022.
- COE, S.; SPIRO, A. Cooking at home to retain nutritional quality and minimise nutrient losses: A focus on vegetables, potatoes and pulses. **Nutrition Bulletin**, v. 47, n. 4, p. 538–562, 2022.
- COMETTANT-RABANAL, R. *et al.* Extruded whole grain flours and sprout millet as functional ingredients for gluten-free bread. **LWT**, v. 150, p. 112042, 2021.
- COSTA, E. *et al.* Seedlings of *Acrocomia aculeata* in different substrates and protected environments. **Engenharia Agrícola**, v. 34, n. 3, p. 395–404, 2014.
- CRISTOBAL, R. K. B.; BARRERA, M. N. S. Actividad laxante del Extracto Hidroalcohólico del fruto *Hylocereus undatus* (Haw) Britton & Rose “pitahaya roja” en ratones albinos de la especie *Mus musculus*. **Tesis de título profesional de químico farmacéutico**, Universidad Norbert Wiener, Lima, 2018.
- CÚNEO, F.; AMAYA-FARFAN, J.; CARRARO, F. Phytate distribution in stabilized rice bran treated with exogenous phytase. **Food Science and Technology**, v. 20, n. 1, p. 94–98, 2000.

- DA SILVA, B. P. *et al.* Soluble Extracts from Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) Affect Brush Border Membrane Functionality, Morphology and Intestinal Bacterial Populations In Vivo (*Gallus gallus*). **Nutrients**, v. 11, n. 10, p. 2457, 2019.
- DASSENKO, S. Effect of Milling, Fermentation and Cooking on Nutritive Value of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke). 1980. **Doctoral thesis in Philosophy**, Kansas State University, Manhattan, 1980.
- DE LOMBERA ROMERO, F. *et al.* Hypertension and dyslipidemia. **Revista Espanola de Cardiologia**, v. 51, p. 24–35, 1998.
- DIAS-MARTINS, A. M. *et al.* Potential use of pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) in Brazil: Food security, processing, health benefits and nutritional products. **Food Research International**, v. 109, p. 175–186, 2018.
- DOS SANTOS, L. A. *et al.* Tempo de trânsito intestinal de indivíduos portadores de síndrome metabólica pela escala de bristol. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 16, n. 3, p. 338–343, 2017.
- DUARTE, J. de O.; GARCIA, J. C. **Cultivo do Milheto**. [S. l.], 2016.
- DURÃES, F. O. M.; MAGALHÃES, P. C.; DOS SANTOS, F. G. Fisiologia da Planta de Milheto. **Embrapa Milho e Sorgo, Circular Técnica**, [s. l.], 2003.
- DUTRA-DE-OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S. Ciências nutricionais. *Em: Ciências Nutricionais*. [S. l.: s. n.], 1998. p. 403–403. *E-book*.
- ELLIS, R.; MORRIS, E. R. Appropriate resin selection for rapid phytate analysis by ion-exchange chromatography. **Cereal chemistry**, v. 63, n. 1, p. 58–59, 1986.
- ENGLYST, K. N. *et al.* Rapidly available glucose in foods: an in vitro measurement that reflects the glycemic response. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, n. 3, p. 448–454, 1999.
- FALUDI, A. A. *et al.* Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s. l.], v. 109, n. 2, p. 1–76, 2017.
- FAO. Carbohydrates in human nutrition. **Food and agriculture organization of the united nations**, Rome, v. 66, p. 11–14, 1998.
- FAO. Dietary protein quality evaluation in human nutrition. **FAO food and nutrition paper**, [s. l.], v. 92, p. 1–66, 2013.
- FAO. **How to Feed the World in 2050**. [S. l.: s. n.], 2015.
- FAO. Sorghum and millets in human nutrition. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, n. 27, 1995.

FAO *et al.* **The State of Food Security and Nutrition in the World 2022**The State of Food Security and Nutrition in the World 2022. Rome: FAO, 2022.

FAOSTAT. **Statistical Database of the United Nation Food and Agriculture Organization (FAO) statistical division**. [S. l.], 2022. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat>>. Acesso em: 14 abr. 2023.

FERNANDES, C. G.; SONAWANE, S. K.; ARYA, S. S. Cereal based functional beverages: A review. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 8, n. 3, p. 914–919, 2018.

FERREIRA, S. M.; CAPRILES, V. D.; CONTI-SILVA, A. C. Breakfast cereals with inulin obtained through thermoplastic extrusion: Chemical characteristics and physical and technological properties. **LWT**, v. 137, p. 110390, 2021.

FLINT, A. *et al.* Reproducibility, power and validity of visual analogue scales in assessment of appetite sensations in single test meal studies. **International Journal of Obesity**, v. 24, n. 1, p. 38–48, 2000.

FONTELLES, M. J. *et al.* Metodologia da pesquisa: diretrizes para o cálculo do tamanho da amostra. **Rev. para. med**, p. 57–64, 2010.

FRAME, L. A.; COSTA, E.; JACKSON, S. A. Current explorations of nutrition and the gut microbiome: a comprehensive evaluation of the review literature. **Nutrition Reviews**, v. 78, n. 10, p. 798–812, 2020.

FROST, G. *et al.* The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 1–11, 2014.

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

GANJYAL, G. M. **Extrusion Cooking: Cereal Grains Processing**. 2. ed. [S. l.]: Elsevier, 2020. *E-book*.

GILBERT, J. A. *et al.* The Effect of Tesofensine on Appetite Sensations. **Obesity**, v. 20, n. 3, p. 553–561, 2012.

GIORA, C. G. B. Avaliação in vivo da qualidade protéica da soja geneticamente modificada. 2015. **Dissertação de Mestrado em Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

GONZALEZ-IZUNDEGUI, D. *et al.* Association of gastric emptying with postprandial appetite and satiety sensations in obesity. **Obesity**, v. 29, n. 9, p. 1497–1507, 2021.

- GRANCIERI, M. *et al.* Yacon flour (*Smallanthus sonchifolius*) attenuates intestinal morbidity in rats with colon cancer. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 666–675, 2017.
- GUPTA, S. M. *et al.* Finger millet: A “certain” crop for an “uncertain” future and a solution to food insecurity and hidden hunger under stressful environments. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 643, 2017.
- GUTKOSKI, L. C. Características tecnológicas de frações de moagem de aveia e efeito de umidade e temperatura de extrusão na sua estabilidade. **Tese de Doutorado em Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.
- HAMMER, J.; PHILLIPS, S. F. Fluid loading of the human colon: Effects on segmental transit and stool composition. **Gastroenterology**, v. 105, n. 4, p. 988–998, 1993.
- HAN, N. R. *et al.* Glutamic acid ameliorates estrogen deficiency–induced menopausal-like symptoms in ovariectomized mice. **Nutrition Research**, v. 35, n. 9, p. 774–783, 2015.
- HARPER, J. M. Food Extrusion. *Em*: SINGH, R. P.; MEDINA, A. G. (org.). **Food Properties and Computer-Aided Engineering of Food Processing Systems**. [S. l.]: Springer, Dordrecht, 1989. p. 271–297. *E-book*.
- HARTONO, K. *et al.* Alterations in gut microflora populations and brush border functionality following intra-amniotic daidzein administration. **RSC Advances**, v. 5, n. 9, p. 6407–6412, 2014.
- HAYES, A. M. R. In vitro and in vivo investigations of carbohydrates with different digestibilities for improved satiety and metabolic health. 2021. **Doctoral Thesis in Postgraduate Philosophy**, Faculty of Purdue University, West Lafayette, 2021.
- HAYES, A. M. R. *et al.* Some pearl millet-based foods promote satiety or reduce glycaemic response in a crossover trial. **British Journal of Nutrition**, v. 126, n. 8, p. 1168–1178, 2021.
- HENROTTIN, J. *et al.* Gluten Analysis in Processed Foodstuffs by a Multi-Allergens and Grain-Specific UHPLC-MS/MS Method: One Method to Detect Them All. **Journal of AOAC International**, v. 102, n. 5, p. 1286–1302, 2019.
- HERVIK, A. K.; SVIHUS, B. The role of fiber in energy balance. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2019, 2019.
- HOLSCHER, H. D. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. **Gut microbes**, v. 8, n. 2, p. 172–184, 2017.
- ISO. **Food products — Determination of the glycaemic index (GI) and recommendation for food classification**. 1. ed. [S. l.]: ISO 26642:2010, 2010. *E-book*.

- IZAR, M. C. de O. *et al.* Posicionamento sobre o Consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular – 2021. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116, n. 1, p. 160–212, 2021.
- JAYAWARDANA, S. A. S. *et al.* Anti-inflammatory and Antioxidant Properties of Finger Millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) Varieties Cultivated in Sri Lanka. **BioMed Research International**, v. 2021, 2021.
- JEW, S. *et al.* Nutrient essentiality revisited. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 203–209, 2015.
- JHA, N.; KRISHNAN, R.; MEERA, M. S. Effect of different soaking conditions on inhibitory factors and bioaccessibility of iron and zinc in pearl millet. **Journal of Cereal Science**, v. 66, p. 46–52, 2015.
- KACED, I.; HOSENEY, R. C.; MARSTON, E. V. Factors affecting rancidity in ground pearl millet (*Pennisetum americanum* L. Leeke) [during storage]. **Cereal Chemistry**, 1984.
- KAIMAL, A. M.; MUJUMDAR, A. S.; THORAT, B. N. Resistant starch from millets: Recent developments and applications in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 111, p. 563–580, 2021.
- KASHYAP, P. C. *et al.* Genetically dictated change in host mucus carbohydrate landscape exerts a diet-dependent effect on the gut microbiota. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 42, p. 17059–17064, 2013.
- KIM, K.; YOON, H. Gamma-Aminobutyric Acid Signaling in Damage Response, Metabolism, and Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, p. 4584, 2023.
- KRISHNAN, R.; DHARMARAJ, U.; MALLESHI, N. G. Influence of decortication, popping and malting on bioaccessibility of calcium, iron and zinc in finger millet. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 169–174, 2012.
- 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.
- LEE, S. H. *et al.* Millet consumption decreased serum concentration of triglyceride and C-reactive protein but not oxidative status in hyperlipidemic rats. **Nutrition Research**, v. 30, n. 4, p. 290–296, 2010.
- LI, S. *et al.* Effects of millet whole grain supplementation on the lipid profile and gut bacteria in rats fed with high-fat diet. **Journal of Functional Foods**, v. 59, p. 49–59, 2019.
- LIANG, S.; LIANG, K. Millet grain as a candidate antioxidant food resource: a review. **International Journal of Food Properties**, v. 22, n. 1, p. 1652–1661, 2019.

- LIU, H. J. *et al.* Determination of Amino Acids in Food and Feed by Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate and Reversed-Phase Liquid Chromatographic Separation. **Journal of AOAC International**, v. 78, n. 3, p. 736–743, 1995.
- LIU, Lianliang *et al.* Evaluation of antihypertensive and antihyperlipidemic effects of bamboo shoot angiotensin converting enzyme inhibitory peptide in vivo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 45, p. 11351–11358, 2012.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- MARQUES, G. A. *et al.* O Efeito do Processamento por Extrusão Termoplástica na Qualidade Nutricional dos Alimentos: Uma Revisão. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences-JAPHAC**, v. 5, n. 1, p. 45–56, 2018.
- MATTHEWS, J. N. S. *et al.* Analysis of serial measurements in medical research. **British Medical Journal**, v. 300, n. 6719, p. 230–235, 1990.
- MAXSON, E. D.; ROONEY, L. W. Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. **Cereal Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 719–728, 1972.
- MERA, R. *et al.* How to Calculate Sample Size for an Experiment: A Case-Based Description. **Nutritional Neuroscience**, v. 1, n. 1, p. 87–91, 1998.
- MERRILL, A. L.; WATT, B. K. **Energy Value of Foods: Basis and Derivation**. Washington: United States Department of Agriculture, 1955.
- MEZZOMO, T. R.; NADAL, J. Efeito dos nutrientes e substâncias alimentares na função tireoidiana e no hipotireoidismo. **DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde**, v. 11, n. 2, p. 427–443, 2016.
- MOLLAKHALILI-MEYBODI, N. *et al.* Novel nonthermal food processing practices: Their influences on nutritional and technological characteristics of cereal proteins. **Food Science & Nutrition**, v. 10, n. 6, p. 1725–1744, 2022.
- MONDAL, D. *et al.* Microstructure, matrix interactions, and molecular structure are the key determinants of inherent glycemic potential in pearl millet (*Pennisetum glaucum*). **Food Hydrocolloids**, v. 127, p. 107481, 2022.
- MORGAN, L. M. *et al.* The effect of soluble- and insoluble-fibre supplementation on post-prandial glucose tolerance, insulin and gastric inhibitory polypeptide secretion in healthy subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 64, n. 1, p. 103–110, 1990.
- MOURA, L. S. de M. *et al.* Propriedades de absorção e solubilização de extrudados de farinha mista de feijão, milho e arroz biofortificados. 2011.

- MUKHOPADHYAY, N.; BANDYOPADHYAY, S. Extrusion cooking technology employed to reduce the anti-nutritional factor tannin in sesame (*Sesamum indicum*) meal. **Journal of food engineering**, v. 56, n. 2–3, p. 201–202, 2003.
- MUSA-VELOSO, K. *et al.* A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials on the Effects of Oats and Oat Processing on Postprandial Blood Glucose and Insulin Responses. **The Journal of Nutrition**, v. 151, n. 2, p. 341–351, 2021.
- NAGARAJU, M.; TIWARI, V. K.; SHARMA, A. Effect of extrusion on physical and functional properties of millet based extrudates: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 9, n. 6, p. 1850–1854, 2020.
- NANI, A. *et al.* Effects of polyphenols and lipids from *Pennisetum glaucum* grains on T-cell activation: Modulation of Ca²⁺ and ERK1/ERK2 signaling. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2015.
- NAZNI, P.; SHOBANA, D. R. Effect of processing on the characteristics changes in barnyard and foxtail millet. **Journal of Food Processing and Technology**, v. 7, n. 3, p. 1–9, 2016.
- NISKANEN, L. K. *et al.* Uric Acid Level as a Risk Factor for Cardiovascular and All-Cause Mortality in Middle-aged Men: A Prospective Cohort Study. **Archives of Internal Medicine**, v. 164, n. 14, p. 1546–1551, 2004.
- NKHATA, S. G. *et al.* Fermentation and germination improve nutritional value of cereals and legumes through activation of endogenous enzymes. **Food Science & Nutrition**, v. 6, n. 8, p. 2446–2458, 2018.
- NKRUMAH, J. D. *et al.* Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 1, p. 145–153, 2006.
- NEPA; UNICAMP. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO. **Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA)/Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)**, [s. l.], 2011.
- O’CONNOR, E. M.; O’HERLIHY, E. A.; O’TOOLE, P. W. Gut microbiota in older subjects: variation, health consequences and dietary intervention prospects. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 73, n. 4, p. 441–451, 2014.
- O’DONNELL, L. J. D.; VIRJEE, J.; HEATON, K. W. Detection of pseudodiarrhoea by simple clinical assessment of intestinal transit rate. **BMJ : British Medical Journal**, v. 300, n. 6722, p. 439, 1990.

- ONYEOZIRI, I. O. *et al.* Descriptive sensory analysis of instant porridge from stored wholegrain and decorticated pearl millet flour cooked, stabilized and improved by using a low-cost extruder. **Journal of Food Science**, v. 86, n. 9, p. 3824–3838, 2021.
- OSBORNE, T. B.; MENDEL, L. B.; FERRY, E. L. A method of expressing numerically the growth-promoting value of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 223–229, 1919.
- OSMAN, M. A. Effect of traditional fermentation process on the nutrient and antinutrient contents of pearl millet during preparation of Lohoh. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 10, n. 1, p. 1–6, 2011.
- OWHERUO, J. O.; IFESAN, B. O. T.; KOLAWOLE, A. O. Physicochemical properties of malted finger millet (*Eleusine coracana*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*). **Food Science & Nutrition**, v. 7, n. 2, p. 476–482, 2019.
- PEI, J. J. *et al.* A Review of the Potential Consequences of Pearl Millet (*Pennisetum glaucum*) for Diabetes Mellitus and Other Biomedical Applications. **Nutrients**, v. 14, n. 14, p. 2932, 2022.
- PESSANHA, K. L. F. *et al.* Impact of whole millet extruded flour on the physicochemical properties and antihyperglycemic activity of gluten free bread. **LWT**, v. 147, p. 111495, 2021.
- POUTANEN, K. S. *et al.* A review of the characteristics of dietary fibers relevant to appetite and energy intake outcomes in human intervention trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 106, n. 3, p. 747–754, 2017.
- PRÉCOMA, D. B. *et al.* Atualização da Diretriz de Prevenção Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia - 2019. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 113, n. 4, p. 787–891, 2019.
- PRICE, M. L.; SCOYOC, S. Van; 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.
- PRIYA *et al.* Millets: sustainable treasure house of bioactive components. **International Journal of Food Properties**, v. 26, n. 1, p. 1822–1840, 2023.
- PUSHPARAJ, F. S.; UROOJ, A. Antioxidant Activity in Two Pearl Millet (*Pennisetum typhoideum*) Cultivars as Influenced by Processing. **Antioxidants**, v. 3, n. 1, p. 55–66, 2014.
- RAGAEI, S.; ABDEL-AAL, E. S. M.; NOAMAN, M. Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 32–38, 2006.

- RAI, K. N. *et al.* Adaptation and Potential Uses of Sorghum and Pearl Millet in Alternative and Health Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 7, 2008.
- RAMASHIA, S. E. *et al.* Processing, nutritional composition and health benefits of finger millet sub-Saharan Africa. **Food Science and Technology**, v. 39, n. 2, p. 253–266, 2019.
- RAO DAYAKAR, B. *et al.* Nutritional and Health Benefits of Nutri Cereals. **Indian Institute of Millets Research**, 2018.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993.
- REN, X. *et al.* The Glucose-Lowering Effect of Foxtail Millet in Subjects with Impaired Glucose Tolerance: A Self-Controlled Clinical Trial. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1509, 2018.
- REYNÉS, B. *et al.* Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet. **Food Research International**, v. 64, p. 839–848, 2014.
- ROSPLESZCZ, S. *et al.* Association of serum uric acid with visceral, subcutaneous and hepatic fat quantified by magnetic resonance imaging. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020.
- RUBIO HERERRA, M. A. *et al.* Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. **Medicina Clínica**, v. 128, n. 5, p. 184–196, 2007.
- SAINI, S. *et al.* Potential of underutilized millets as Nutri-cereal: an overview. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 12, p. 4465–4477, 2021.
- SALAR, R. K.; PUREWAL, S. S. Phenolic content, antioxidant potential and DNA damage protection of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) cultivars of North Indian region. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 11, n. 1, p. 126–133, 2017.
- SALDIVAR, S. Cereals: dietary importance. *Em: Encyclopedia of food sciences and nutrition: Volumes 1-10*. 2. ed. Reino Unido: Elsevier Science B.V., 2003. p. 1027–1033. *E-book*.
- SALEEM, S. *et al.* Millets as smart future food with essential phytonutrients for promoting health. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 105669, 2023.
- SALES-CAMPOS, C. *et al.* Physicochemical analyses and nutritional composition of the raw material and substrates before and after cultivation of *Pleurotus ostreatus*. 2010.

- SANDBERG, A.-S; CARLSSON, N.-G; SVANBERG, U. Effects of Inositol Tri-, Tetra-, Penta-, and Hexaphosphates on In Vitro Estimation of Iron Availability. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 1, p. 159–161, 1989.
- SARITA; SINGH, E. Potential of Millets: Nutrients Composition and Health Benefits. **Journal of Scientific and Innovative Research**, v. 5, n. 2, p. 46–50, 2016.
- SAWAYA, W. N.; KHALIL, J. K.; SAFI, W. J. Nutritional quality of pearl millet flour and bread. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 34, n. 2, p. 117–125, 1984.
- SAWHNEY, S. K.; NAIK, M. S. Amino acid composition of protein fractions of pearl millet and the effect of nitrogen fertilization on its proteins. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 29, p. 395–406, 1969.
- SCHAAFSMA, G. The Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score (PDCAAS)—A Concept for Describing Protein Quality in Foods and Food Ingredients: A Critical Review. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 3, p. 988–994, 2005.
- SHARMA, N. *et al.* Effect of high pressure soaking on water absorption, gelatinization, and biochemical properties of germinated and non-germinated foxtail millet grains. **Journal of Cereal Science**, v. 83, p. 162–170, 2018.
- SHOBANA, S.; SREERAMA, Y. N.; MALLESHI, N. G. Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of α -glucosidase and pancreatic amylase. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1268–1273, 2009.
- SHUKLA, K.; SRIVASTAVA, S. Evaluation of finger millet incorporated noodles for nutritive value and glycemic index. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 3, p. 527–534, 2014.
- SIEGFRIED, R.; RUCKEMANN, H.; STUMPF, G. Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. **Landwirtschaftliche Forschung**, v. 37, n. 3–4, p. 298–304, 1984.
- SILVA, M. E. T. da *et al.* Food safety, hypolipidemic and hypoglycemic activities, and in vivo protein quality of microalga *Scenedesmus obliquus* in Wistar rats. **Journal of Functional Foods**, v. 65, p. 103711, 2020.
- SILVEIRA JÚNIOR, A. O. **O exame coprológico e as funções digestivas**. [s. l.], 1988.
- SINGH, R. M. *et al.* Effects of millet based functional foods rich diet on coronary risk factors among subjects with diabetes mellitus: a single arm real world observation from hospital registry. **MOJ Public Health**, v. 9, n. 1, p. 18–25, 2020.

- SINGH, N. *et al.* Evaluation of antimicrobial and anticancer properties of finger millet (*Eleusine coracana*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*) extracts. **The Pharma Innovation**, v. 3, n. 11, p. 82, 2015.
- SINGH, P. *et al.* Nutritional evaluation of high protein genotypes of pearl millet (*Pennisetum americanum* (L.) leeke). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 38, n. 1, p. 41–48, 1987.
- SINGH, S.; GAMLATH, S.; WAKELING, L. Nutritional aspects of food extrusion: a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 42, n. 8, p. 916–929, 2007.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.
- SIROHA, A. K.; SANDHU, K. S.; KAUR, M. Physicochemical, functional and antioxidant properties of flour from pearl millet varieties grown in India. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 10, n. 2, p. 311–318, 2016.
- SOBOWALE, S. S.; KEWUYEMI, Y. O.; OLAYANJU, A. T. Process optimization of extrusion variables and effects on some quality and sensory characteristics of extruded snacks from whole pearl millet-based flour. **SN Applied Sciences**, v. 3, n. 10, p. 1–12, 2021.
- SUKAR, K. A. O. *et al.* Effect of Pearl Millet on Glycaemic Control and Lipid Profile in Streptozocin Induced Diabetic Wistar Rat Model. **Asian Journal of Medicine and Health**, p. 40–51, 2020.
- SUMATHI, A.; USHAKUMARI, S. R.; MALLESHI, N. G. Physico-chemical characteristics, nutritional quality and shelf-life of pearl millet based extrusion cooked supplementary foods. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 58, n. 5, p. 350–362, 2009.
- TAYLOR, J. R. N. Millet Pearl: Overview. *Em: Encyclopedia of food grains: second edition*. [S. l.]: Elsevier Inc., 2016. v. 1–4, p. 190–198.
- TAYLOR, J. R.; DUODU, K. G. Effects of processing sorghum and millets on their phenolic phytochemicals and the implications of this to the health-enhancing properties of sorghum and millet food and beverage products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 2, p. 225–237, 2015.
- THAKUR, P. *et al.* Effect of soaking and germination treatments on nutritional, anti-nutritional, and bioactive properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.), quinoa (*Chenopodium quinoa* L.), and buckwheat (*Fagopyrum esculentum* L.). **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 917–925, 2021.

- THAKUR, P.; KUMAR, K.; DHALIWAL, H. S. Nutritional facts, bio-active components and processing aspects of pseudocereals: A comprehensive review. **Food Bioscience**, v. 42, p. 101170, 2021.
- THEODORO, J. M. V. *et al.* Germinated millet flour (*Pennisetum glaucum* (L.) R. BR.) improves adipogenesis and glucose metabolism and maintains thyroid function in vivo. **Food & Function**, v. 12, n. 13, p. 6083–6090, 2021a.
- THEODORO, J. M. V. *et al.* Germinated millet flour (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) reduces inflammation, oxidative stress, and liver steatosis in rats fed with high-fat high-fructose diet. **Journal of Cereal Science**, v. 99, p. 103207, 2021b.
- THEODORO, J. M. V. *et al.* Germinated Millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) Flour Improved the Gut Function and Its Microbiota Composition in Rats Fed with High-Fat High-Fructose Diet. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 22, p. 15217, 2022.
- UNITED NATIONS GENERAL ASSEMBLY. Resolution 75/263 of 3 March 2021. **International Year of Millets, 2023**. [*s. l.*], 2021.
- USDA. **FoodData Central**. [*S. l.*], 2019. Disponível em: <https://fdc.nal.usda.gov/>. Acesso em: 25 abr. 2023.
- VARGAS-SOLÓRZANO, J. W. *et al.* Physicochemical properties of expanded extrudates from colored sorghum genotypes. **Food Research International**, v. 55, p. 37–44, 2014.
- WANG, Y. *et al.* Effects of Oats, Tartary Buckwheat, and Foxtail Millet Supplementation on Lipid Metabolism, Oxido-Inflammatory Responses, Gut Microbiota, and Colonic SCFA Composition in High-Fat Diet Fed Rats. **Nutrients**, v. 14, n. 13, p. 2760, 2022.
- WANG, Y. *et al.* Molecular recognition of an acyl-peptide hormone and activation of ghrelin receptor. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2021.
- WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2014. **World Health Organization**, [*s. l.*], 2014.
- XIE, X. *et al.* Understanding how the cooking methods affected structures and digestibility of native and heat-moisture treated rice starches. **Journal of Cereal Science**, v. 95, p. 103085, 2020.
- YANG, T. *et al.* Influences of four processing methods on main nutritional components of foxtail millet: A review. **Grain & Oil Science and Technology**, v. 5, n. 3, p. 156–165, 2022.
- YU, W.; CHENG, J. D. Uric Acid and Cardiovascular Disease: An Update From Molecular Mechanism to Clinical Perspective. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 1607, 2020.

YU, T.; GANG, Z. The Relationship Between Phenylalanine Deaminase Activities and Xanthoketone Contents in Buckwheat. **Journal of Mianyang College of Economy e Technology**, v. 1, 1998.

ZHANG, B. *et al.* Dietary Supplementation of Foxtail Millet Ameliorates Colitis-Associated Colorectal Cancer in Mice via Activation of Gut Receptors and Suppression of the STAT3 Pathway. **Nutrients**, v. 12, n. 8, p. 2367, 2020.

ZHANG, K. *et al.* Oat-Based Foods: Chemical Constituents, Glycemic Index, and the Effect of Processing. **Foods**, v. 10, n. 6, p. 1304, 2021.

ZHANG, L. Z.; LIU, R. H. Phenolic and carotenoid profiles and antiproliferative activity of foxtail millet. **Food Chemistry**, v. 174, p. 495–501, 2015.

ZHOU, J. R.; ERDMAN, J. W. Phytic acid in health and disease. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 35, n. 6, p. 495–508, 2009.

RESULTADOS

Artigo 1: Germinated and non-germinated cooked whole millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) flours show a promising effect on protein quality, biochemical profile and intestinal health *in vivo*.

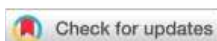
* Published in Food & Function (Impact factor: 6.317)

Food &
Function



PAPER

[View Article Online](#)
[View Journal](#)



Cite this: DOI: 10.1039/d2fo02915d

Germinated and non-germinated cooked whole millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) flours show a promising effect on protein quality, biochemical profile and intestinal health *in vivo*†

Thauana Lorena Silva Magalhães,^a Bárbara Pereira da Silva,^a Mariana Grancier,^a Haira Guedes Lúcio,^a Renata Celi Lopes Toledo,^a Roberta Ribeiro Silva Barra,^b Carlos Wanderlei Piler de Carvalho^c and Hércia Stampini Duarte Martino^{b,*}

ABSTRACT

Millet is a promising cereal with high amounts of dietary fibre and protein, and in addition, bioactive compounds with health-promoting functional properties. This study aimed to evaluate the effect of germinated and cooked whole millet flour (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) on protein quality, biochemical profile and intestinal health *in vivo*. Thirty-two male *Wistar* rats (21 days old) were separated into four groups, which received a casein control diet (CC; $n = 8$), a free protein diet (aproteic; $n = 8$) and two treatment diets: non-germinated millet (NM; $n = 8$) and germinated millet (GM; $n = 8$) for 29 days. The whole millet flours presented an adequate essential amino acid profile, except for lysine. The GM group presented a higher protein efficiency ratio and net protein ratio compared to the NM group. Weight gain, Lee index, and food efficiency ratio were lower in the treatment groups, compared to the control group. The GM group had lower plasma glucose, uric acid, cholesterol, and faecal pH compared to the other groups. The treatment groups presented lower triglyceride levels, higher levels of acetic and propionic acids, a larger thickness and depth of the colonic crypts, and a higher expression of PepT1 genes than the CC group. In conclusion, the millet flours demonstrated potential for controlling the lipid profile and biometric measurements. Additionally, the whole germinated millet flour provided better protein quality and improved intestinal morphology and functionality. These results indicate that the consumption of millet could be increased in human food, and considering its potential health benefits, it could be an alternative for dietary diversification, and germination is a good processing option.

1 INTRODUCTION

Pennisetum glaucum (L.) R. Br., also known as pearl millet, is a cereal cultivated around the world which has a promising agronomic and nutritional perspective due to its greater ability to adapt to adverse climatic conditions and lower demands on the quality of the cultivation soil.¹⁻³ Furthermore, *P. glaucum* is gluten-free⁴ and contains significant amounts of dietary fibre and protein, in addition to bioactive compounds, including phytic acid, tannin and phenolic compounds which are generally considered anti-nutritional factors because they can complex with nutrients, such as starch, proteins, and minerals, and affect their bioavailability.^{5,6} However, they have functional health-promoting properties that can help prevent several chronic diseases.^{7,8} These compounds can act as anti-inflammatory, antioxidant and anticarcinogenic agents and can chemically interact with nutrients.^{5,9-13}

Pearl millet contains about 71.6% carbohydrate, 14.5% protein, 8.5% total dietary fibre, 5.1% lipid and 2% total ash.¹ Millet is a good and traditional source of essential amino acids, mainly sulfur, methionine and cysteine, with lysine as its limited amino acid.^{1,14} When digested and absorbed, millet proteins can exert biochemical effects on human health, primarily contributing to human growth and development, even promoting antioxidant, antihypertensive and antidiabetic effects.¹⁵⁻¹⁷ The main nutrients found in pearl millet include dietary fibre, both fermentable and non-fermentable, which gives it an anti-inflammatory and antioxidant potential.⁷ Mainly present in whole foods of plant origin, dietary fibre has several beneficial effects along the digestive system, such as improved intestinal health and help in the combatting chronic non-communicable diseases such as obesity, diabetes mellitus and cardiovascular diseases.¹⁸⁻²² Studies have revealed the effects of dietary fibre, which improve the gastrointestinal transit and the production of short-chain fatty acids (SCFA), which in turn, reduce the luminal pH, alter intestinal microbiota, morphology and functionality, thus increasing intestinal motility. Moreover, the SCFA can also lead to hyperplasia and/or hypertrophy of muscle cells and increase the production of goblet cells, mucus and gene expression of the nutrient transporting proteins in the brush border membrane (BBM), such as aminopeptidase (AP), peptide transporter 1 (PepT1), sodium-dependent glucose linked transporter 1 (SGLT1) and sucrase isomaltase (SI).²³⁻²⁵

In order to promote the use of pearl millet in the human diet, it is important to understand the effect of the application of processing methods, such as germination, which can increase nutrient bioavailability and nutritional quality.²⁶ Germination is the process of resuming the

active growth of the embryonic axis that causes several physiological and biochemical changes, thus favouring the hydrolysis of macromolecules into smaller units. As a result, the nutrient bioavailability and nutritional quality of food are improved.^{2,27}

In vitro scientific studies with millet grains have demonstrated that germination reduced the levels of phytochemical compounds which had an anti-nutritional action, which increased protein quality,^{26,28} digestibility of protein,²⁷ complex B vitamins and minerals, such as calcium, iron and zinc.²⁸ Other studies claim that germinated millet flours have great nutritional advantages, such as protein and dietary fibre retention,² with greater antioxidant effects and a potential functional biological effect.⁷ However, despite its nutritional properties, millet is still extensively underused as a human food source, mainly due to the lack of cultivation awareness and promotion.^{1,2,29} So far, there are few *in vivo* studies in the scientific literature that determine the effect of germination, combined with cooking, on protein quality, biometry, biochemical profile, morphology and intestinal functionality of cooked millet (*P. glaucum* (L.) R. Br.), as well as its chemical characterisation. Thus, the present study aimed to evaluate the effect of whole pearl millet flour (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.), ADRG 9070 hybrid, germinated and non-germinated and then cooked, on protein quality, biochemical parameters and intestinal health *in vivo*. It was hypothesised that germination combined with heat treatment can improve the protein quality of millet grains, as well as the biochemical parameters, in addition to the functionality and intestinal morphology of *Wistar* rats.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Preparation of flours

The grains of germinated and non-germinated pearl millet (*Pennisetum glaucum* L. R. Br.), hybrid ADRG 9070, used in the preparation of whole flours were supplied by Embrapa Food Technology (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The germination was conducted using grains with a germination index of 99%. These were soaked in water (1 : 3, grain to water) for 1 h, and then the water was replaced every hour and then drained, following the methodology of Theodoro *et al.*⁷ The grains were germinated in a fermentation chamber (National Manufacturing, Lincoln, NE, USA), with a controlled temperature of 30 °C, and relative humidity of 90%. After 24 h, the grains were dried in an oven with air circulation (Hauber Macanuda, Joinville, Brazil), at 55 °C, for 18 h, until they reached a final moisture content of less than 12%. Aiming to mimic the form that could potentially be consumed by humans, germinated and non-germinated pearl

millet grains were cooked in an open pan, at 180 °C, for 40 min. The 1 : 4 grain/water ratios were used for non-germinated millet grains, and 1 : 5 grain/water ratios, for germinated millet grains. Then, the cooked grains were dried in an air circulation oven, at 50 °C for 24 h. The cooked grains were ground in a hammer mill at 3000 rpm, fitted with a sieve with a 150 µm mesh opening. The whole flours were stored at -12 °C² and were named GMF (germinated millet flour) and NMF (non-germinated millet flour).

2.2 Chemical composition of whole millet flours

The analyses of the content of moisture, ash, proteins, lipids and total dietary fibre in GMF and NMF were performed with three repetitions. Moisture was determined using an oven (Nova Ética, model 400/6ND, São Paulo, Brazil), at 105 °C, and ash was quantified using a muffle furnace (Quimis, Q320 M model, Brazil), at 550 °C. The protein content was determined using a micro-Kjeldahl method, total dietary fibre was determined by a gravimetric-enzymatic method, and lipids were determined by the Soxhlet method.³⁰ Carbohydrates were calculated as the difference, using the following equation: $[100 - (\% \text{ moisture} + \% \text{ lipids} + \% \text{ proteins} + \% \text{ total dietary fibre} + \% \text{ ash})]$. The total energy value of the millet was estimated using the conversion factors of 4 kcal g⁻¹ for protein and carbohydrate, and 9 kcal per g per lipid.³¹

2.3 Determination of phytic acid, tannin and total phenolic content

The concentration of phytic acid in GMF and NMF was determined using a specific kit (K-PHYT 08/14 Megazyme, Bray, Ireland), following the manufacturer's instructions, and the absorbance was read at 655 nm. An analytical curve of phytic acid was prepared at concentrations of 10–100 µL mL⁻¹, to express the concentration of phytic acid in g per 100 g of millet flour.

Tannin determination was performed using the reaction of vanillin/HCl³² with modifications.^{33,34} The absorbance reading was measured using a microplate spectrophotometer (Multiskan Go, ThermoScientific, USA) at 500 nm. The results were expressed as mg of catechin per g of sample, according to the analytical curve of catechin constructed by weighing 200 mg of catechin in a volumetric flask (200 mL) and the volume was made up with methanol.

The content of total phenolic compounds in the flours was determined using the Folin–Ciocalteu method.³⁵ The absorbance was measured in a microplate spectrophotometer (Multiskan Go, ThermoScientific, USA) at 765 nm. Quantification was using the analytical curve obtained by reading the absorbance of solutions with different concentrations of gallic

acid. The results were expressed in milligrams of gallic acid equivalents per gram of sample (mg GAE g⁻¹).

2.4 Determination of the essential amino acid profile

The essential amino acid profiles for GMF and NMF were determined according to AOAC 994.12/2000³⁶ and the method of Liu *et al.*³⁷ The results were compared to the essential amino acid profile of casein (the standard protein used in the animal study), as well as the daily essential amino acid requirements for children aged between 6 months and 3 years, as proposed by the United Nations Food and Agriculture Organization in 2013.³⁸

2.5 Preparation and composition of diets

The composition of the experimental diets was based on the AIN-93G diet,³⁹ taking into account the chemical composition of the whole pearl millet flours. The millet flours were used as a protein source to replace casein in the testdiets. The amount of millet was enough to supply 75% of the protein recommendation for rodents. All the diets were formulated to be isocaloric and isoproteic, with a protein percentage of 9.5% (Table S1, ESI[†]).

2.6 Experimental study

Thirty-two male rats (*Rattus norvegicus*, *Wistar*, albinus variation), with an age of 21 d, were distributed in individual stainless-steel cages in a controlled temperature environment (22 °C) and automatically controlled light and dark cycles of 12 h. The animals received distilled water and their respective experimental diets *ad libitum*. The animals were systematically separated into four groups of eight animals in each, and received, for 29 days, the following diets: casein control (CC), free protein (aproteic), non-germinated millet (NM), and germinated millet (GM).

At the end of the experimental period, after 12 h of fasting, the animals were anaesthetised with isoflurane (Isoforine®, Cristália, Itapira, Brazil) and euthanised by cardiac puncture. The blood was collected and centrifuged at 2865g, at 4 °C, for 10 min for plasma separation. Duodenal, colon, and caecal contents were also collected. The body weight and food consumption of the animal were recorded once a week. The food efficiency ratio (FER) was calculated based on the ratio between the weight gain and the total dietary intake by the animals. Lee's index was determined using the equation and cut-off point proposed by Novelli *et al.*⁴⁰ and Reynés *et al.*⁴¹

2.7 Evaluation of the protein quality of whole millet flours

The true digestibility (TD), protein efficiency ratio (PER) and net protein ratio (NPR) were determined. The TD was calculated using the equation proposed by Bender and Doell:⁴² $TD (\%) = \{[\text{Nitrogen ingested by the treatment diet group} - (\text{Faecal nitrogen in the treatment diet group} - \text{Faecal nitrogen in the aprotic diet group})] / \text{Nitrogen ingested by the treatment diet group}\} \times 100$. The PER was determined using the equation proposed by Hegsted:⁴³ $PER = (\text{Weight gain (g) of the treatment group}) / (\text{Protein consumed (g) by the treatment group})$. The NPR was determined using an equation proposed by Bender and Doell:⁴² $NPR = [(\text{Weight gain of the group on a protein diet (g)} + \text{Weight loss in the aprotic diet group (g)}) / \text{Protein consumed in the protein diet group (g)}]$.

2.8 Biochemical analysis

Glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL), low-density lipoprotein cholesterol (LDL), triglycerides (TGL), uric acid, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels were measured by colorimetric methods using commercially available kits and the manufacturer's instructions were followed (Bioclin®, Belo Horizonte, Brazil). The analyses were performed on an Evolution 606 spectrophotometer (ThermoScientific, USA).

2.9 Intestinal health

2.9.1 Histological analysis

Semi-serial histological sections of fragments of the ascending colon, 3 µm thick, were obtained using an automatic microtome (Reichert-Jung®, Germany) and were stained by the Eosin-Haematoxylin technique. The slides were examined under an CX31 light microscope (Olympus, Tokyo, Japan), using 20× and 10× objectives. In order to measure crypt thickness, crypt height, circular muscle layer, longitudinal muscle layer, and the number of caliciform cells per villus, 20 random fields per animal were selected.²⁴ For the analyses the Image-Pro Plus® software version 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) was used.

2.9.2 Extraction of mRNA from intestinal tissue and cDNA synthesis

Duodenal tissue was macerated in liquid nitrogen under RNase-free conditions, and aliquots were taken for total RNA extraction. The total RNA was extracted with the TRIzol

Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The extracted mRNA was used to synthesise the cDNA with the M-MLV reverse transcription kit (Invitrogen, Grand Island, NY, USA).⁴⁴

2.9.3 Determination of the gene expression of proteins involved in intestinal health by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

The mRNA expression levels of the genes in the duodenal tissue involved in intestinal health were determined by RT- qPCR. The SYBR Green qPCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was employed, and the analyses were performed on the StepOne™ Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, Foster City, CA, USA) by the measurement system involving the SYBR-Green Fluorescence and Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sense and antisense primer sequences were ordered for each gene (Choma Biotechnologies) to amplify AP: TCTCTCCTCAAACCATGAA (forward), AGTTCAGGGCCTTCTCATATTC (reverse); SI: CCTCCAGAACACAATCCCTATAC (forward), GGAGAGGTGAGATGGGATTAGA (reverse); PepT1: CCTGGTCGTCTGCATCATATT (forward), TTCTTCTCATCCTCATCGAACTG (reverse); SGLT1: CATCCAGTCCATCACCAGTTAC (forward), CAATCAGGAAGCCGAGAATCA (reverse). The relative expressions of the mRNA levels were normalised by endogenous control beta actin: TTCGTTGCCGGTCCACACCC (forward), GCTTTGCACATGCCGGAGCC (reverse). All the steps were performed under open conditions with RNase.

2.9.4 Faecal pH

About 400 mg of faeces were homogenised in 4 mL of distilled water, using vortex mixing, for faecal pH analysis. Subsequently, the glass electrode of the pH meter was inserted. The measurements were performed in duplicate.⁴⁵

2.9.5 Short chain fatty acids

Faecal samples (~500 mg) were homogenised prior to analysis, in 1 mL of Milli-Q water, with vortex mixing, and then centrifuged at 12 000g, for 10 min. The supernatant was removed, and the other steps were performed as described by Siegfried *et al.*⁴⁶ Subsequently, the samples were analysed by high-performance liquid chromatography (HPLC), using a Dionex UltiMate 3000 Dual chromatograph (ThermoScientific) coupled to a RI-101 refractive index (RI) detector (Shodex, Germany) maintained at 40 °C, and a Rezex ROA ion exclusion column

(Phenomenex, 300 × 7.8 mm) maintained at 40 °C. Sulfuric acid (H₂SO₄, 5 mM) with a flow rate of 0.7 mL min⁻¹ was used as the mobile phase. Acetic, butyric, isobutyric, isovaleric, propionic, and valeric acids were used as standards for the calibration curve.

2.9.6 Bristol scale

Reports were also provided about faecal consistency, which was measured using the Bristol scale,⁴⁷ a descriptive and visual seven-point scale which describes seven types of faeces. The description differentiates: type 1: separate hard lumps, similar to nuts; type 2: sausage shaped but lumpy; type 3: similar to a sausage or snake but with cracks on its surface; type 4: similar to a sausage or snake, smooth and soft; type 5: soft blobs with clear-cut edges; type 6: fluffy pieces with ragged edges, a mushy stool; and finally type 7: watery, no solid pieces. Regarding colour, the following classification was adopted: (1) dark brown faeces; (2) light brown faeces; (3) yellowish faeces; (4) faeces that were discoloured; (5) black coloured faeces; (6) red-coloured faeces; and (7) greenish faeces. The validity of the scale was confirmed by Hammer and Phillips.⁴⁸

2.10 Statistical analysis

The treatments were conducted in a completely randomised design, with eight replications. Normality was assessed using Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests. The results were analysed by analysis of variance (one-way ANOVA), followed by a *post-hoc* Newman–Keuls test to compare means among the experimental groups, using $p < 0.05$ as statistically significant. The statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software version 8.0 (Dotmatics, Boston, Massachusetts, USA).

3 RESULTS

3.1 Chemical composition of whole pearl millet flours

The GMF differed in terms of total ash (1.84%) and moisture (6.90%), with higher values for NMF, namely, 1.75% and 6.70%, respectively ($p < 0.05$). The caloric value corresponded to 343.4 kcal per 100 g for NMF and 336.8 kcal per 100 g for GMF (Table 1).

Table 1 Chemical characterisation of cooked whole pearl millet flours (dry basis)

Compounds (g per 100 g)	Chemical characterization of flours	
	NMF	GMF
Carbohydrates	63.58 ± 1.99 ^a	61.59 ± 0.43 ^a
Proteins	12.88 ± 1.92 ^a	12.82 ± 0.51 ^a
Total dietary fiber	10.91 ± 0.55 ^a	12.49 ± 0.01 ^a
Soluble fiber	1.35 ± 0.08 ^a	1.46 ± 0.12 ^a
Insoluble fiber	9.55 ± 0.63 ^a	11.03 ± 0.12 ^a
Moisture	6.70 ± 0.10 ^b	6.90 ± 0.04 ^a
Lipids	4.17 ± 0.08 ^a	4.35 ± 0.07 ^a
Ash	1.75 ± 0.05 ^b	1.84 ± 0.01 ^a
Phytic acid	1.28 ± 0.04 ^a	1.22 ± 0.07 ^a
Tannin (mg EC/g sample)	0.42 ± 0.05 ^a	0.38 ± 0.03 ^a
Total phenolic (mg GAE/g sample)	7.35 ± 0.95 ^a	6.90 ± 0.08 ^a
Total caloric value (kcal/100 g)	343.40	336.80

NMF (non-germinated millet flour); GMF (Germinated millet flour). Means and standard deviations followed by different letters differ by ANOVA test ($p < 0.05$).

Carbohydrate was the macronutrient with the highest concentration, followed by protein and total dietary fibre in both flours. No statistical difference was observed between the flours for phytic acid, tannin or total phenolic contents ($p > 0.05$).

3.2 Effect of cooked whole pearl millet flour consumption on body, faecal dry weight and protein quality index

Weight gain, Lee index and FER did not differ between the treatment groups ($p > 0.05$), but were lower in relation to the CC group ($p < 0.05$), without change in food intake among them ($p > 0.05$). The group fed with GM presented a higher PER and NPR in relation to the group fed with NG ($p < 0.05$), and both presented a lower index for these variables when compared to the CC group ($p < 0.05$).

The faecal dry weight was higher in the GM group, compared to the other groups ($p < 0.05$). The groups fed with millet flour exhibited higher levels of faecal nitrogen excretion when compared to the group fed with casein ($p < 0.05$). The treatment groups presented similar TD ($p > 0.05$) which was lower when compared to the CC group ($p < 0.05$) (Table 2).

Table 2 Effect of pearl millet intake on body, fecal dry weight and protein quality index of the *Wistar* rats ($n = 8$) for a period of 29 days

Parameters	Groups		
	CC	NM	GM
Weight gain (g)	144.89 ± 7.43 ^a	113.58 ± 13.95 ^b	120.16 ± 6.06 ^b
Food intake (g)	476.39 ± 10.69 ^a	460.14 ± 45.54 ^a	480.44 ± 19.10 ^a
Lee index	0.31 ± 0.01 ^a	0.29 ± 0.01 ^b	0.28 ± 0.00 ^b
FER	30.42 ± 1.58 ^a	24.66 ± 1.39 ^b	25.03 ± 1.25 ^b
PER	2.99 ± 0.16 ^a	2.23 ± 0.13 ^c	2.46 ± 0.12 ^b
NPR	3.46 ± 0.16 ^a	2.68 ± 0.13 ^c	2.92 ± 0.13 ^b
Faecal dry weight	4.08 ± 0.42 ^c	4.89 ± 0.56 ^b	6.70 ± 0.37 ^a
gN total feces	0.05 ± 0.01 ^b	0.15 ± 0.02 ^a	0.16 ± 0.02 ^a
TD (%)	95.27 ± 0.99 ^a	85.42 ± 1.47 ^b	83.77 ± 2.63 ^b

CC (casein control group); NM (non-germinated millet group); GM (germinated millet group); FER (food efficiency ratio); PER (protein efficiency ratio); NPR (net protein ratio); gN (faecal nitrogen (g)); TD (true digestibility). Means and standard deviations followed by different letters differ from those obtained by the Newman–Keuls test ($p < 0.05$).

The cooked whole millet flours presented an adequate essential amino acid profile, except for lysine, with chemical score values of 0.56 and 0.53, for the NM flour and GM flour, respectively. Casein obtained a chemical score of 0.80 due to the limitation in the combination of sulfur amino acids methionine + cysteine (Table 3).

Table 3 Essential amino acid profile, chemical score (score AA), and PDCAAS according to the standard FAO (2013)³¹ of the casein, cooked whole non-germinated and germinated millet flours

Amino acids	(mg/g protein)			Standard FAO (2013)	Score AA			PDCAAS		
	Casein	NMF	GMF		Casein	NMF	GMF	Casein	NMF	GMF
Tryptophan	11.54	15.14	14.43	8.5	1.36	1.78	1.70	-	-	-
Lysine	68.67	31.83	30.03	57.00	1.20	0.56	0.53	-	47.70	44.13
Histidine	29.96	26.79	24.96	20.00	1.50	1.34	1.25	-	-	-
Threonine	46.38	41.15	38.61	31.00	1.50	1.33	1.25	-	-	-
Methionine + Cysteine	21.68	99.38	90.87	27.00	0.80	3.68	3.37	76.50	-	-
Valine	65.04	57.07	55.38	43.00	1.51	1.33	1.29	-	-	-
Isoleucine	51.88	43.87	44.07	32.00	1.62	1.37	1.38	-	-	-
Leucine	104.72	105.20	103.35	66.00	1.59	1.59	1.57	-	-	-
Phenylalanine + Tyrosine	72.90	91.61	89.31	52.00	1.40	1.76	1.72	-	-	-

NMF (non-germinated millet flour); GMF (germinated millet flour); AA-score (quotient of the division between the mg of aa per g protein Casein, NMF or GMF and the mg of the aa per g protein standard, FAO); FAO Standard (2013)³¹ (United Nations Food and Agriculture Organization (FAO), theoretical standard for essential amino acids for children aged 6 months to 3 years); PDCAAS (first amino acid limited (AA-score columns) × true digestibility of experiment with rats). True Digestibility: casein control group = 95.27, non-germinated millet group = 85.42, and germinated millet group = 83.77.

The experimental diets also presented an adequate essential amino acid profile, except for lysine, with protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS) values of 61.50% and 58.33% for the experimental diet of the NM and GM groups, respectively. The experimental diet of the CC group exhibited a PDCAAS value of 76.50% as well, because of the deficiency of the sulfur amino acids, methionine + cysteine (Table S2, ESI[†]).

3.3 Effect of pearl millet intake on biochemical parameters

The animals fed with germinated millet presented lower blood glucose concentrations than the other groups ($p < 0.05$) (Fig. 1A). All the groups had similar values for blood HDL and LDL cholesterol (Fig. 1B and C). However, the GM group presented lower levels of total cholesterol in blood when compared to the NM group ($p < 0.05$), although it did not differ from the CC group ($p > 0.05$) (Fig. 1D). The triglyceride levels were lower in the millet groups (NM and GM) than in the CC group ($p < 0.05$) (Fig. 1E). All the experimental groups presented

similar concentrations of blood AST and ALT ($p > 0.05$) (Fig. 1F and G), and millet reduced the blood concentrations of uric acid, especially GM, which presented the lowest levels among the groups ($p < 0.05$) (Fig. 1H).

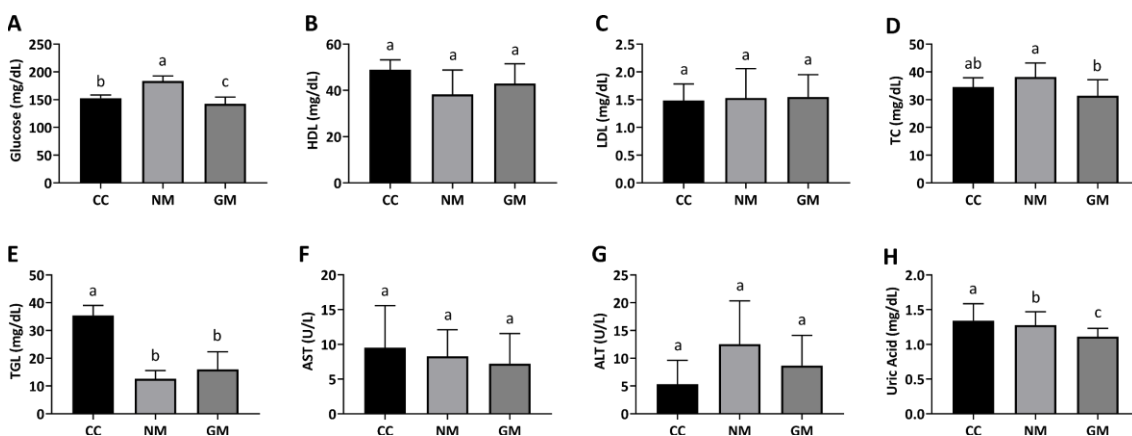


Fig. 1 Effect of pearl millet intake on the biochemical variables in *Wistar* rats ($n = 8$) after 29 days. (A) Glucose; (B) HDL (high-density lipoprotein); (C) LDL (low-density lipoprotein); (D) TC (total cholesterol); (E) TGL (triglycerides); (F) AST (aspartate aminotransferase); (G) ALT (alanine aminotransferase); (H) uric acid; CC (casein control group); NM (non-germinated millet group); GM (germinated millet group). Means and standard deviations followed by different letters differ from those obtained by the Newman-Keuls test ($p < 0.05$).

3.4 Effect of pearl millet flour consumption on intestinal health

The treatment groups (NM and GM) presented higher faecal moisture content values when compared to the CC group ($p < 0.05$). Regarding faecal consistency, no statistical difference was observed between the groups, all of which were characterised on the Bristol scale as “sausage-like or snake-like, smooth and soft” ($p > 0.05$). Regarding the colour of the faeces, the NM and GM groups were between the terms “dark brown faeces” and “light brown faeces”, in contrast to the CC group, which produced “light brown faeces” ($p < 0.05$) (Table 4).

Table 4 Effect of pearl millet on intestinal health in *Wistar* rats ($n = 8$) for 29 days

Parameters	Groups		
	CC	NM	GM
Faecal moisture content (%)	21.91 ± 3.61 ^b	31.47 ± 5.68 ^a	27.02 ± 4.21 ^a
Short chain fatty acids (mM)			
Acetic acid	7.51 ± 2.44 ^b	11.58 ± 1.58 ^a	11.57 ± 2.47 ^a
Propionic acid	2.62 ± 0.85 ^b	11.14 ± 3.26 ^a	12.35 ± 1.73 ^a
Butyric acid	1.58 ± 0.67 ^a	1.89 ± 0.55 ^a	2.24 ± 0.51 ^a
Consistency, Bristol scale	4.00 ± 0.00 ^a	4.00 ± 0.00 ^a	4.00 ± 0.00 ^a
Color, Bristol scale	2.00 ± 0.00 ^a	1.25 ± 0.46 ^b	1.13 ± 0.35 ^b
Faeces pH	8.16 ± 0.92 ^a	7.59 ± 0.48 ^a	6.90 ± 0.23 ^b
Crypts thickness (µm)	14.81 ± 1.16 ^b	19.22 ± 2.42 ^a	20.51 ± 1.46 ^a
Crypts depth (µm)	110.60 ± 11.11 ^b	138.90 ± 11.70 ^a	140.10 ± 16.26 ^a
Number of caliciform cell (per villi)	24.72 ± 3.86 ^b	31.68 ± 4.08 ^{ab}	38.58 ± 8.17 ^a
Longitudinal mucus layer width (µm)	41.13 ± 10.98 ^a	37.80 ± 15.02 ^a	38.60 ± 11.51 ^a
Circular mucus layer width (µm)	116.30 ± 23.16 ^a	95.66 ± 48.73 ^a	115.10 ± 22.69 ^a

CC (casein control group); NM (non-germinated millet group); GM (germinated millet group). Means and standard deviations followed by different letters differ from those obtained by the Newman–Keuls test ($p < 0.05$).

Furthermore, the faecal pH was significantly lower in the GM group, when compared to the NM and CC groups ($p < 0.05$). The treatment groups (NM and GM) produced higher levels of acetic and propionic acids when compared to the CC group ($p < 0.05$). However, the levels of butyric acid were similar in all the experimental groups ($p > 0.05$) (Table 4).

For the histological analyses, the thickness and depth of the colonic crypts of the animals in the NM and GM groups were similar to each other and larger, compared to the CC group ($p < 0.05$). The number of caliciform cells produced in the GM group was higher, compared to those in the CC group ($p < 0.05$) and similar to those in the NM group ($p > 0.05$). However, the longitudinal and circular mucus layer width did not differ significantly between the experimental groups ($p > 0.05$) (Table 4 and Fig. 2).

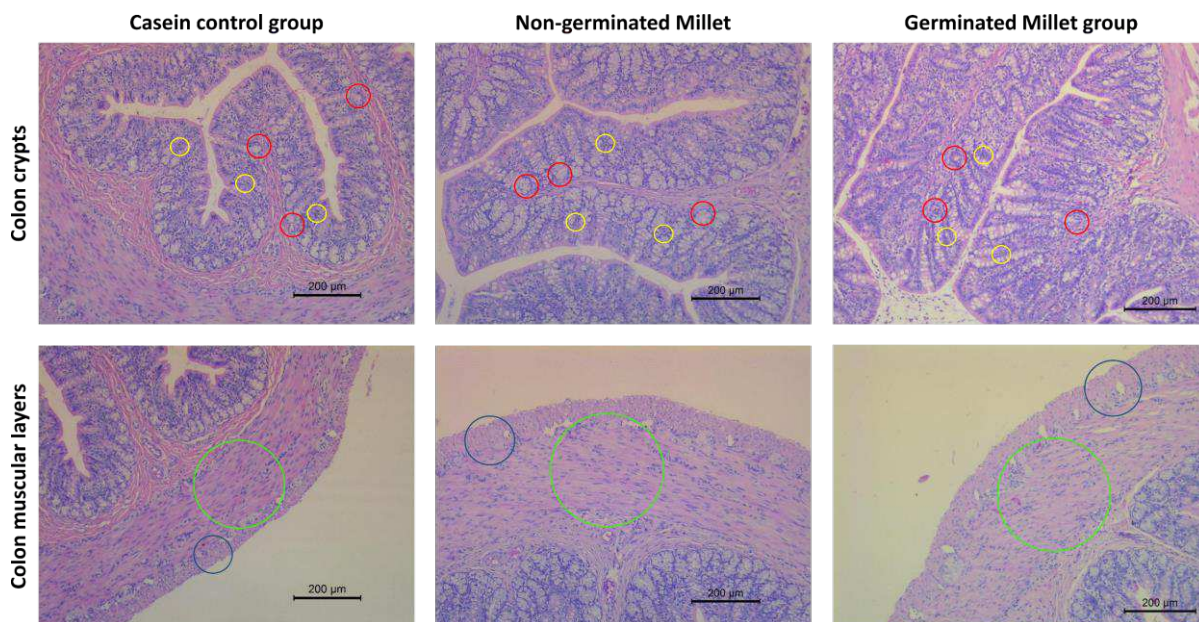


Fig. 2 Representations of the colon morphology of each treatment group are shown (Eosin-Hematoxylin stain). The yellow circles indicate the crypts within the villi and the red circles indicate goblet cells on the villi. The green circles indicate the circular muscular layers, and the blue circles indicate the longitudinal muscular layers. Scale bar = 200 µm.

The group of animals fed with GM expressed a higher amount of AP and SI protein genes when compared to the group of animals fed with NM ($p < 0.05$) (Fig. 3A and B). Furthermore, the GM group also presented a higher expression of PepT1, compared to the CC group ($p < 0.05$). The results for the NM group were similar to those of the other groups (Fig. 3C). However, the expression of SGLT1 was similar between the treatment groups (NM and GM) ($p > 0.05$), but those expressions were reduced, when compared to the control group (CC) ($p < 0.05$) (Fig. 3D).

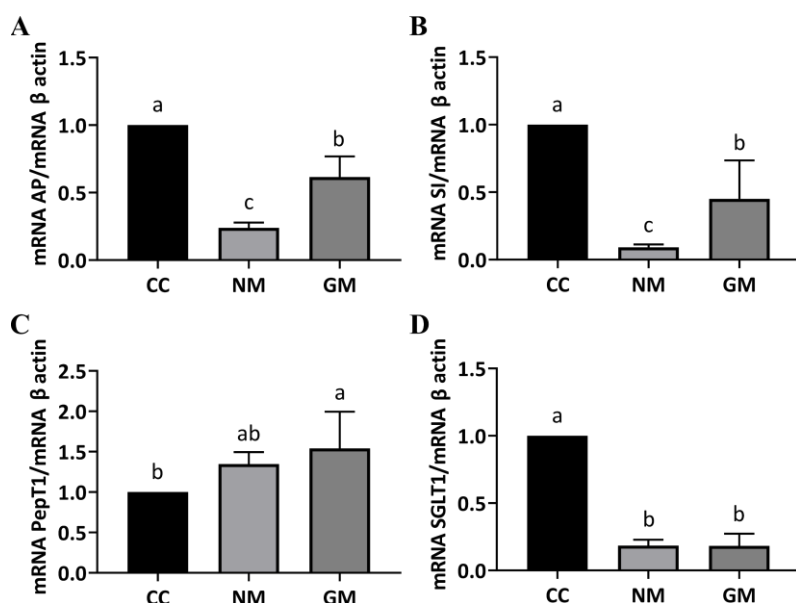


Fig. 3 Effects of millet on the protein gene expression related to intestinal health in *Wistar* rats ($n = 8$). (A) Expression of mRNA AP (aminopeptidase); (B) expression of mRNA SI (sucrase isomaltase); (C) expression of mRNA PepT1 (peptide transporter 1); (D) expression of mRNA SGLT1 (sodium-dependent glucose transporter 1); CC (casein control group); NM (non-germinated millet group); GM (germinated millet group). Means and standard deviations followed by different letters differ from those obtained by the Newman-Keuls test ($p < 0.05$).

4 DISCUSSION

In the current study, cooked whole non-germinated and germinated millet flours presented similar profiles of phytochemicals and macronutrients. However, germinated millet showed a better protein quality, because of its higher PER and NPR, and improved biochemical markers, mainly glucose, uric acid and cholesterol levels, in relation to the non-germinated millet. The treatment groups produced higher levels of acetic and propionic acid, and had an increased thickness and depth of the colonic crypts when compared to the casein control group. The germinated millet group even exhibited a higher expression of the AP, SI and PepT1 genes in the intestine than the casein control group. These results demonstrate the benefits of millet, especially when it has been germinated, to animal health.

The protein content was the second largest component, following carbohydrates, of whole millet flour (average 12.85 g per 100 g), which was higher than white rice (6.94 g per 100 g), white wheat 10.90 (g per 100 g) and yellow corn flour (6.20 g per 100 g).⁴⁹ The germination in our study promoted a slight reduction in the content of essential amino acids. However, the

efficiency of biological use was higher in the cooked whole germinated millet flour in relation to the cooked whole non-germinated millet flour and provided a better biological use of the amino acids. In addition, millet has showed an adequate essential amino acid profile, with the only limitation being lysine, normally found in cereals.⁵⁰ The protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS) of the whole flours for the amino acid lysine was below the 70% recommendation of the amino acid reference standard produced by the Codex Alimentarius⁵⁰ for a food sample to biologically support the growth and development of children, and for the physiological maintenance of adults. However, this aspect can be solved with a varied diet, containing adequate amounts of the various food sources of vegetables, especially the combination of cereals and legumes that favours the supply of the necessary amounts of essential amino acids,⁵¹ which makes it a food alternative for the general population.

The lower true digestibility (TD) observed in the millet-fed groups may be related to several factors, such as type of dietary fibre in the food matrix when compared to the casein control group (microcrystalline cellulose) and the presence of phytochemicals that can complex with proteins, thus reducing their absorption.¹ Similar results for TD between the treatment groups demonstrated that digestibility was not altered by the germination process. However, it is worth mentioning that the TD analysis only considered the amount of nitrogen ingested and excreted from the diets. In addition, the analysis of the faecal nitrogen (g) did not take into account the profile of the nitrogen compounds. Thus, faecal nitrogen excreted in animals fed with germinated millet may contain a higher profile of non-protein nitrogen compounds gathered from purine and pyrimidine metabolism,⁵² compared to the group fed with non-germinated millet, which increased the excretion of uric acid and justified the reduction found in our study. Such evidence may explain the fact that germination did not change TD, but increased PER and NPR. A PER above 2.0 indicates that the protein present in each pearl millet is of high quality, especially in germinated millet proteins, which were more efficient in promoting growth and maintenance in the animals, when compared to the non-germinated millet proteins.⁵³

The animals fed with cooked whole millet flours exhibited lower weight gains and Lee index values, when compared to the CC group, which may be associated not only with the lower biological values of protein presented by these groups, but also with a lower propensity to accumulate body fat. The Lee index values greater than 0.3, as observed in the CC group, reveal a greater tendency to present higher levels of adiposity.^{40,41,54} Thus, the consumption of pearl millet flours seems to have worked as a protective factor against the accumulation of body fat

and consequent metabolic changes. All these factors justify the need for further studies on the subject.

The fermentable and non-fermentable dietary fibre present in millet grains increased the production of acetic and propionic SCFA, which are associated with modulation of lipid metabolism and reduction of serum glucose levels,⁵⁵ as observed in our study. The reduced plasma TGL levels observed in both millet-fed groups and total cholesterol in the germinated millet-fed group, when compared to the CC group, indicates the hypolipidemic effect of millet. Furthermore, the dietary fibre forms a gel that binds to bile acids in the intestinal lumen, increases lipid excretion in the faeces, and reduces cholesterol absorption and reabsorption of bile acids *via* the enterohepatic pathway, which reduces the cholesterol available for incorporation into lipoproteins.^{56,57} Furthermore, when absorbed in the colon, propionate can inhibit the hepatic synthesis of cholesterol.⁵⁸ Such results support our findings.

The germinated millet reduced the levels of glucose and uric acid in the plasma in relation to the other groups. This result can also be related to the SCFAs produced, which stimulate the secretion of GLP-1, an incretin that promotes insulin release and reduces glucagon secretion by the pancreas, consequently lowering the blood glucose.^{59,60} In addition, phytochemicals may contribute to blood glucose reduction by inhibitory effects on α -amylase (pancreatic) and α -glucosidase (intestinal), which are enzymes that induce the hydrolysis of starch, thus the hydrolysis of starch is delayed.⁶¹⁻⁶⁵ The reduced plasma uric acid level in the GM group is possibly due to the higher activity of phytochemicals with antioxidant activities, which can inhibit the enzymes that generate reactive oxygen species (ROS), such as xanthine oxidase, whose action in the purine metabolic pathway converts hypoxanthine into xanthine, and subsequently xanthine into uric acid.⁶⁶ Theodoro *et al.*⁷ reported similar results for serum levels of glucose, uric acid and triglycerides in rodents fed with uncooked germinated millet flour.

The intestinal effects included increased depth and width of the colonic crypts, and an increased number of goblet cells of the animals in the millet-fed groups, especially in germinated millet, compared to the CC group. These results may be associated with the high levels of SCFA produced, which increases the hyperplasia and/or hypertrophy of the colonocytes and participates in the metabolism of colonic epithelial cells, thus enhancing the digestive capacity and absorption of the BBM of the villi.⁶⁷ Furthermore, the greater number of goblet cells can boost the production and secretion of mucin, which may be related, together with the production

of SCFAs, to the lower pH of the faeces found in the GM group and this may prevent the adhesion and invasion of pathogenic bacteria in the intestinal epithelium.⁶⁸

Associated with those morphological effects, the higher gene expression of the functional proteins AP, SI and PepT1 in the germinated millet-fed animals demonstrates an improvement of the intestinal BBM functionality and intestinal health.²⁴ These findings can be explained by the higher expression of SCFAs that can regulate the activation of adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK), which exerts beneficial effects and improves the function of the nutrient transporters.⁶⁹ However, the expression of the SGLT1 gene, which is a protein that is active in the absorption of glucose and galactose from the diet,²⁹ was lower in the millet-fed animals. This effect could be explained by a short-term experiment. Although millet consumption was not able to increase the expression of this transporter in our study, recent research indicates that SGLT1 inhibition could be a therapeutic strategy for the management of diabetes, which can be associated with cardiomyopathy. In animal models with type 2 diabetes mellitus^{29,70–72} and clinical studies,^{73,74} increased SGLT1 intestinal expression is observed in the small intestinal epithelium, which enhances the postprandial hyperglycaemia and its cardiovascular complications. Other studies with caco-2 cells indicate that the phytochemicals, such as polyphenols and tannins, have the capacity to suppress glucose uptake in intestinal cells, by the inhibition of SGLT1.^{75–77} In addition, reduced SGLT1 in the intestine increases the glucose available for metabolism by the gut microbiota in the colon, where it reduces the colonic pH, thus increasing SCFA production and gut health.^{74,78} In our study, plasma glucose was reduced by the consumption of cooked whole germinated millet flour. The faecal pH was also reduced, whereas the levels of propionate and acetate increased. Thus, it can be concluded that the reduced expression of SGLT1, combined with the phytochemical profile, may be one of the possible mechanisms for reducing plasma glucose. This reinforces the notion that pearl millet, especially the germinated grain, may work as a protective factor against metabolic disorders related to an exacerbated postprandial blood glucose increase.

5 CONCLUSIONS

Regardless of the process, pearl millet demonstrated good efficacy in controlling the lipid profile and biometric measurements. However, cooked whole germinated millet flour presented better protein quality, and reduced plasma glucose and uric acid, even improving intestinal morphology and positively affecting intestinal health and function, thus upregulating

the expression of SCFAs and metabolism-related proteins. Therefore, germination is a strategy to improve the protein and nutritional quality of grains, and can be used in cereals intended for human consumption, to ensure the best biological use of the bioactive compounds of plant products, as is already done in millet.

6 AUTHOR CONTRIBUTIONS

Thauana Lorena Silva Magalhães: conceptualisation, methodology, investigation, writing – original draft and final edition, writing – review and editing, formal analysis – application of statistical techniques to analyse the study data. **Bárbara Pereira da Silva:** methodology, formal analysis, writing – original draft, writing – review and editing. **Mariana Grancieri:** methodology, formal analysis, writing – original draft, writing – review and editing. **Haira Guedes Lúcio:** methodology, writing – original draft, writing – review and editing. **Renata Celi Lopes Toledo:** data curation, formal analysis, investigation, methodology, supervision, validation, visualisation, writing – original draft, writing – review and editing. **Roberta Ribeiro Silva:** writing – original draft, writing – review and editing. **Carlos Wanderlei Piler de Carvalho:** conceptualisation, resources, supervision, funding acquisition, investigation, methodology, writing – review and editing. **Hércia Stampini Duarte Martino:** conceptualisation, data curation, funding acquisition, investigation, methodology, project administration, resources, supervision, validation, visualisation, writing – original draft, writing – review and editing.

7 COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

All procedures involving animals performed in this study complied with the ethical standards of the Federal University of Viçosa. The study was approved by the Ethics Committee of Animal Research of the Federal University of Viçosa, Brazil (Protocol 49/2021).

8 CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

9 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) (Grant No. 001), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) (Grant No. 001) for the Scholarships provided. Thanks are also given to: Embrapa Food Technology, Brazil (Grant No. 13.16.05.043.00.00), the Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG) (Grant No. APQ-03738-2), and the Foundation of Rio de Janeiro (FAPERJ/Brazil) (Grant No. E-26/202.848/2017), for the Research Support that they provided. The authors thank Atto Agrícola LTDA (Atto Sementes, Randonópolis, Mato Grosso, Brazil), for their technical-scientific cooperation (Grant No. 034/2022).

REFERENCES

- 1 J. R. N. Taylor, Millet Pearl: Overview, in Encyclopedia of Food Grains, Elsevier Inc., 2nd edn, 2015, vol. 1–4, pp. 190–198.
- 2 M. Dias-Martins, K. L. F. Pessanha, S. Pacheco, J. A. S. Rodrigues and C. W. P. Carvalho, Potential use of pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) in Brazil: Food security, processing, health benefits and nutritional products, *Food Res. Int.*, 2018, **109**, 175–186.
- 3 F. O. M. Durães, P. C. Magalhães and F. G. dos Santos, Fisiologia da Planta de Milheto, Embrapa Milho e Sorgo, *Circular Técnica*, 2003.
- 4 J. Henrottin, M. Planque, A.-C. Huet, R. Marega, A. Lamote and N. Gillard, Gluten Analysis in Processed Foodstuffs by a Multi-Allergens and Grain-Specific UHPLC-MS/MS Method: One Method to Detect Them All, *J. AOAC Int.*, 2019, **102**, 1286–1302.
- 5 E. Feizollahi, R. S. Mirmahdi, A. Zoghi, R. T. Zijlstra, M. S. Roopesh and T. Vasanthan, Review of the beneficial and anti-nutritional qualities of phytic acid, and procedures for removing it from food products, *Food Res. Int.*, 2021, **143**, 110284.
- 6 R. Sharma, S. Sharma, B. N. Dar and B. Singh, Millets as potential nutri-cereals: a review of nutrient composition, phytochemical profile and techno-functionality, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2021, **56**, 3703–3718.
- 7 J. M. V. Theodoro, O. D. M. Martinez, M. Grancieri, R. C. L. Toledo, A. M. Dias Martins, D. M. Dias, C. W. P. Carvalho and H. S. D. Martino, Germinated millet flour (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) reduces inflammation, oxidative stress, and liver steatosis in rats fed

- with high-fat high-fructose diet, *J. Cereal Sci.*, 2021, **99**, 103207.
- 8 M. Delgado, M. Issaoui and N. Chammem, Analysis of Main and Healthy Phenolic Compounds in Foods, *J. AOAC Int.*, 2019, **102**, 1356–1364.
 - 9 Burbano, M. Muzquiz, A. Osagie, G. Ayet and C. Cuadrado, Determination of phytate and lower inositol phosphates in Spanish legumes by HPLC methodology, *Food Chem.*, 1995, **52**, 321–325.
 - 10 L. de M. Cardoso, S. S. Pinheiro, C. W. P. de Carvalho, V. A. V. Queiroz, C. B. de Menezes, A. V. B. Moreira, F. A. R. de Barros, J. M. Awika, H. S. D. Martino and H. M. Pinheiro-Sant'Ana, Phenolic compounds profile in sorghum processed by extrusion cooking and dry heat in a conventional oven, *J. Cereal Sci.*, 2015, **65**, 220–226.
 - 11 A.-S. Sandberg, N.-G. Carlsson and U. Svanberg, Effects of Inositol Tri-, Tetra-, Penta-, and Hexaphosphates on In Vitro Estimation of Iron Availability, *J. Food Sci.*, 1989, **54**, 159–161.
 - 12 Y. Xiong, P. Zhang, R. D. Warner, S. Shen and Z. Fang, Cereal grain-based functional beverages: from cereal grain bioactive phytochemicals to beverage processing technologies, health benefits and product features, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, **62**, 2404–2431, DOI: 10.1080/10408398.2020.1853037.
 - 13 K. Sharma, V. Kumar, J. Kaur, B. Tanwar, A. Goyal, R. Sharma, Y. Gat and A. Kumar, Health effects, sources, utilization and safety of tannins: a critical review, *Toxin Reviews*, 2019, **40**, 432–444, DOI: 10.1080/15569543.2019.1662813.
 - 14 FAO, Sorghum and millets in human nutrition, *Food and Nutrition Series*, 1995.
 - 15 S. Chakrabarti, F. Jahandideh and J. Wu, Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress, *BioMed Res. Int.*, 2014, 2014, DOI: 10.1155/2014/608979.
 - 16 F. G. Cicero, F. Fogacci and A. Colletti, Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review, *Br. J. Pharmacol.*, 2017, **174**, 1378–1394.
 - 17 S. Li, L. Liu, G. He and J. Wu, Molecular targets and mechanisms of bioactive peptides against metabolic syndromes, *Food Funct.*, 2018, **9**, 42–52.
 - 18 WHO, Global status report on noncommunicable diseases 2014, World Health Organization WHO/NMH/NVI, 2014, p. 15.
 - 19 Chandrasekara and F. Shahidi, Bioactivities and Antiradical Properties of Millet Grains and Hulls, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, 9563–9571.
 - 20 D. Chandra, S. Chandra, Pallavi and A. K. Sharma, Review of Finger millet (Eleusine

- coracana (L.) Gaertn): A power house of health benefiting nutrients, *Food Sci. Hum. Wellness*, 2016, **5**, 149–155.
- 21 Kumar, M. Metwal, S. Kaur, A. K. Gupta, S. Puranik, S. Singh, M. Singh, S. Gupta, B. K. Babu, S. Sood and R. Yadav, Nutraceutical value of finger millet [*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.], and their improvement using omics approaches, *Front. Plant Sci.*, 2016, **7**, 934.
 - 22 X. Guo, X. H. Sha, E. Rahman, Y. Wang, B. P. Ji, W. Wu and F. Zhou, Antioxidant capacity and amino acid profile of millet bran wine and the synergistic interaction between major polyphenols, *J. Food Sci. Technol.*, 2018, **55**, 1010–1020.
 - 23 K. Hartono, S. Reed, N. A. Ankrah, R. P. Glahn and E. Tako, Alterations in gut microflora populations and brush border functionality following intra-amniotic daidzein administration, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 6407–6412.
 - 24 B. P. da Silva, N. Kolba, H. S. D. Martino, J. Hart and E. Tako, Soluble Extracts from Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) Affect Brush Border Membrane Functionality, Morphology and Intestinal Bacterial Populations In Vivo (*Gallus gallus*), *Nutrients*, 2019, **11**, 2457.
 - 25 X. Sun, Q. Yang, C. J. Rogers, M. Du and M. J. Zhu, AMPK improves gut epithelial differentiation and barrier function via regulating Cdx2 expression, *Cell Death Differ.*, 2017, **24**, 819–831.
 - 26 E. S. Sarita and E. Singh, Potential of Millets: Nutrients Composition and Health Benefits, *J. Sci. Innov. Res.*, 2016, **5**, 46–50.
 - 27 S. N. Hejazi and V. Orsat, Malting process optimization for protein digestibility enhancement in finger millet grain, *J. Food Sci. Technol.*, 2016, **53**, 1929–1938.
 - 28 R. Krishnan, U. Dharmaraj and N. G. Malleshi, Influence of decortication, popping and malting on bioaccessibility of calcium, iron and zinc in finger millet, *LWT–Food Sci. Technol.*, 2012, **48**, 169–174.
 - 29 K. ichi Miyamoto, K. Hase, Y. Taketani, H. Minami, T. Oka, Y. Nakabou and H. Hagihira, Diabetes and glucose transporter gene expression in rat small intestine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, **181**, 1110–1117.
 - 30 Aoac, Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (OMA) is a publication of AOAC INTERNATIONAL comprised of more 3,000 validated methods, AOAC, Gaithersburg, Md, 2019.
 - 31 L. Merrill and B. K. Watt, Energy Value of Foods: Basis and Derivation, 1955.
 - 32 R. E. Burns, Method for Estimation of Tannin in Grain Sorghum1, *Agron. J.*, 1971, **63**, 511–512.

- 33 E. D. Maxson and L. W. Rooney, Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain, *Cereal Chem.*, 1972, **49**, 719–728.
- 34 M. L. Price, S. van Scoyoc and L. G. Butler, A Critical Evaluation of the Vanillin Reaction as an Assay for Tannin in Sorghum Grain, *J. Agric. Food Chem.*, 1978, **26**, 1214–1218.
- 35 V. L. Singleton, R. Orthofer and R. M. Lamuela-Raventós, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent., *Methods Enzymol.*, 1999, **299**, 152–178.
- 36 AOAC, Official Methods of Analysis: Section 994.12.14th, Association of Official Analytical Chemist, 2000.
- 37 H. J. Liu, B. Y. Chang, H. W. Yan, F. H. Yu and X. X. Liu, Determination of Amino Acids in Food and Feed by Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate and Reversed-Phase Liquid Chromatographic Separation, *J. AOAC Int.*, 1995, **78**, 736–743.
- 38 FAO, Dietary protein quality evaluation in human nutrition, *FAO Food Nutr. Pap.*, 2013, **92**, 1–66.
- 39 P. G. Reeves, F. H. Nielsen and G. C. Fahey, AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet, *J. Nutr.*, 1993, **123**, 1939–1951.
- 40 E. L. B. Novelli, Y. S. Diniz, C. M. Galhardi, G. M. X. Ebaid, H. G. Rodrigues, F. Mani, A. A. H. Fernandes, A. C. Cicogna and J. L. V. B. Novelli Filho, Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats, *Lab. Anim.*, 2007, **41**, 111–119.
- 41 B. Reynés, E. García-Ruiz, R. Díaz-Rúa, A. Palou and P. Oliver, Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet, *Food Res. Int.*, 2014, **64**, 839–848.
- 42 E. Bender and B. H. Doell, Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis, *Br. J. Nutr.*, 1957, **11**, 138–139.
- 43 D. M. Hegsted, Protein quality and its determination, *Food Proteins*, 1977, 347–362.
- 44 K. J. Livak and T. D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method, *Methods*, 2001, **25**, 402–408.
- 45 M. Grancieri, N. M. B. Costa, M. das G. Vaz Tostes, D. S. de Oliveira, L. de C. Nunes, L. de N. Marcon, T. A. Veridiano and M. L. Viana, Yacon flour (*Smallanthus sonchifolius*) attenuates intestinal morbidity in rats with colon cancer, *J. Funct. Foods*, 2017, **37**, 666–675.

- 46 R. Siegfried, H. Ruckemann and G. Stumpf, Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography, *Landwirtsch. Forsch.*, 1984, **37**, 298–304.
- 47 L. J. D. O'Donnell, J. Virjee and K. W. Heaton, Detection of pseudodiarrhoea by simple clinical assessment of intestinal transit rate, *BMJ*, 1990, **300**, 439.
- 48 J. Hammer and S. F. Phillips, Fluid loading of the human colon: Effects on segmental transit and stool composition, *Gastroenterology*, 1993, **105**, 988–998.
- 49 U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. FoodData Central, 2019, <https://fdc.nal.usda.gov>.
- 50 Codex Alimentarius, Guidelines on formulated complementary foods for older infants and young children, FAO, 1991, pp. 1–10.
- 51 F. Mariotti and C. D. Gardner, Dietary Protein and Amino Acids in Vegetarian Diets—A Review, *Nutrients*, 2019, **11**, 2661.
- 52 S. K. Saha and N. N. Pathak, Proteins and Other Nitrogenous Substances of Nutritional Significance, in *Fundamentals of Animal Nutrition*, 2021, pp. 65–92.
- 53 M. Friedman, Nutritional Value of Proteins from Different Food Sources. A Review, *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 6–29.
- 54 L. L. Bernardis and B. D. Patterson, Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions, *J. Endocrinol.*, 1968, **40**, 527–528.
- 55 P. Cronin, S. A. Joyce, P. W. O'toole and E. M. O'connor, Dietary Fibre Modulates the Gut Microbiota, *Nutrients*, 2021, **13**, 1655.
- 56 Faludi, M. C. de Oliveira Izar, J. F. K. Saraiva, A. P. M. Chacra, H. T. Bianco, A. A. Neto, A. Bertolami, A. C. Pereira, A. M. Lottenberg, A. C. Sposito, A. C. P. Chagas, A. C. Filho, A. F. Simão, A. C. de Alencar Filho, B. Caramelli, C. C. Magalhães, C. E. Negrão, C. E. dos S. Ferreira, C. Scherr, C. M. A. Feio, C. Kovacs, D. B. de Araújo, D. Magnoni, D. Calderaro, D. M. Gualandro, E. P. de Mello Junior, E. R. G. Alexandre, E. I. Sato, E. H. Moriguchi, F. H. Rached, F. C. dos Santos, F. H. Y. Cesena, F. A. H. Fonseca, H. A. R. da Fonseca, H. T. Xavier, I. C. P. Mota, I. de C. B. Giuliano, J. S. Issa, J. Diament, J. B. Pesquero, J. E. dos Santos, J. R. F. Neto, J. X. de Melo Filho, J. T. Kato, K. P. Torres, M. C. Bertolami, M. H. V. Assad, M. H. Miname, M. Scartezini, N. A. Forti, O. R. Coelho, R. C. Maranhão, R. D. dos Santos Filho, R. J. Alves, R. L. Cassani, R. T. B. Betti, T. de Carvalho, T. L. da R. Martinez, V. Z. R. Giraldez and W. S. Filho, Atualização da Diretriz

- Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017, *Arq. Bras. Cardiol.*, 2017, **109**, 1–76.
- 57 K. Nagao, M. Sato, M. Takenaka, M. Ando, M. Iwamoto and K. Imaizumi, Feeding Unsaponifiable Compounds from Rice Bran Oil Does Not Alter Hepatic mRNA Abundance for Cholesterol Metabolism-related Proteins in Hypercholesterolemic Rats, *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 2001, **65**, 371–377.
- 58 J. M. Wong, R. de Souza, C. W. Kendall, A. Emam and D. J. Jenkins, Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids, *J. Clin. Gastroenterol.*, 2006, **40**, 235–243.
- 59 J. G. Barrera, D. A. Sandoval, D. A. D’Alessio and R. J. Seeley, GLP-1 and energy balance: an integrated model of short-term and long-term control, *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2011, **7**, 507–516.
- 60 N. B. Danneskiold-Samsøe, H. Dias de Freitas Queiroz Barros, R. Santos, J. L. Bicas, C. B. B. Cazarin, L. Madsen, K. Kristiansen, G. M. Pastore, S. Brix and M. R. Maróstica Júnior, Interplay between food and gut microbiota in health and disease, *Food Res. Int.*, 2019, **115**, 23–31.
- 61 H. Barrett, N. F. Farhadi and T. J. Smith, Slowing starch digestion and inhibiting digestive enzyme activity using plant flavanols/tannins— A review of efficacy and mechanisms, *LWT–Food Sci. Technol.*, 2018, **87**, 394–399.
- 62 H. Cao and X. Chen, Structures Required of Flavonoids for Inhibiting Digestive Enzymes, *Anticancer Agents Med. Chem.*, 2012, **12**, 929–939.
- 63 J. S. Kim, T. K. Hyun and M. J. Kim, The inhibitory effects of ethanol extracts from sorghum, foxtailmillet and proso millet on α -glucosidase and α -amylase activities, *Food Chem.*, 2011, **124**, 1647– 1651.
- 64 S. Shobana, Y. N. Sreerama and N. G. Malleshi, Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of α -glucosidase and pancreatic amylase, *Food Chem.*, 2009, **115**, 1268–1273.
- 65 K. Shukla and S. Srivastava, Evaluation of finger millet incorporated noodles for nutritive value and glycemic index, *J. Food Sci. Technol.*, 2014, **51**, 527–534.
- 66 J. J. Jhang, J. H. Lin and G. C. Yen, Beneficial Properties of Phytochemicals on NLRP3 Inflammasome-Mediated Gout and Complication, *J. Agric. Food Chem.*, 2018, **66**, 765–772.
- 67 B. P. da Silva, D. M. Dias, M. E. de Castro Moreira, R. C. L. Toledo, S. L. P. da Matta, C. M. della Lucia, H. S. D. Martino and H. M. Pinheiro-Sant’Ana, Chia Seed Shows Good

- Protein Quality, Hypoglycemic Effect and Improves the Lipid Profile and Liver and Intestinal Morphology of Wistar Rats, *Plant Foods Hum. Nutr.*, 2016, **71**, 225–230.
- 68 Y. Duangnumswang, J. Zentek and F. Goodarzi Boroojeni, Development and Functional Properties of Intestinal Mucus Layer in Poultry, *Front. Immunol.*, 2021, **12**, 745849.
- 69 X. Sun and M. J. Zhu, AMP-activated protein kinase: a therapeutic target in intestinal diseases, *OpenBiol.*, 2017, **7**, 8, DOI: 10.1098/rsob.170104.
- 70 J. Dyer, A. Garner, I. S. Wood, A. K. Sharma, I. Chandranath and S. P. Shirazi-Beechey, Changes in the levels of intestinal Na⁺/glucose co-transporter (SGLT1) in experimental diabetes, *Biochem. Soc. Trans.*, 1997, **25**, 479S–479S.
- 71 J. Rosenstock, J. Marquard, L. M. Laffel, D. Neubacher, S. Kaspers, D. Z. Cherney, B. Zinman, J. S. Skyler, J. George, N. Soleymanlou and B. A. Perkins, Empagliflozin as Adjunctive to Insulin Therapy in Type 1 Diabetes: The EASE Trials, *Diabetes Care*, 2018, **41**, 2560–2569.
- 72 P. A. Diaz-Valencia, P. Bougnères and A. J. Valleron, Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review, *BMC Public Health*, 2015, **15**, DOI: 10.1186/s12889-015-1591-y.
- 73 J. Kalra, S. B. Mangali, D. Dasari, A. Bhat, S. Goyal, I. Dhar, D. Sriram and A. Dhar, SGLT1 inhibition boon or bane for diabetes-associated cardiomyopathy, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 2020, **34**, 173–188.
- 74 B. Pitt, G. Steg, L. A. Leiter and D. L. Bhatt, The Role of Combined SGLT1/SGLT2 Inhibition in Reducing the Incidence of Stroke and Myocardial Infarction in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus, *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 2022, **36**, 561–567.
- 75 K. Li, F. Yao, J. Du, X. Deng and C. Li, Persimmon Tannin Decreased the Glycemic Response through Decreasing the Digestibility of Starch and Inhibiting α -Amylase, α -Glucosidase, and Intestinal Glucose Uptake, *J. Agric. Food Chem.*, 2018, **66**, 1629–1637.
- 76 K. Noonong, K. Pranweerapaiboon, K. Chaithirayanon, K. Surayarn, P. Ditracha, N. Changklungmoa, P. Kueakhai, P. Hiransai and K. Bunluepuech, Antidiabetic potential of *Lysiphyllumstrychnifolium* (Craib) A. Schmitz compounds in human intestinal epithelial Caco-2 cells and molecular docking-based approaches, *BMC Complementary Med. Ther.*, 2022, **22**, 1–11.
- 77 O. Golovinskaia and C. K. Wang, The hypoglycemic potential of phenolics from functional foods and their mechanisms, *Food Sci. Hum. Wellness*, 2023, **12**, 986–1007.
- 78 S. R. Das, B. M. Everett, K. K. Birtcher, J. M. Brown, J. L. Januzzi, R. R. Kalyani, M.

Kosiborod, M. Magwire, P. B. Morris, J. J. Neumiller and L. S. Sperling, 2020 Expert Consensus Decision Pathway on Novel Therapies for Cardiovascular Risk Reduction in Patients With Type 2 Diabetes: A Report of the American College of Cardiology Solution Set Oversight Committee, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2020, **76**, 1117–1145.

FOOTNOTES

[†] Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <<https://doi.org/10.1039/d2fo02915d>> (appendix G).

Artigo 2: The effects of acute consumption of a beverage based on extruded whole grain pearl millet flour on glycemic and insulinemic control, food intake, and appetite sensation in adults: a randomized crossover clinical trial.

* Will be submitted to the Journal of Cereal Science (Impact factor: 3.8)

ABSTRACT

Whole grain pearl millet is a nutritious cereal with fiber, vitamins, minerals, and bioactive compounds. It offers health benefits like glycemic control and satiety. When processed through extrusion cooking in order to make different formulations, such as beverage, its chemical composition may change, affecting its nutritional value. The aim of this study was to evaluate the sensory acceptability of an extruded millet flour beverage and the effect of its acute consumption on the glycemic index, glycemic and insulinemic response, food intake and subjective appetite sensations in euglycemic and eutrophic adults. This is This is an acute, single-blind, randomized, controlled, crossover clinical study with 14 euglycemic and eutrophic adults. Initially, beverages based on whole extruded millet flour were developed, sensorially and chemically analyzed. Next, a clinical trial was carried out in which participants underwent four sessions during which they consumed one of the following options: the extruded millet beverage, a maltodextrin control beverage or a glucose solution, the latter being administered in two separate sessions. Blood glucose, insulin and appetite responses were assessed over a 2-hour period, in addition to determining the glycemic index of the beverages and analyzing food intake in the 24 hours following each session. The extruded millet flour strawberry flavor beverage had the best sensory acceptance and was classified as high glycemic index. Consumption of the extruded millet beverage showed similar glycemic and insulinemic responses, as well as appetite control and food intake of the subjects, when compared to consumption of the maltodextrin control beverage. In conclusion, the results indicate that intake of the extruded millet beverage maintained glycemic and insulinemic responses, appetite control, and food intake in euglycemic and eutrophic subjects.

Keywords: *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. Extrusion cooking. Glucose metabolism. Insulin hormone. Energy intake. Satiety.

1 INTRODUCTION

The changes in the eating habits and lifestyles of the world's population caused by industrialization, economic development, and globalization, have directly influenced eating habits, increasing consumption of ultra-processed foods, that can be rich in saturated fats, sugars, salt and chemical additives, which has contributed to increased rates of obesity, diabetes and other chronic diseases (Yuen et al., 2016; Zhang and Giovannucci, 2022). This fact reduced the consumption of whole foods, such as grains with high density in nutrient and phytochemical, with potential health benefits (Bembem and Agrahar-Murugkar, 2020).

Among the whole cereals, pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) stands out due the content of dietary fiber, around 11.5% to 31.7% of which is insoluble dietary fiber and 2.0% to 3.7% soluble dietary fiber, resistant starch ranging from 9.0% to 16.5%, vitamins of complex B (Kaimal et al., 2021; Krishnan et al., 2012; Saleem et al., 2023), minerals, as calcium, iron, phosphorus, potassium and magnesium (Ragae et al., 2006; Saldivar, 2003; Taylor, 2016), bioactive compounds, such as phenolics, especially ferulic and p-coumaric (Dias-Martins et al., 2018; Siroha et al., 2016), showing high nutritional values relative to staple food cereal, such as rice, corn and wheat (Dias-Martins et al., 2018; Taylor, 2016).

In addition, its chemical composition can contribute to the improvement of glycemic and insulinemic control, as well as aid in appetite regulation and satiety sensation (Almaski et al., 2023). Pearl millet with its fiber-rich matrix and phenolics help stabilize blood sugar levels (Singh et al., 2020; Theodoro et al., 2021), avoiding blood glucose spikes and promoting a more balanced insulinemic response (Kamatar et al., 2012), as well as by stimulating appetite-suppressing hormones such as leptin, glucagon-like peptide 1, and peptide YY and delaying gastric emptying (Alyami et al., 2019b; Hervik and Svihus, 2019; Ren et al., 2018). This is especially beneficial for people with diabetes or those seeking to control their weight.

Different grain processing techniques can be used with the intention of diversifying foods and improving their technological function and nutritional quality. The extrusion cooking process allows to use millets in different formulation, such as a main ingredient in beverages, since it allows the expansion of the grain, resulting in a softer texture (Ferreira et al., 2021) and with greater solubilization of the solid components in liquid medium (Moura et al., 2011). The modification in the food matrix, dietary fiber (Pessanha et al., 2021), protein digestibility, phytochemicals (Balasubramanian et al., 2012; Cardoso et al., 2015; Marques et al., 2018), and in the structure of starch, increasing its breakdown (Albarracín et al., 2019; Zhang et al., 2021),

and can improve the bioavailability of nutrients and phytochemicals, bringing healthy benefits to today's lifestyle.

So far, few beverages containing extruded cereals have been developed and evaluated in relation to glucose metabolism. A study by Anunciação et al. (2018) investigated the effect of consumption of an extruded beverage containing sorghum on postprandial glycemia in eutrophic and normoglycemic subjects, while Liu et al. (2021) investigated the postprandial glycemic response in healthy subjects after consumption of an extruded oat beverage. Both studies found a reduction in peak of postprandial blood glucose. However, to date, no studies were found investigating the effect of pearl millet extruded beverage on glycemic index, glucose metabolism and appetite. Most of the existing studies used different formulations, in the form of millet flours or grains to prepare foods such as couscous, porridges (Alyami et al., 2019b; Hayes et al., 2021), muffins and *rotis* (a type of flatbread toasted on a hot griddle) (Shobana et al., 2022). These studies demonstrated that the glycemic index is related to the processing of the grain and that millet has beneficial effects on glucose metabolism and appetite control. These observations highlight the need for further research to explore the potential of pearl millet in relation to glucose metabolism and appetite, considering different forms of preparation and their respective responses.

The development of white pearl millet-based beverages using the extrusion cooking technique represents an innovative and promising approach to creating healthy and nutritious beverage options. These beverages not only offer a tasty alternative but may also contribute to overall well-being by helping to control glucose levels, manage appetite, and promote a balanced diet. Our hypothesis is that acute consumption of an extruded white grain pearl millet beverage reduces glycemic response by controlling glucose levels after intake. Furthermore, it increases the insulinemic response, indicating a possible beneficial effect on insulin regulation, as well as influences food intake, potentially leading to a lower amount consumed and provides a reduced subjective sense of appetite. Based on this, the present study aimed to evaluate the effect of acute consumption of an extruded pearl millet flour beverage on glycemic and insulinemic response, food intake and subjective sense of appetite in euglycemic and eutrophic adults.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Preparation of extruded flour

The pearl millet grains (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.), hybrid ADRg 9070, used in the experiment, belong to the harvest held in the municipality of Itiquira (MT), 2nd crop/2021. The extruded whole grains pearl millet was provided by Embrapa Food Technology, located in Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

In summary, the grains were extruded using a co-rotating twin-thread extruder, Cleextral Evolum HT25 (Cleextral Inc., Firminy, France), with a screw diameter of 25 mm, a length-to-diameter ratio of 40:1, and ten temperature zones. The screw rotation speed was adjusted according to the desired characteristics such as texture, density, and expansion of the products, and the temperature profile starting from the feeding zone was set at different values: 30, 30, 40, 80, 110, 110, 110, 110, 110, 110 and 110 °C. The whole millet flour was fed into the extruder's feeding zone using a gravimetric loss-in-weight feeder, model GRMD15 (Schenck Process, Darmstadt, Germany), equipped with a twin-thread. The flow rate was kept constant and adjusted according to the required parameters, monitored by the Schenck Process Easy Serve software (Schenck Process, Darmstadt, Germany). The configuration of the extruder screw can be found in the work by Vargas-Solórzano et al. (2014). Subsequently, the extrudates were subjected to a drying process in an oven with air circulation at 60 °C for a period of 2 hours. After drying, the extruded flakes were ground in a hammer rotor mill at 3000 rpm, equipped with a sieve with a mesh opening of 1 mm. The extruded whole millet flour was stored at -12 °C (Theodoro et al., 2021).

2.2 Development of beverages

The beverages used in the study were prepared at the New Product Development Laboratory of the Nutrition Department (DNS) of the Federal University of Viçosa (UFV). Eight beverages were developed (Table 1), including test beverages and control beverages, with four different flavors: control beverage containing maltodextrin (n = 4) and beverage containing extruded millet flour (n = 4). The ingredients were weighed on a digital scale model 9094C/5 (Toledo, São Paulo, Brazil) and mixed using a BMX201 mixer (Britânia, Curitiba, Brazil) for 1 minute at room temperature. The final volume of each beverage was approximately 290 mL. Both types of beverages contained 25 g of available carbohydrates (ISO, 2010), calculated based on the chemical and nutritional characterization of extruded pearl millet and the

nutritional information on the labels of the other ingredients used in the preparation. Any changes in beverage color and texture due to ingredient composition were observed.

Table 1. Composition of the beverages

Ingredients (g)	Millet beverage	Control beverage
Filtered water (mL)	250.00	250.00
Extruded millet flour	30.00	-
Maltodextrin	-	21.00
Flavoring		
Guava	7.00	7.00
Orange	8.00	8.00
Passion fruit	8.00	8.00
Strawberry	7.00	7.00

2.3 Sensory analysis

Sensory analysis of the extruded millet beverage was conducted with four different flavors (strawberry, orange, passion fruit, and guava) to select one of the flavors for further chemical and centesimal analysis and use in the acute clinical study. For this purpose, 60 participants of both genders, aged between 18 and 59 years, who were accustomed to consuming similar products to those being tested, were randomly recruited from the campus of the Federal University of Viçosa, Brazil. Each participant signed the consent form. The samples were labeled with a three-digit non-consecutive code and presented to the consumers monadically, following a completely randomized block design, accompanied by a glass of room temperature water, a nine-point hedonic scale (ranging from (1) extremely disliked to (9) extremely liked) to evaluate the attributes of appearance, flavor, texture, and overall impression, and a five-point purchase intention scale ranging from 1 (definitely would buy) to 5 (definitely would not buy).

2.4 Chemical composition of test beverage

The composition of whole grain extruded millet beverage was analyzed for moisture, protein, dietary fiber, lipid, carbohydrate, available carbohydrate, total caloric value, total phenolics and resistant starch (Table 2). Moisture content was determined by subjecting the samples to an oven model 400/6ND (Nova Ética, São Paulo, Brazil) set at 105 °C, while ash content was quantified using a muffle furnace Q320 M model (Quimis, Diadema, Brazil) at 550 °C. Protein content was assessed using the micro-Kjeldahl method, total dietary fiber and fractions were measured using the gravimetric-enzymatic method, lipids were determined

through the Soxhlet method AOAC (2019), and resistant starch by procedures and enzyme kit K-RSTAR (Megazyme[®], Bray, Irlanda). Carbohydrate content was calculated by subtracting the sum of moisture, lipids, proteins, total dietary fiber, and ash from 100%. The quantification of available carbohydrates involved subtracting the fiber content from the total carbohydrate composition. The total energy value of the extruded millet beverage was estimated based on conversion factors of 4 kcal/g for protein and carbohydrate, and 9 kcal/g for lipids (Merrill and Watt, 1955). The Folin-Ciocalteu method was employed to assess the concentration of total phenolic compounds in the flour. A spectrophotometer MultiskanGo (Thermo Scientific[®], California, USA) was used to measure the absorbance at a wavelength of 765 nm. To quantify the phenolic compounds, an analytical curve was generated by measuring the absorbance of solutions with various concentrations of gallic acid. The finding was reported as milligrams of gallic acid equivalents per gram of the sample (mg GAE/g). The composition of maltodextrin control beverage was theoretically determined based on the nutritional information provided on the labels of the ingredients used in its preparation.

Table 2. Nutrient profile and composition of the beverages

	Millet beverage (290 mL)			Control beverage (290 mL)		
	Extruded millet flour	Strawberry flavoring	Total	Maltodextrin	Strawberry flavoring	Total
Weight (g)	30.00	7.00	37.00	21.00	7.00	28.00
Energy (kcal)	110.62	20.16	130.78	80.64	20.16	100.80
CHO (g)	22.50	5.04	27.54	20.16	5.04	25.20
ACHO (g)	20.07	5.04	25.11	20.16	5.04	25.20
RS (g)	0.10	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00
TDF (g)	2.39	0.00	2.39	0.00	0.00	0.00
IDF (g)	2.05	0.00	2.05	0.00	0.00	0.00
SDF (g)	0.34	0.00	0.34	0.00	0.00	0.00
PTN (g)	3.29	0.00	3.29	0.00	0.00	0.00
LIP (g)	0.85	0.00	0.85	0.00	0.00	0.00
TPC (mg GAE/g)	2.36	0.00	2.36	0.00	0.00	0.00

CHO (carbohydrates); ACHO (available carbohydrates); RS (resistant starch); TDF (total dietary fiber); IDF (insoluble fiber); SDF (soluble fiber); PTN (proteins); LIP (lipids); TPC (total phenolic contents).

2.5 Participants acute clinical trial

The study was conducted at the Department of Nutrition and Health, located at the Federal University of Viçosa (Minas Gerais, Brazil). Participants were recruited in 2022 through advertisements in the local community and social media. They completed an online

structured questionnaire, about age, weight, height, dietary habits, lifestyle, personal and family medical history, and a questionnaire to assess habitual physical activity level (IPAQ) (Ainsworth et al., 2000). The volunteers that met the inclusion criteria were invited to complete three 24 hours dietary records on different non-consecutive days, including two weekdays and one day on the weekend. They also underwent a laboratory screening that included an assessment of habitual food intake through a food frequency questionnaire (FFQ), blood pressure with a self-inflating blood pressure monitor model HEM-7200 (Omron, Kyoto, Japan), and anthropometric measurements such as weight, height, and body fat percentage using bioimpedance analysis model BC-558 (Tanita[®], Tokyo, Japan). Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by the square of height (m²).

To determine the eligibility of participants, the following criteria were established: individuals of both sexes, aged between 18 and 60 years, euglycemic (fasting capillary blood glucose ranging from 70 to 99 mg/dL), who had the habit of regularly consuming breakfast, had a BMI within the normal range (18.5–24.9 kg/m²) (WHO, 2000), body fat percentage between 20% and 30% for females and between 12% and 20% for males (Rubio Herrera et al., 2007), and engaged in light physical activity, according to the IPAQ (Ainsworth et al., 2000). The non-inclusion criteria included: smoking, alcohol consumption exceeding 2 drinks per day (> 50g of ethanol/day), type 1 or type 2 diabetes or prediabetes (fasting glucose between 100 and 125 mg/dL), first-degree family history of diabetes mellitus, use of medications affecting blood glucose, energy metabolism, or appetite, or use of herbs or diets for appetite and weight reduction, weight instability (gain or loss of approximately 3 kg in the 3 months prior to the study), recent change in the level of physical activity, aversion or intolerance to the study foods, presence or history of digestive, hepatic, renal, cardiovascular, thyroid or recent inflammatory diseases, diagnosis of cancer in the previous year, reporting of eating disorders, and being pregnant or lactating. Finally, during the trial, exclusion criteria included: absence from the study for two consecutive weeks, discomfort during the analysis such as nausea, dizziness, and faintness, or the emergence of any of the previously mentioned non-inclusion criteria.

The sample size calculation was based on Mera et al. (1998) and performed using Statistical Package for the Social Science software version 22.0 (SPSS) (IBM[®], Chicago, United States), considering the incremental area under the curve (iAUC) and the standard deviation (SD) of postprandial glycaemic response as the main variable according to the values published by Morgan et al. (1990). A statistical power of 80% and a 10% difference in iAUC were also considered. Thus, 14 volunteers were included in this phase of the study.

2.6 Experimental procedures for the acute clinical study

This is a simple-blind, randomized, controlled, crossover clinical trial. After signing the consent form, each participant randomly (randomization at <www.random.org>) consumed the control beverage once, the extruded millet beverage once, and the glucose beverage twice (25 g of anhydrous glucose in 250 mL of filtered water), without prior knowledge of the allocated treatment.

On the evening before each experimental day, and after abstaining from physical exercise for 24 hours and alcohol for 48 hours to reduce intra-subject variability, all volunteers consumed a standard dinner provided by the researchers to minimize potential interference in the glycemic response. The standard dinner consisted of 200 mL of grape juice and 170 g of chicken lasagna (made up of 30 g of lasagna noodles and 60 g of shredded chicken, prepared with tomato sauce, onion, garlic, salt, soybean oil, green corn and mozzarella, which provided 336 kcal, 61.4% carbohydrates, 23.4% proteins, 15.2% lipids). The nutritional composition of this meal was determined according to the information on the label and the nutritional composition tables (NEPA and UNICAMP, 2011). After a 10 hour overnight fast, each participant visited the laboratory four times in the morning (between 7:00 am and 8:30 am), with a 2 days washout period between visits to be allocated to the other group. While still fasting, the participants' body weight, as well as their blood glucose levels (two measurements at -5 and 0 min to calculate the means), insulin, and subjective appetite sensation were evaluated. Subsequently, the participants were asked to consume the offered beverage within 15 minutes (maltodextrin control beverage, extruded millet beverage, or anhydrous glucose). The beverages were prepared with the same color and flavor, except for the anhydrous glucose, and were served in dark, frosted glasses to minimize possible visual and taste conditioning. After consuming the beverage, the participants remained in the laboratory for 2 hours for postprandial blood glucose and insulin measurements and evaluation of subjective appetite sensations (VAS). They were not allowed to consume any food or drink during this period. After completing the study protocol, the subjects were invited to consume a standardized *ad libitum* snack and were released to continue their normal daily activities under free-living conditions. They were asked to record the types and quantities of foods consumed in the following 24 hours (Figure 1). Throughout the trial, participants were encouraged to maintain a consistent level of physical activity and lifestyle.

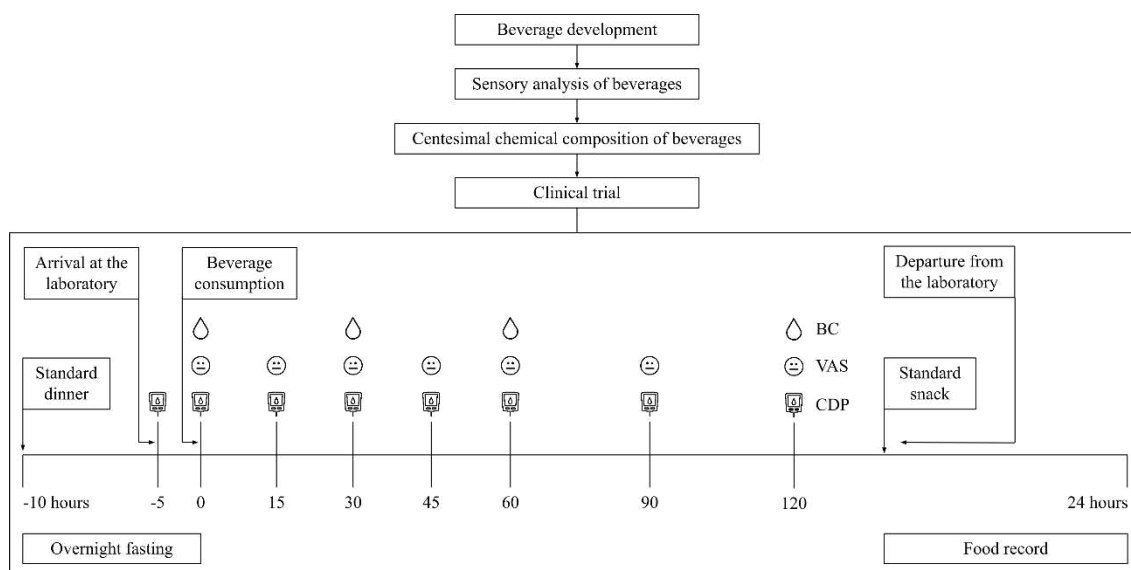


Figure 1. Experimental design of the acute clinical trial. BC (blood collection); VAS (subjective appetite sensations); CDP (capillar digitaly puncture).

2.7 Blood glucose and insulin assessment

The incremental areas under the curve (iAUCs) for serum glucose and insulin were the primary outcomes of the present study. Capillary blood samples were collected through finger pricks at different time points, including -5 and 0 minutes (fasting state), as well as 15, 30, 45, 60, 90, and 120 minutes after the intake of each beverage or glucose load. Participants were instructed to warm their hands before performing the finger prick in order to improve blood flow. Blood collection involved gently massaging the fingertips from the base of the hand towards the fingertips to minimize plasma dilution. Glucose concentration was measured using disposable lancets (F. Hoffmann–La Roche Ltd, Basel, Switzerland) and measured with the Accu-Chek Performa[®] glucometer (F. Hoffmann–La Roche Ltd, Basel, Switzerland).

Venous blood samples were collected at four distinct time points: fasting (time 0), 30, 60, and 120 minutes after the intake of each beverage to evaluate insulin iAUC. The collections were performed by a hired nurse, and blood was collected in tubes containing clot activator and gel. The samples were stored under refrigeration (0 to 4 °C) until the end of the 2 hours of collection. After this period, centrifugation was performed at 3500 rpm for 10 minutes, the serum was separated and stored at -20 °C, and subsequently sent to a local clinical laboratory for insulin concentration measurement.

Both iAUCs were calculated from 0 to 120 minutes using the trapezoidal method, corrected by subtracting the baseline glucose value of each participant from the following values to obtain the variation (Δ), following the protocol of FAO (1998).

2.8 Appetite and food intake assessment

During each trial, subjective appetite ratings (hunger, satisfaction, fullness, food prospective consumption (PFC), and desire to eat something sweet, salty, tasty, or fatty) were assessed at different time points: while fasting (0 minutes) and subsequently at 15, 30, 45, 60, 90, and 120 minutes after intake of the tested beverages. Visual analog scales measuring 10 cm were used to record these ratings (Flint et al., 2000). The beverages were provided to participants without identification, and trained researchers instructed them on how to complete the VAS. Scores were assigned by measuring the distance from point 0 using a ruler. Lower appetite scores were associated with greater appetite suppression. To evaluate the overall appetite sensation response, the area under the curve (AUC) for 2 hours was calculated using the trapezoid method (Matthews et al., 1990). Additionally, at each measurement time, the composite satiety score (CSS) was determined using the following equation: $CSS (cm) = (satisfaction + fullness + (100 - PFC) + (100 - hunger))/4$. A higher CSS was associated with a greater sense of satisfaction and subsequent decreased motivation to eat (Gilbert et al., 2012). To calculate the VAS and CSS values, the correction was applied by subtracting the individual baseline values from the subsequent measurements in order to obtain the variations (Δ).

In order to assess food intake, a specific form was used to record food intake within 24 hours after consuming each tested beverage. The recorded information included meal times and locations, as well as the types and quantities of food consumed, which could be measured in grams or household measures. To ensure the accuracy of the dietary records, each entry was reviewed in the presence of the participant. The data regarding grams, caloric intake, macronutrients, and dietary fiber recorded on the forms were analyzed using the Avanutri[®] software (Avanutri and Nutrition, Três Rios, Brazil).

2.9 Glycemic index ratings

The method of calculating the area under the glycemic response curve was employed to determine the glycemic index of each beverage. This procedure compared the area under the glycemic response curve for 25 g of available carbohydrate in the test food (maltodextrin control beverage and extruded millet beverage) with the average area under the glycemic response curve for 25 g of available carbohydrate in the reference food (anhydrous glucose) (FAO, 1998; ISO, 2010). The resulting ratio was multiplied by 100 to express the GI as a percentage. The average GI of the fourteen individuals was calculated.

2.10 Statistical analysis

The sensory test data was subjected to one-way ANOVA analysis of variance, followed by the Tukey test. For the other variables, the Kolmogorov-Smirnov and Levene tests were applied to assess the normality of the distribution and the homoscedasticity of the variances, respectively. The ANOVA two-way analysis of variance for repeated measures was applied, followed by the Bonferroni test. Data was presented as mean and standard deviation. The analyses were carried out using GraphPad prism software version 8.0 (Dotmatics, Massachusetts, United States) and Statistical Package for the Social Science (SPSS) version 22.0 (IBM®, New York, USA). The adopted significance level was 5% ($\alpha = 0.05$).

2.11 Compliance with ethical standards

All procedures performed in this study involving humans complied with the ethical standards of the Federal University of Viçosa. The study was approved by the Ethics Committee on Human Research of the Federal University of Viçosa (CEP/UFV), registration no. 5.574.130, and all participants signed the informed consent form. The trial was also registered in the Brazilian Registry of Clinical Trials (ReBEC), available at: <http://www.ensaiosclinicos.gov.br>, registration no. RBR-2tx7m8v.

3 RESULTS

3.1 Sensory analysis

The sensory evaluation of the beverages formulated with extruded whole millet flour are presented in Figure 2. The strawberry-flavored extruded millet beverage presented the highest scores in terms of taste, global impression, and buying intent compared to the orange-flavored millet beverage ($p < 0.05$). Furthermore, the strawberry-flavored millet beverage also stood out with better appearance ($p < 0.05$) compared to the other flavors. Therefore, the strawberry-flavored extruded millet beverage was selected for use in the acute clinical study.

A

Characteristic	Sample			
	Passion fruit	Strawberry	Guava	Orange
Taste	6.67 ± 2.10 ^a	6.80 ± 1.27 ^a	6.38 ± 1.91 ^{ab}	5.68 ± 2.17 ^b
Texture	7.28 ± 1.44 ^a	7.03 ± 1.48 ^a	6.98 ± 1.72 ^a	6.78 ± 1.75 ^a
Appearance	6.43 ± 1.72 ^{bc}	7.67 ± 1.41 ^a	6.82 ± 1.81 ^b	5.80 ± 1.78 ^c
Global impression	6.63 ± 1.84 ^{ab}	7.05 ± 1.27 ^a	6.50 ± 1.86 ^{ab}	5.85 ± 1.92 ^b
Buying intent	2.78 ± 1.09 ^{ab}	2.68 ± 1.00 ^b	2.92 ± 1.27 ^{ab}	3.30 ± 1.12 ^a

Means and standard deviations followed by different letters differ by ANOVA test ($p < 0.05$).

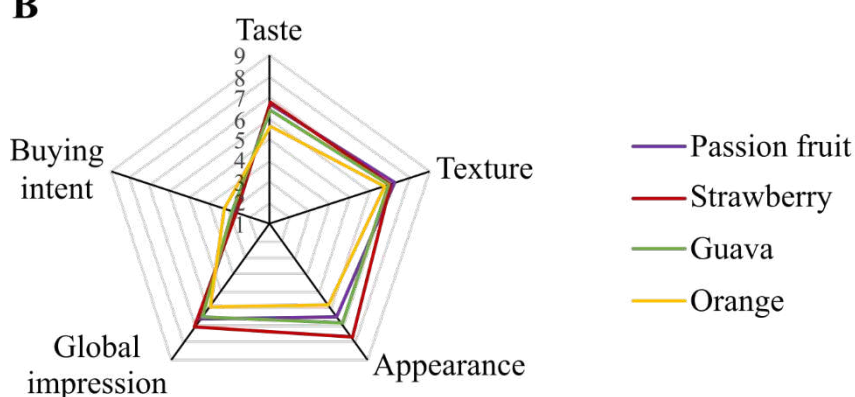
B

Figure 2. Sensory evaluation of extruded millet beverages with different flavors ($n = 60$). (A) table of results; (B) radar chart.

3.2 Participant characteristics

Twenty-six participants were originally enrolled in the study. However, five participants were not included due to having a BMI or body fat percentage above the established criteria, one participant due to having a first-degree relative with prediabetes, and one participant due to being vegetarian. During the trial, two volunteers were excluded due to the inability to undergo blood collection, one due to having a fasting blood glucose above 99 mg/dL, and two due to being unable to attend the laboratory on the required date. In the end, fourteen participants of both sexes completed the full trial. The participants had a mean age of 26.86 ± 2.27 years, BMI of 21.09 ± 0.35 kg/m², and body fat percentage of $19.76 \pm 1.72\%$. Other baseline characteristics of the participants are presented in Table 3.

Table 3. Baseline characteristics of the subjects ($n = 14$)

Participants ($n = 14$)	Mean \pm SD
Age (years)	26.86 \pm 2.27
Body weight (kg)	57.43 \pm 1.52
Height (m)	1.65 \pm 0.02
Body mass index (kg/m ²)	21.09 \pm 0.35
Waist circumference (cm)	72.82 \pm 0.97
Hip circumference (cm)	95.25 \pm 0.95
Waist-hip ratio	0.76 \pm 0.01
Neck circumference (cm)	31.40 \pm 0.70
Thigh circumference (cm)	51.83 \pm 0.70
Body fat (%)	19.76 \pm 1.72
Basal metabolic rate (kcal)	1396.07 \pm 55.79
Systolic blood pressure (mmHg)	108.79 \pm 2.62
Diastolic blood pressure (mmHg)	67.29 \pm 1.72
Fasting blood glucose (mg/dL)	84.79 \pm 1.45
Fasting blood Insulin (mg/dL)	4.8 \pm 0.50

3.3 Glycemic and insulinemic responses

The glycemic and insulinemic response was expressed as the changes mean in glucose and insulin levels relative to baseline at different time points. Acute consumption of the beverage containing 30 g of extruded millet flour showed no difference in Δ glucose values compared to the control beverage ($p > 0.05$) (Figure 3A and 3B), although it did show a slight reduction compared to the control beverage. The same result was observed for Δ insulin values ($p > 0.05$) (Figure 3C and 3D). The iAUC between 0 and 120 minutes during the postprandial period was also analyzed for blood glucose and insulin levels, and the values did not differ between the beverages ($p > 0.05$).

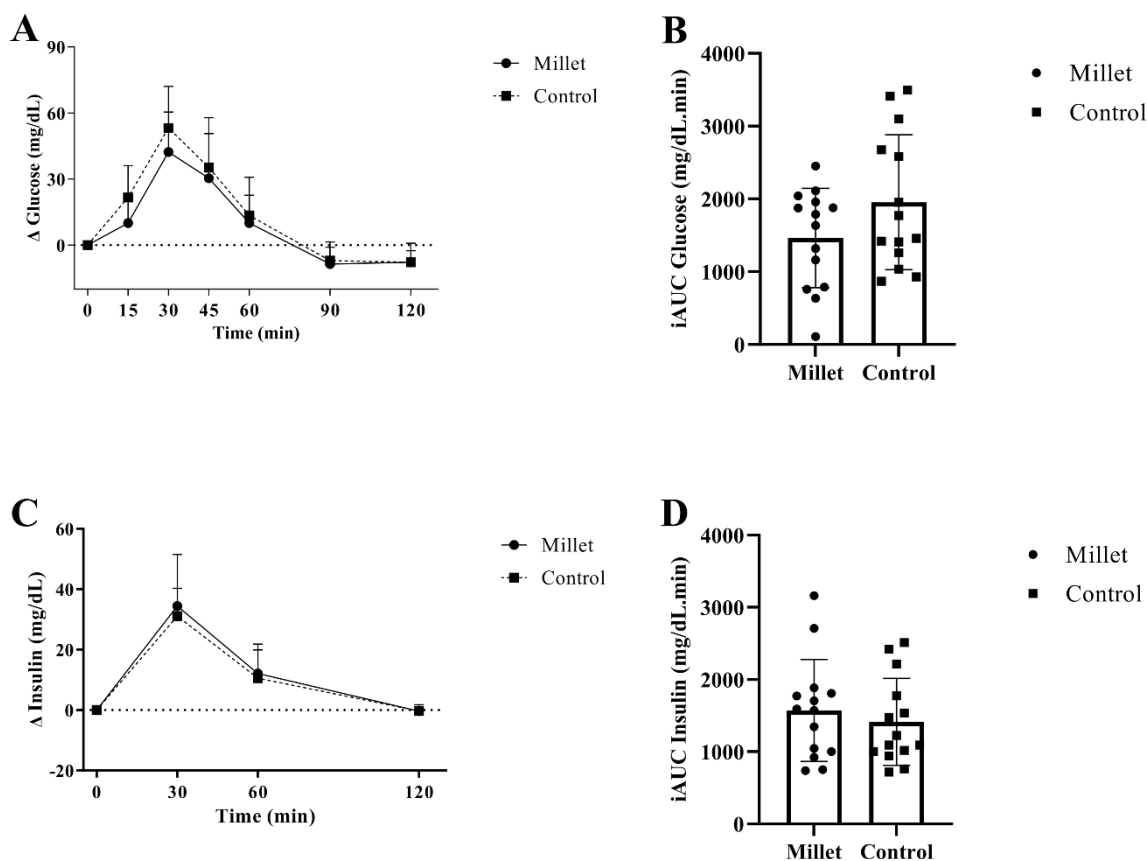


Figure 3. Graph of blood glucose and insulin values for participants who consumed the extruded millet test beverage and the maltodextrin control beverage ($n = 14$). (A) mean Δ glucose values (mg/dL); (B) mean glucose iAUC values (mg/dL.min); (C) mean Δ insulin values (mg/dL); (D) mean insulin iAUC values (mg/dL.min); iAUC (incremental area under the curve). Means and standard deviations followed by an asterisk differ by two-way repeated measures ANOVA ($p < 0.05$) or paired t test ($p < 0.05$).

3.4 Food intake

The results were analyzed to determine if total energy intake and micronutrient intake differed in response to habitual consumption and the control or test beverages. Energy intake was estimated through a self-reported 24-hour dietary recall, including the *ad libitum* snack provided in the laboratory after the experiment and the intake recorded in the subsequent hours to complete 24 hours. There was no significant difference in total energy intake, carbohydrates, proteins and lipids between the study groups ($p > 0.05$) (Figure 4).

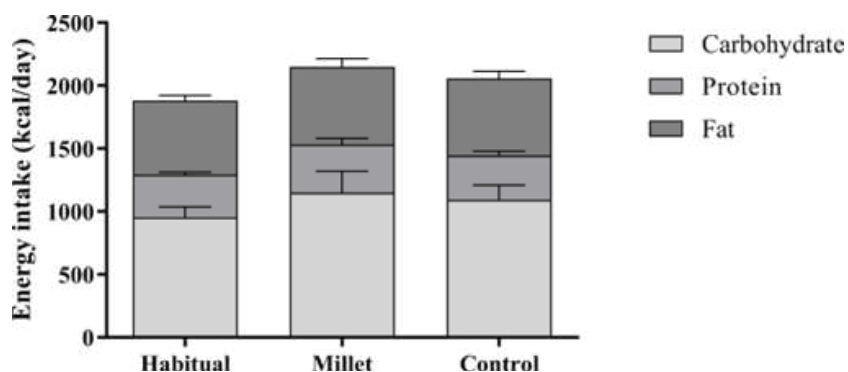


Figure 4. Habitual and test/control day energy intake ($n = 14$). Habitual (total calories estimated from the average of three 24-hour dietary recalls); Millet and Control (total calories estimated from 24-hour dietary recalls, starting from the moment participants consumed the standardized *ad libitum* snack in the laboratory after the trial). Means and standard deviations followed by an asterisk differ by two-way repeated measures ANOVA ($p < 0.05$).

3.5 Appetite ratings

Appetitive sensations were expressed as variations in visual analog scale ratings (Figure 5). No significant differences were observed between the groups or interaction between time (15, 30, 45, 60, 90, and 120 minutes) and group after intake of the beverage containing extruded millet compared to the control beverage for variations (Δ) in hunger (Figure 5A), satisfaction (Figure 5B), fullness (Figure 5C), food prospective consumption (Figure 5D), and desire to eat something sweet (Figure 5E), salty (Figure 5F), tasty (Figure 5G), or fatty (Figure 5H) ($p > 0.05$).

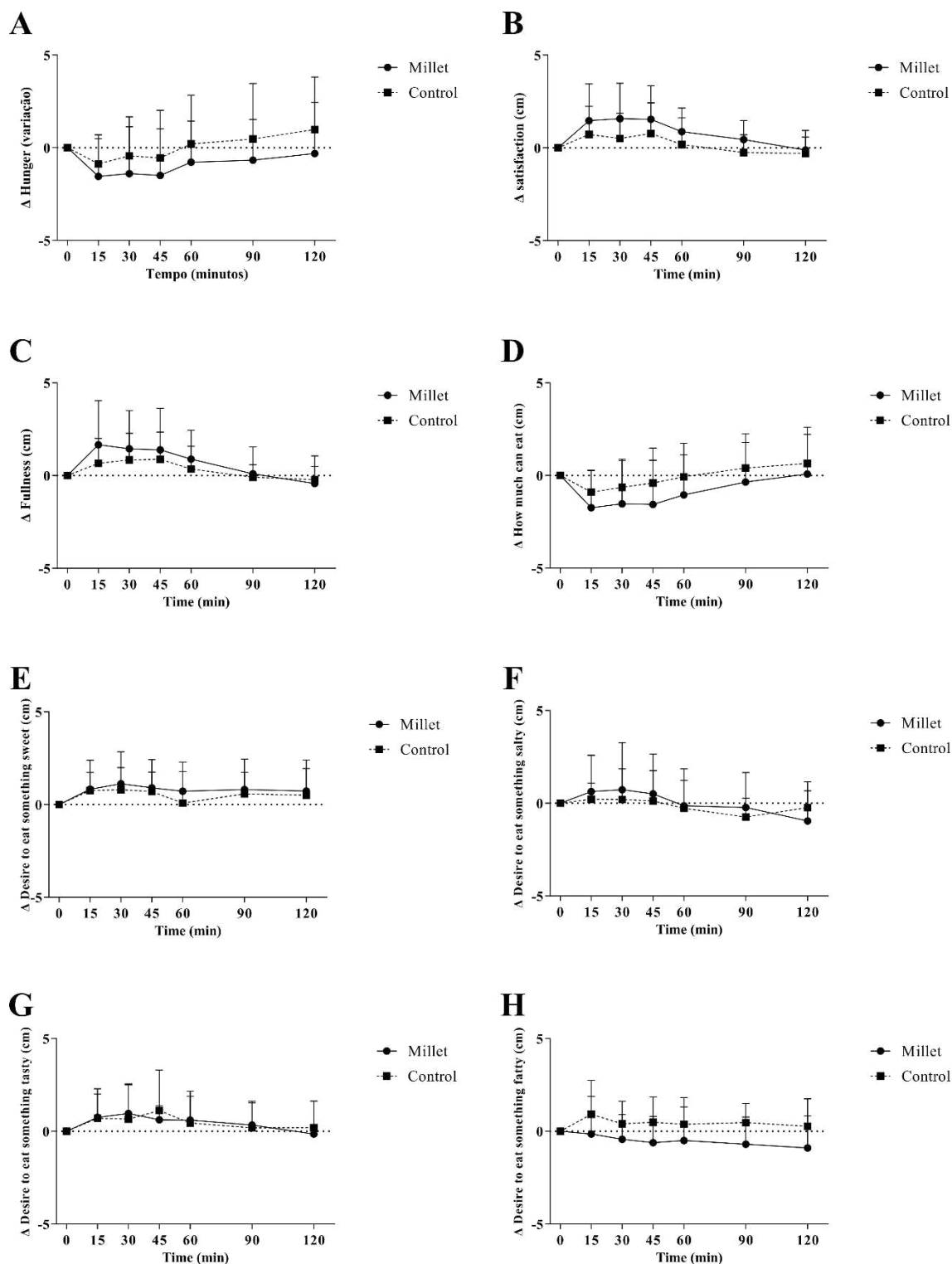


Figure 5. Subjective sensations of appetite and desire to eat specific types of food after an overnight fast and following the intake of the beverages ($n = 14$). (A) Δ hunger; (B) Δ satisfaction; (C) Δ fullness; (D) Δ how much can eat; (E) Δ desire to eat something sweet; (F) Δ desire to eat something salty; (G) Δ desire to eat something tasty; (H) Δ desire to eat something fatty. Means and standard deviations followed by an asterisk differ by two-way repeated measures ANOVA ($p < 0.05$).

During the same period, the variation in the CSS index was similar for both beverages (Figure 6) ($p > 0.05$). Therefore, intake of the beverage containing extruded millet flour provided a similar sensation of satiety and motivation to eat compared to the control beverage.

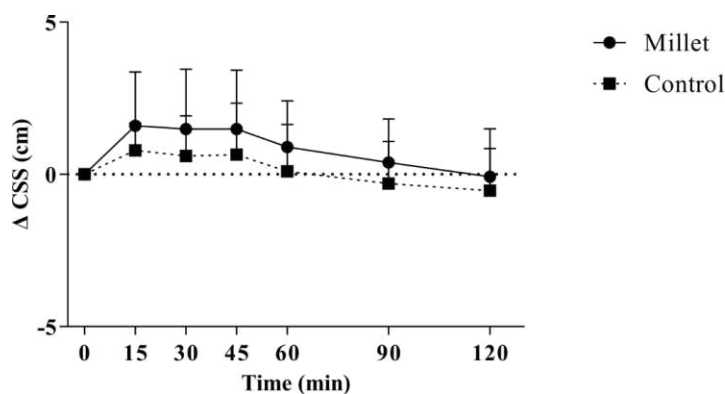


Figure 6. Graph of the composite appetite score over time for participants food after an overnight fast and following the intake of the beverages. Means and standard deviations followed by an asterisk differ by two-way repeated measures ANOVA ($p < 0.05$).

3.6 Glycemic index

The results of this study indicate that the beverage developed with extruded millet flour and the control beverage exhibit a similar glycemic profile ($p > 0.05$). The glycemic index of the beverage developed with extruded millet flour was 72.98% (Figure 7B), classifying it as “high glycemic index”. The control beverage had a glycemic index of 99.58% (Figure 7C), also classifying it as “high glycemic index”.

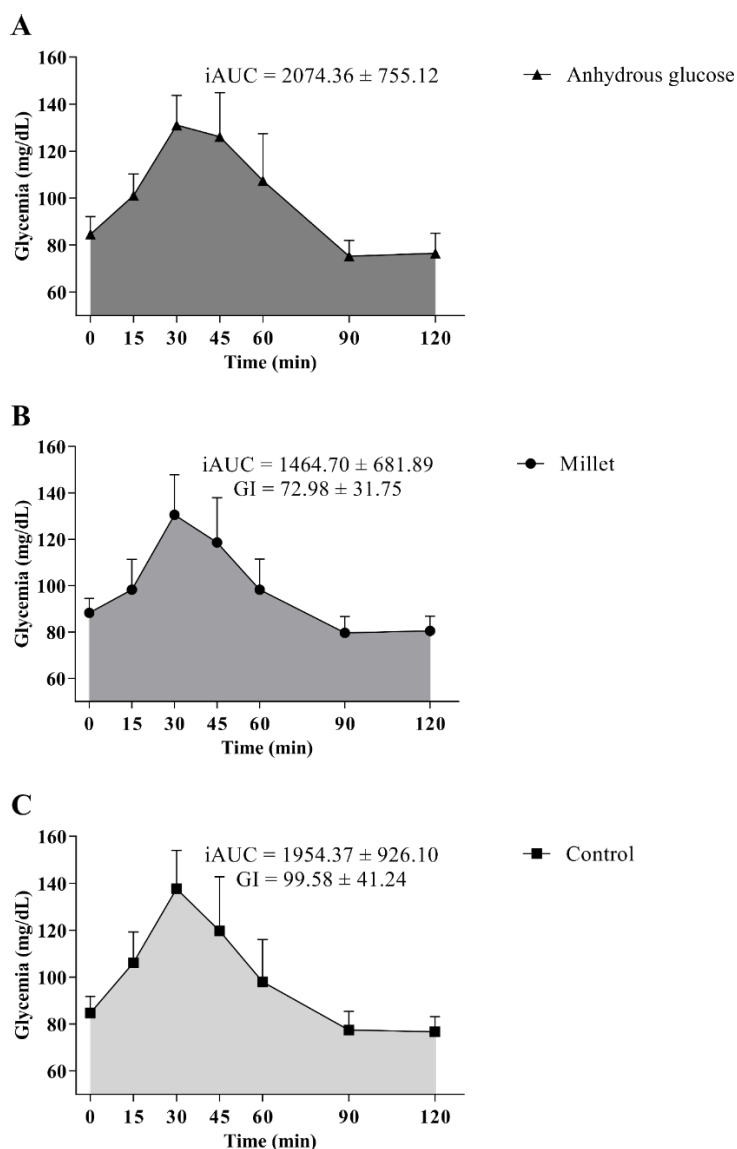


Figure 7. Glycemic Index (GI) of different beverages. (A) anhydrous glucose; (B) Millet; (C) Control. Values are presented as means \pm standard deviations.

4 DISCUSSION

In the current trial, the strawberry-flavored whole grain extruded millet beverage presented highest sensory acceptance relative to other flavors, which was chosen to acute clinical trial. The consumption of the beverage containing 30 g of extruded pearl millet flour maintained glycemic and insulinemic responses, as well as appetite control and food intake of the subjects, when compared to consumption of the control maltodextrin beverage. Millet was chosen in this study as an intervention because of the potential health benefits that were identified in our previous research (Magalhães et al., 2023). To the best of our knowledge, this

study represents the first acute clinical evidence that the consuming of beverage made with extruded pearl millet flour by euglycemic and eutrophic adult subjects did not change metabolic responses of glucose and insulin, and appetite feeling and food intake. These findings provide relevant guidance on how the beverage developed was able to maintain the variables evaluated, considering issues related to the chemical and physical modifications inherent in the extruded and liquid formulation itself.

In the present study, extruded millet beverage presented a glycemic index of 72.98% and maltodextrin control beverage of 99.58%. However, this difference was not enough to change the GI classification, since both beverages were considered high glycemic index (≥ 70) (Chiavaroli et al., 2021). Similarly, in the study conducted by Shobana et al. (2022), different millet-based preparations, without going through the extrusion process, also presented high glycemic index. The finger millet stiff porridge presented glycemic index of 98.2% and the pearl millet *roti* presented 70.1%. In contrast, the study conducted by Shukla and Srivastava (2014) found a glycemic index of 45.13% in a noodle formulated with an extruded blend of 30% millet (*Eleusine coracana*) and refined wheat flour. In addition, the extrusion of the rice starch following enzymatic hydrolysis with β -amylase, an exo-hydrolase enzyme responsible for hydrolyzing α -1,4 glycosidic bonds, reduced the crystalline regions starch, increasing resistant starch content, which decrease slows down starch digestion (Ye et al., 2018). Thus, different processing methods may have influenced the different glycemic indices, which can change the digestion, increasing or decreasing carbohydrates absorption (Zhang et al., 2021), which can explain our results.

As for the variation in iAUC values for blood glucose and insulin, the extruded millet beverage showed a Δ iAUC of 1464.70 ± 681.89 for glycemia and 1572.09 ± 705.68 for insulin, while maltodextrin control beverage showed Δ iAUC of 1954.37 ± 926.10 for glycemia and 1412.77 ± 602.01 for insulin. In percentage, it represents improvement of extruded millet beverage in 25% in glycemia and 11.3% in insulin, although no statistical difference was observed. However, in contrast to other acute studies conducted with beverages prepared with extruded sorghum (Anunciação et al., 2018) and extruded oat (Liu et al., 2021), which demonstrated a lower postprandial glycemic response in eutrophic and normoglycemic adults. These differences may be associated with low concentration of resistant starch in the extruded millet beverage (0.1 g/beverage) compared to sorghum and oat beverages, 0.68 and 2.85 g/beverage, respectively. In addition, the high amylose content in the starch can decrease glucose uptake as observed in sorghum and oat beverages (3.45 and 11.85 g/beverage,

respectively), due to starch-protein/amylose-lipid complex formation, as well as interference with dietary fiber, which limited the leaching of amylose during the extrusion process (Anunciação et al., 2018; Liu et al., 2021). Thus, it is possible that the extrusion process in millet grain in our study promoted an increase of amylose hydrolysis, which can be related with the temperature, pression, humidity and time applied in the extrusion (Zhang et al., 2021).

To prepare extruded millet beverage, we used 30 g portion of extruded millet flour, which provided 0.10 g of resistant starch, 2.36 mg GAE/g of total phenolics, 0.34 g soluble fiber and 2.05 g insoluble fiber. These amounts offered in the beverage did not enough to change glycemic index and iAUC glucose and insulin variation. However, other studies (Alyami et al., 2019b; Shobana et al., 2022) with different preparations made from non-extruded pearl millet grains have shown positive responses in relation to serum glycemia, such as the study by Hayes et al. (2021), that observed reduction in the glycemic response, in eutrophic adults and with normal glycemia consuming 124 g of cooked millet (*P. glaucum*) used to prepare couscous and porridge. This amount probably offered high amount of phenolics, soluble and insoluble dietary fiber. Therefore, it is recommended that future studies be conducted using high amount of extruded millet in others formulation to evaluate its effects.

Importantly, food processing plays a crucial role in modifying carbohydrate characteristics. Extrusion, for example, is a thermomechanical process that can alter grain structure by increasing starch breakdown (Zhang et al., 2021) and reducing resistant starch content (Albarracín et al., 2019). Although this technique is advantageous for the production of ready-to-eat foods, as in the case of the whole grain extruded millet beverage developed in this study, it can also facilitate the release of glucose into the blood (Zhang et al., 2021). In addition, milling process applied to the extruded millet to produce flour can change the food matrix, reducing particle size and fiber integrity grain (Philippou, 2016), increasing surface area. This, in turn, can increase the rapidly digestible starch, favoring the action of enzymes, such as alpha-amylase (Al-Rabadi et al., 2009), which could explain the high glycemic index without change the glycemic response observed in our study. Furthermore, liquid foods tend to be distributed throughout the stomach, which leads to a faster rate of gastric emptying compared to, for example, solid foods (Camilleri, 2019). Therefore, although some components can beneficially modulate the glycemic and insulinemic response, such as the presence of dietary fiber (soluble and insoluble), resistant starch, phenolics, lipids, and proteins (Camilleri, 2019; Hayes et al., 2021; Kunyaneer and Luangsakul, 2022), in the extruded millet beverage the milling process and the liquid nature seem to have exerted a higher effect on these responses. These factors may

have accelerated the digestion process extruded millet beverage, resulting in a rapid and efficient conversion of starch to glucose, which did not change the glycemic and insulinemic response intensity, since the released glucose is readily absorbed by the body (Camilleri, 2019; Philippou, 2016; Shobana et al., 2022). Therefore, understanding the effects of the different processing is critical for the development of pearl millet foods and beverages with appropriate glycemic profiles, which may be relevant for individuals who need to control their blood glucose levels.

The mechanisms by which the intensity and duration of the post-meal satiety sensation can be regulated involve neural and hormonal signaling throughout the gastrointestinal tract (Camilleri, 2019), but also the caloric content of the food eaten, processing that the food undergoes (Alyami et al., 2019a; Isaksson et al., 2012), and the composition of the food. Whole grains and the dietary fiber found in them have the potential to amplify the feeling of satiety in meals (Isaksson et al., 2012). However, in our study, we observed that both beverages showed similar effects in subjective appetite responses and self-reported energy intakes. These results were corroborated by the variation in insulin levels, one of the hormones involved in a negative feedback mechanism that regulates energy homeostasis and reduces food intake (Al-Zubaidi et al., 2019). In this context, it is important to consider the possibility that a food may undergo both short- and long-term appetite modifications, as well as the self-reported baseline diet profile. Whether the initial exposure response is maintained during regular consumption becomes interesting, since short-term appetite for a particular food may change after repeated consumption due to physiological adaptation. Studies have shown that the initial effects on postprandial appetite may change after repeated exposure to a food (Bresson et al., 2008; Diepvens et al., 2007; King et al., 2005).

Also, when analyzing the baseline diet profile (Table S1; Supplementary Material) of this study, it could be observed that all individuals had a dietary fiber intake above 14 g of dietary fiber per 1,000 kcal, which is the recommendation of the American Dietetic Association (Slavin, 2008) before starting the study. This observation suggests that the volunteers were already familiar with the consumption and effects of whole foods, which may have influenced the absence of significant differences in appetite and energy intake during the study.

In our study, both positive points and limitations were identified. This is a pioneer study investigating the effects of an extruded millet beverage on glycemic control and satiety variables. The intervention was conducted in a randomized controlled manner, and participants were kept blinded to the treatment, which helped to minimize possible biases in the evaluations,

especially those related to subjectivity. This rigor in the control of procedures contributes to the reliability of the results obtained. However, we did not control the different phases of the menstrual cycle of women, which could influence the variations in blood glucose, plasma hormones, feeling of hunger and energy intake (Brennan et al., 2009). In addition, the combination of 10 hours fasting with the intake of a liquid meal may favor glucose uptake due to the rapid empty stomach. Also, the evaluation of the acute clinical trial together with glycemic index analyses require to use the same carbohydrates content in the beverages, which may result in millet and maltodextrin beverages with similar metabolic effects. Further, it is important to note that self-reported food intake may be subject to underestimation. Although we provided detailed instructions on food recording and performed a thorough analysis of the data, it is possible that underreporting may have occurred.

5 CONCLUSIONS

In summary, the strawberry flavored extruded millet beverage showed similar physiological and subjective responses related to glycemic control, insulinemia, appetite sensations, energy intake and glycemic index after being consumed by euglycemic and eutrophic individuals in the crossover study. These findings provide relevant directions about how millet processing, extrusion, and formulation to incorporate millet into a healthy diet, considering the known beneficial health effects of this cereal.

6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) [grant number: 001] and the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq, Brazil) [grant number: 001] for the support, Embrapa Food Technology, Brazil [grant number: 13.16.05.043.00.00], Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG), Foundation of Rio de Janeiro (FAPERJ/Brazil) [grant number: E-26/202.848/2017] and the Arthur Bernardes Foundation, for the Research Support provided, and the company Atto Agrícola LTDA (Atto Sementes, Randonópolis, Mato Grosso, Brazil), for technical-scientific cooperation [grant number: 034/2022].

7 SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi] (appendix H).

REFERENCES

- Ainsworth, B.E., Haskell, W.L., Whitt, M.C., Irwin, M.L., Swartz, A.M., Strath, S.J., O'Brien, W.L., Bassett, D.R., Schmitz, K.H., Emplainscourt, P. O., Jacobs, D.R., Leon, A.S., 2000. Compendium of Physical Activities: an Update of Activity Codes and MET Intensities. *Med Sci Sports Exerc.* <https://doi.org/10.1097/00005768-200009001-00009>
- Albarracín, M., Dyner, L., Giacomino, M.S., Weisstaub, A., Zuleta, A., Drago, S.R., 2019. Modification of nutritional properties of whole rice flours (*Oryza sativa* L.) by soaking, germination, and extrusion. *J Food Biochem* 43, e12854. <https://doi.org/10.1111/JFBC.12854>
- Almaski, A., Coe, S., Lightowler, H., Clegg, M.E., Thondre, P.S., 2023. Finger millet-based muffin decreases insulin response in individuals with prediabetes in a randomised controlled trial. *British Journal of Nutrition* 129, 650–659. <https://doi.org/10.1017/S0007114522001623>
- Al-Rabadi, G.J.S., Gilbert, R.G., Gidley, M.J., 2009. Effect of particle size on kinetics of starch digestion in milled barley and sorghum grains by porcine alpha-amylase. *J Cereal Sci* 50, 198–204. <https://doi.org/10.1016/J.JCS.2009.05.001>
- Alyami, J., Ladd, N., Pritchard, S.E., Hoad, C.L., Sultan, A.A., Spiller, R.C., Gowland, P.A., Macdonald, I.A., Aithal, G.P., Marciani, L., Taylor, M.A., 2019a. Glycaemic, gastrointestinal and appetite responses to breakfast porridges from ancient cereal grains: A MRI pilot study in healthy humans. *Food Research International* 118, 49–57. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2017.11.071>
- Alyami, J., Whitehouse, E., Yakubov, G.E., Pritchard, S.E., Hoad, C.L., Blackshaw, E., Heissam, K., Cordon, S.M., Bligh, H.F.J., Spiller, R.C., Macdonald, I.A., Aithal, G.P., Gowland, P.A., Taylor, M.A., Marciani, L., 2019b. Glycaemic, gastrointestinal, hormonal and appetitive responses to pearl millet or oats porridge breakfasts: a randomised, crossover trial in healthy humans. *British Journal of Nutrition* 122, 1142–1154. <https://doi.org/10.1017/S0007114519001880>
- Al-Zubaidi, A., Heldmann, M., Mertins, A., Brabant, G., Nolde, J.M., Jauch-Chara, K., Münte, T.F., 2019. Impact of hunger, satiety, and oral glucose on the association between insulin and

resting-state human brain activity. *Front Hum Neurosci* 13, 420805. <https://doi.org/10.3389/FNHUM.2019.00162/BIBTEX>

Anunciação, P.C., Cardoso, L. de M., Queiroz, V.A.V., de Menezes, C.B., de Carvalho, C.W.P., Pinheiro-Sant'Ana, H.M., Alfenas, R. de C.G., 2018. Consumption of a drink containing extruded sorghum reduces glycaemic response of the subsequent meal. *Eur J Nutr* 57, 251–257. <https://doi.org/10.1007/S00394-016-1314-X/FIGURES/3>

AOAC, 2019. Official Methods of Analysis of the AOAC International. Association of Official Analytical Chemists.

Brennan, I.M., Feltrin, K.L., Nair, N.S., Hausken, T., Little, T.J., Gentilcore, D., Wishart, J.M., Jones, K.L., Horowitz, M., Feinle-Bisset, C., 2009. Effects of the phases of the menstrual cycle on gastric emptying, glycemia, plasma GLP-1 and insulin, and energy intake in healthy lean women. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297, 602–610. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00051.2009/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH30090954600006.JPEG>

Bresson, J.-L., Flynn, A., Heinonen, M., Hulshof, K., Korhonen, H., Lagiou, P., Løvik, M., Marchelli, R., Martin, A., Moseley, B., Palou, A., Przyrembel, H., Salminen, S., Strain, S. (J. J.), Strobel, S., Tetens, I., van den Berg, H., van Loveren, H., Verhagen, H., 2008. Milk product, rich in fibre and protein, and reduction of the sense of hunger - Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. *EFSA Journal* 6. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2008.894>

Camilleri, M., 2019. Gastrointestinal Hormones and Regulation of Gastric Emptying. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 26, 3. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000448>

Chiavaroli, L., Lee, D., Ahmed, A., Cheung, A., Khan, T.A., Blanco, S., Mejia, Mirrahimi, A., Jenkins, D.J.A., Livesey, G., Wolever, T.M.S., Rahelić, D., Kahleová, H., Salas-Salvadó, J., Kendall, C.W.C., Sievenpiper, J.L., 2021. Effect of low glycaemic index or load dietary patterns on glycaemic control and cardiometabolic risk factors in diabetes: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 374, 16. <https://doi.org/10.1136/BMJ.N1651>

Diepvens, K., Soenen, S., Steijns, J., Arnold, M., Westerterp-Plantenga, M., 2007. Long-term effects of consumption of a novel fat emulsion in relation to body-weight management. *Int J Obes* 31, 942–949. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803532>

FAO, 1998. Carbohydrates in human nutrition. Food and agriculture organization of the United Nations 66, 11–14.

- Flint, A., Raben, A., Blundell, J.E., Astrup, A., 2000. Reproducibility, power and validity of visual analogue scales in assessment of appetite sensations in single test meal studies. *Int J Obes* 24, 38–48. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801083>
- Gilbert, J.A., Gasteyer, C., Raben, A., Meier, D.H., Astrup, A., Sjödin, A., 2012. The Effect of Tesofensine on Appetite Sensations. *Obesity* 20, 553–561. <https://doi.org/10.1038/OBY.2011.197>
- Hayes, A.M.R., Gozzi, F., Diatta, A., Gorissen, T., Swackhamer, C., Bellmann, S., Hamaker, B.R., 2021. Some pearl millet-based foods promote satiety or reduce glycaemic response in a crossover trial. *British Journal of Nutrition* 126, 1168–1178. <https://doi.org/10.1017/S0007114520005036>
- Hervik, A.K., Svihus, B., 2019. The role of fiber in energy balance. *J Nutr Metab* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4983657>
- Isaksson, H., Tillander, I., Andersson, R., Olsson, J., Fredriksson, H., Webb, D.L., Åman, P., 2012. Whole grain rye breakfast — Sustained satiety during three weeks of regular consumption. *Physiol Behav* 105, 877–884. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2011.10.023>
- ISO, 2010. Food products — Determination of the glycaemic index (GI) and recommendation for food classification, 1st ed, ISO 26642:2010. ISO 26642:2010.
- Kamatar, M.Y., Hiremath, M., Jali, M. V, Jali, S.M., Hiremath, M.B., Naik, R.K., 2012. Efficacy of value added foxtail millet therapeutic food in the management of diabetes and dyslipidamea in type 2 diabetic patients. *Recent Res Sci Technol* 4, 3–04.
- King, N.A., Craig, S.A.S., Pepper, T., Blundell, J.E., 2005. Evaluation of the independent and combined effects of xylitol and polydextrose consumed as a snack on hunger and energy intake over 10 d. *British Journal of Nutrition* 93, 911–915. <https://doi.org/10.1079/BJN20051431>
- Kunyanee, K., Luangsakul, N., 2022. The impact of heat moisture treatment on the physicochemical properties and in vitro glycemic index of rice flour with different amylose contents and associated effects on rice dumpling quality. *LWT* 154, 112694. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112694>
- Liu, S., Zhao, L., Zhang, J., Wang, L., Liu, H., 2021. Functional drink powders from vertical-stone-milled oat and highland barley with high dietary-fiber levels decrease the postprandial glycemic response. *J Funct Foods* 83, 104548. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2021.104548>
- Magalhães, T.L.S., Silva, B.P. da, Grancieri, M., Lúcio, H.G., Toledo, R.C.L., Barra, R.R.S., Carvalho, C.W.P. de, Martino, H.S.D., 2023. Germinated and non-germinated cooked whole millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) flours show a promising effect on protein quality,

- biochemical profile and intestinal health in vivo. *Food Funct* 14. <https://doi.org/10.1039/D2FO02915D>
- Matthews, J.N.S., Altman, D.G., Campbell, M.J., Royston, P., 1990. Analysis of serial measurements in medical research. *Br Med J* 300, 230–235. <https://doi.org/10.1136/BMJ.300.6719.230>
- Mera, R., Thompson, H., Prasad, C., PRASADc, C., 1998. How to Calculate Sample Size for an Experiment: A Case-Based Description. *Nutr Neurosci* 1, 87–91. <https://doi.org/10.1080/1028415X.1998.11747217>
- Merrill, A.L., Watt, B.K., 1955. Energy Value of Foods: Basis and Derivation.
- Morgan, L.M., Tredger, J.A., Wright, J., Marks, V., 1990. The effect of soluble- and insoluble-fibre supplementation on post-prandial glucose tolerance, insulin and gastric inhibitory polypeptide secretion in healthy subjects. *British Journal of Nutrition* 64, 103–110. <https://doi.org/10.1079/BJN19900013>
- NEPA, UNICAMP, 2011. Brazilian food composition table – BFCT. Food Studies and Research Nucleus (NEPA)/State University of Campinas (UNICAMP).
- Philippou, E., 2016. The glycemic index: Applications in practice. CRC Press.
- Ren, X., Yin, R., Hou, D., Xue, Y., Zhang, M., Diao, X., Zhang, Y., Wu, J., Hu, J., Hu, X., Shen, Q., 2018. The Glucose-Lowering Effect of Foxtail Millet in Subjects with Impaired Glucose Tolerance: A Self-Controlled Clinical Trial. *Nutrients* 10, 1509. <https://doi.org/10.3390/NU10101509>
- Rubio Herrera, M.A., Salas-Salvadó, J., Barbany, M., Moreno, B., Aranceta, J., Bellido, D., Blay, V., Carraro, R., Formiguera, X., Foz, M., De Pablos, P.L., García-Luna, P.P., Griera, J.L., De La Torre, M.L., Martínez, J.A., Remesar, X., Tebar, J., Vidal, J., 2007. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med Clin (Barc)* 128, 184–196. [https://doi.org/10.1016/S0025-7753\(07\)72531-9](https://doi.org/10.1016/S0025-7753(07)72531-9)
- Shobana, S., Geetha, G., Bai, M., Vijayalakshmi, P., Gayathri, R., Lakshmi Priya, N., Unnikrishnan, R., Anjana, R., Malleshi, N., Krishnaswamy, K., Henry, C.J.K., Mohan, V., Sudha, V., 2022. Carbohydrate profiling & glycaemic indices of selected traditional Indian foods. *Indian Journal of Medical Research* 155, 56–65. https://doi.org/10.4103/IJMR.IJMR_1935_19

- Shukla, K., Srivastava, S., 2014. Evaluation of finger millet incorporated noodles for nutritive value and glycemic index. *J Food Sci Technol* 51, 527–534. <https://doi.org/10.1007/S13197-011-0530-X/FIGURES/1>
- Singh, R.M., Fedacko, J., Mojto, V., Isaza, A., Dewim, M., Watanabe, S., 2020. Effects of millet based functional foods rich diet on coronary risk factors among subjects with diabetes mellitus: a single arm real world observation from hospital registry. *MOJ Public Health* 9, 18–25. <https://doi.org/10.15406/mojph.2020.09.00318>
- Slavin, J.L., 2008. Position of the American Dietetic Association: Health Implications of Dietary Fiber. *J Am Diet Assoc* 108, 1716–1731. <https://doi.org/10.1016/J.JADA.2008.08.007>
- Theodoro, J.M.V., Martinez, O.D.M., Grancieri, M., Toledo, R.C.L., Binoti, M.L., Martins, A.M.D., Carvalho, C.W.P., Lisboa, P.C., Martino, H.S.D., 2021. Germinated millet flour (*Pennisetum glaucum* (L.) R. BR.) improves adipogenesis and glucose metabolism and maintains thyroid function in vivo. *Food Funct* 12, 6083–6090. <https://doi.org/10.1039/D0FO03388J>
- Vargas-Solórzano, J.W., Carvalho, C.W.P., Takeiti, C.Y., Ascheri, J.L.R., Queiroz, V.A.V., 2014. Physicochemical properties of expanded extrudates from colored sorghum genotypes. *Food Research International* 55, 37–44. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2013.10.023>
- WHO, 2000. Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO consultation [WWW Document]. World Health Organization.
- Ye, J., Liu, C., Luo, S., Hu, X., McClements, D.J., 2018. Modification of the digestibility of extruded rice starch by enzyme treatment (β -amylolysis): An in vitro study. *Food Research International* 111, 590–596. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.06.002>
- Yuen, M.S., Lui, D.T., Kaplan, L.M., 2016. A systematic review and evaluation of current evidence reveals 195 obesity-associated disorders (OBAD). *Obesity Week*.
- Zhang, K., Dong, R., Hu, X., Ren, C., Li, Y., 2021. Oat-Based Foods: Chemical Constituents, Glycemic Index, and the Effect of Processing. *Foods* 10, 1304. <https://doi.org/10.3390/FOODS10061304>
- Zhang, Y., Giovannucci, E.L., 2022. Ultra-processed foods and health: a comprehensive review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1–13. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2084359>

6 CONCLUSÃO GERAL

O foco deste estudo foi avaliar o efeito do milheto pérola submetido à germinação e cocção úmida, ou apenas cocção úmida em variáveis relacionadas à qualidade proteica, perfil bioquímico e saúde intestinal, em ratos *Wistar*. Além disso, foi investigado o efeito de uma bebida de milheto utilizando uma farinha de grão inteiro extrudado, no metabolismo de glicose e insulina, saciedade e consumo alimentar em indivíduos adultos euglicêmicos e eutróficos, além de avaliar o índice glicêmico da bebida.

As farinhas de milheto pérola são fontes principalmente de carboidrato, proteínas, fibra alimentar e lipídios. No estudo com animais experimentais, percebeu-se que a farinha de milheto submetida ou não ao processo de germinação, quando comparado a caseína, apresentaram um perfil adequado de aminoácidos essenciais, com exceção da lisina. Além disso, foram capazes de reduzir o ganho de peso, o índice de Lee e o pH das fezes, bem como melhorar as razões proteica líquida e de eficiência proteica, os níveis de glicose plasmática, ácido úrico, colesterol e triglicerídeos, aumentar a espessura e profundidade das criptas, a expressão do gene *PepT1* e a produção de ácidos acético e propiônico.

Por outro lado, a extrusão favoreceu as propriedades tecnológicas que permitiram o desenvolvimento da bebida de cereal. A bebida sabor morango contendo 30 g de farinha de milheto extrudado apresentou melhor aceitação sensorial e se manteve na faixa de alto índice glicêmico. Além disso, manteve as respostas glicêmicas e insulinêmicas, bem como o controle do apetite, a ingestão energética de adultos euglicêmicos e eutróficos e, o índice glicêmico da bebida, quando comparado com o consumo da bebida controle contendo maltodextrina. Assim, a bebida pode ser incorporada em uma dieta saudável, considerando os efeitos benéficos à saúde desse cereal. No entanto, são necessárias investigações adicionais para otimizar as variáveis de calor, cisalhamento e pressão durante o processo de extrusão, visando aumentar a proporção de amilose no grão e a formação de amido resistente, que poderão melhorar a qualidade nutricional do milheto extrudado, favorecendo o controle metabólico da glicemia e da saciedade.

Este estudo possibilitou um maior conhecimento sobre uma opção alimentar inovadora, explorando a viabilidade industrial da germinação e extrusão, técnicas que possuem o potencial de modificar as propriedades tecnológicas e nutricionais dos alimentos e ampliar sua versatilidade.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sugere-se a realização de estudos futuros de curto e longo prazo em seres humanos, que avaliem de forma conjunta os efeitos dos diferentes processamentos do milho pérola e uma maior proporção do cereal na formulação alimentícia, sobre o microbioma e outras variáveis relacionadas à saúde intestinal, bem como sobre a regulação da glicemia e saciedade. Esses estudos seriam especialmente relevantes considerando a estreita relação existente entre o eixo cérebro-intestino-microbiota, que desempenha um papel fundamental no controle de distúrbios metabólicos.

Além disso, é recomendável conduzir experimentos separados para avaliar o índice glicêmico e realizar o estudo clínico, pois os critérios preconizados para determinação do índice glicêmico, como a exigência de 25 g de carboidratos disponíveis nos alimentos testados, podem ter resultado em bebidas de milho e maltodextrina com efeitos metabólicos semelhantes.

Neste estudo ficou demonstrado que os efeitos do consumo da farinha de milho pérola sobre o controle glicêmico apresentaram variações em cada experimento, o que reforça que a modificação da matriz alimentar, como o processamento aplicado e o tempo de estudo podem afetar o metabolismo de glicose e insulina. Por isso, pesquisas futuras podem incluir a investigação de novos produtos alimentícios contendo milho pérola, que sejam submetidos a germinação e a extrusão em seres humanos, sem a necessidade de um longo período de jejum para evitar interferências no esvaziamento gástrico e adotando um período de *run-in* de 2 semanas, para o controle do consumo de fibra alimentar e exclusão de cereais integrais na dieta. Além disso, é importante explorar diferentes combinações de temperatura, pressão, umidade e tempo durante o processo de extrusão, a fim de aprimorar o perfil tecnológico e nutricional do grão.

Logo, essas observações destacam a complexidade dos fatores envolvidos e a necessidade de investigações mais aprofundadas para compreender completamente o impacto do consumo de milho na regulação de fatores relacionados à saúde, a fim de fornecer evidências sólidas e embasadas para orientar a maior inserção deste cereal na alimentação humana e promover um estilo de vida saudável.

ANEXOS

ANEXO A – Comprovante de aprovação da comissão de ética no uso de animais (CEUA/UFV)

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 49/2021, intitulado “**Efeito da farinha de milho germinado (*Pennisetum glaucum* (L) R. Br.) na qualidade proteica e saúde intestinal de ratos wistar**”, coordenado pela professora Hércia Stampini Duarte Martino do Departamento de Nutrição e Saúde, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTIC, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 23/07/2021, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 49/2021, named “**Effect of germinated pearl millet flour (*Pennisetum glaucum* (L) R. Br.) on protein quality and intestinal health of wistar rats**”, is in agreement with the a actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008, Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTIC, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTIC therefore being approved by the Committee on July 23, 2021 valid for 12months.



Prof. Mariella Bontempo Duca de Freitas
Coordenadora
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

ANEXO B – Questionário internacional de atividade física (IPAQ)

(Forma curta)

Nome: _____

Data: ____/____/____ Idade: _____ Sexo: () F () M

Você trabalha de forma remunerada? () Sim () Não

Quantas horas você trabalha por dia? _____

Quantos anos completos você estudou? _____

De forma geral, sua saúde está:

() Excelente () Muito boa () Boa () Regular () Ruim

Nós estamos interessados em saber que tipos de atividade física as pessoas fazem como parte do seu dia a dia. As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física em uma semana **NORMAL**, **USUAL** ou **HABITUAL**. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Suas respostas são **MUITO** importantes. Por favor, responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo.

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza **por pelo menos 10 minutos** contínuos de cada vez:

1a. Em quantos dias de uma semana normal, você realiza atividades **VIGOROSAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que faça você suar **BASTANTE** ou aumentem **MUITO** sua respiração ou batimentos cardíacos?

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum

1b. Nos dias em que você faz essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gasta fazendo essas atividades **por dia**?

Horas: _____ Minutos: _____

2a. Em quantos dias de uma semana normal, você realiza atividades **MODERADAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços doméstico na casa, no quintal ou jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que faça você suar leve ou aumentam **MODERADAMENTE** sua respiração ou batimentos cardíacos? (POR FAVOR, NÃO INCLUA CAMINHADA)

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum

2b. Nos dias em que você faz essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gasta fazendo essas atividades **por dia**?

Horas: _____ Minutos: _____

3a. Em quantos dias de uma semana normal você caminha por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por prazer ou como forma de exercício?

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum

3b. Nos dias em que você caminha por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gasta caminhando **por dia**?

Horas: _____ Minutos: _____

4a. Estas duas últimas perguntas são em relação ao tempo que você gasta sentado ao todo no trabalho, em casa, na escola ou faculdade e durante o tempo livre. Isso inclui o tempo que você gasta sentado no escritório ou estudando, fazendo lição de casa, visitando amigos, lendo e sentado ou deitado assistindo televisão.

Quanto tempo **por dia** você fica sentado em um dia da semana?

Horas: _____ Minutos: _____

4b. Quanto tempo **por dia** você fica sentado no final de semana?

Horas: _____ Minutos: _____

ANEXO C – Escala visual analógica para saciedade

TEMPO: _____ Eu não estou com fome alguma	Quanta fome você sente?	Eu nunca estive com tanta fome
TEMPO: _____ Eu estou completamente vazio	Quão satisfeito você sente?	Eu não aguento comer mais nada
TEMPO: _____ Nem um pouco cheio	Quão cheio você sente?	Totalmente cheio
TEMPO: _____ Nada	Quanto você acha que pode comer?	Muito
TEMPO: _____ Sim, gostaria muito	Você gostaria de comer algo doce?	Não, de modo nenhum
TEMPO: _____ Sim, gostaria muito	Você gostaria de comer algo salgado?	Não, de modo nenhum
TEMPO: _____ Sim, gostaria muito	Você gostaria de comer algo saboroso?	Não, de modo nenhum
TEMPO: _____ Sim, gostaria muito	Você gostaria de comer algo gorduroso?	Não, de modo nenhum



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
VIÇOSA - UFV



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
VIÇOSA - UFV



Continuação do Parecer: 5.574.130

Continuação do Parecer: 5.574.130

Não

VICOSA, 10 de Agosto de 2022

Assinado por:
Érica nascif Rufino Vieira
(Coordenador(a))

Outros	docx	10:38:26	Duarte Martino	Aceito
Outros	ANEXO_2_QUESTIONARIO_INTERNA CIONAL_ATIVIDADE_FISICA.docx	26/11/2021 10:37:54	Hercia Stampini Duarte Martino	Aceito
Outros	ANEXO_1_ESCALA_HEDONICA_9_PO NTOS_TESTE_ACEITACAO_SENSORI AL.docx	26/11/2021 10:37:35	Hercia Stampini Duarte Martino	Aceito
Outros	APENDICE_7_FICHAS_INDIVIDUAIS MONITORAMENTO_GLICEMIA_CAPIL AR.docx	26/11/2021 10:37:07	Hercia Stampini Duarte Martino	Aceito
Outros	APENDICE_6_REGISTRO_ALIMENTA R_24HORAS.docx	26/11/2021 10:36:47	Hercia Stampini Duarte Martino	Aceito
Outros	APENDICE_5_QUESTIONARIO_DE_S ELECAO_DE_VOLUNTARIOS.docx	26/11/2021 10:36:24	Hercia Stampini Duarte Martino	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	26/11/2021 10:36:03	Hercia Stampini Duarte Martino	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.docx	23/11/2021 22:15:07	Hercia Stampini Duarte Martino	Aceito
Outros	APENDICE_1_Calculo_amostrai.docx	23/11/2021 22:05:18	Hercia Stampini Duarte Martino	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_para_uso_laboratorio_4.pdf	23/11/2021 22:04:45	Hercia Stampini Duarte Martino	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_para_uso_laboratorio_3.pdf	23/11/2021 22:04:34	Hercia Stampini Duarte Martino	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_para_uso_laboratorio_2.pdf	23/11/2021 22:04:22	Hercia Stampini Duarte Martino	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_para_uso_laboratorio_1.pdf	23/11/2021 22:04:11	Hercia Stampini Duarte Martino	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	APENDICE_4_TCLE_estudo_excesso peso.docx	23/11/2021 22:03:23	Hercia Stampini Duarte Martino	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	APENDICE_2_TCLE_analise_sensorial. docx	23/11/2021 22:03:01	Hercia Stampini Duarte Martino	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada.pdf	23/11/2021 22:00:42	Hercia Stampini Duarte Martino	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes
Bairro: Campus Universitário CEP: 36.570-977
UF: MG Município: VICOSA
Telefone: (31)3612-2316 E-mail: cep@ufv.br

Endereço: Universidade Federal de Viçosa, Avenida PH Rolfs s/n, Edifício Arthur Bernardes
Bairro: Campus Universitário CEP: 36.570-977
UF: MG Município: VICOSA
Telefone: (31)3612-2316 E-mail: cep@ufv.br

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido para a análise sensorial



Universidade Federal de Viçosa
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós Graduação em Ciência da Nutrição

Av. P.H. Rolfs S/N - Campus Universitário. Viçosa, MG. – CEP.: 36570.000 Tel.: 031 3612-5186 Fax: 031 3612-5187

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr.(a) está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar de uma pesquisa que tem como objetivo desenvolver bebidas (contendo milheto, híbrido ADRg 9070) com 4 diferentes sabores e avaliar a aceitação sensorial dessas bebidas. Esta pesquisa faz parte de um estudo maior intitulado “Efeito do consumo de milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. BR.) nas respostas metabólicas em indivíduos adultos”.

O Sr. (a) irá comparecer uma única vez ao Laboratório de Análise Sensorial e Processamento de Novos Produtos do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde fará a ingestão das bebidas a serem testadas. Será realizada a análise sensorial do sabor, cor, aroma, textura e impressão global para cada formulação. Água mineral será fornecida para a limpeza do orifício bucal entre as análises de cada formulação de produto. Juntamente com as amostras, o Sr.(a) receberá uma ficha de avaliação na qual deverá realizar o seu julgamento em relação aos parâmetros sabor, textura, aparência e impressão global. Será utilizada uma escala hedônica de 9 pontos, sendo atribuído escore 9 para o termo “gostei extremamente” e o escore 1 para “desgostei extremamente”. Além disso, também será avaliada a intenção de compra, através de uma escala hedônica de 5 pontos, sendo atribuído escore 1 para "Certamente compraria” e o escore 5 para "Certamente não compraria”.

Os dados coletados serão arquivados assegurando a privacidade dos participantes e ficarão à disposição da equipe envolvida no projeto. Estes dados poderão ser utilizados para a publicação de trabalhos científicos e outros materiais, sendo assegurado o sigilo dos voluntários.

Alérgicos: As bebidas testes contêm derivados de milho e corante alimentício. O Sr.(a) se declara ciente do devido fato, no entanto, caso ocorra algum desconforto a equipe de pesquisa se responsabilizará pelos cuidados com os voluntários.

Para participar deste estudo o Sr.(a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr.(a) tem assegurado o direito à indenização. O Sr.(a) receberá assistência integral e imediata pelo tempo necessário, cujos custos serão de inteira responsabilidade dos pesquisadores. A equipe de trabalho não se responsabiliza por informações não prestadas a você, que possam interferir no seu estado de saúde.

Este estudo não trará prejuízos financeiros e todo o material necessário será fornecido pela equipe de pesquisa. Não haverá nenhuma forma de contrato de trabalho ou remuneração para com o voluntário.

O Sr.(a) tem garantida plena liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem necessidade de comunicado prévio. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr.(a) é atendido(a) pelo pesquisador. O Sr.(a) não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa se resultar. Seu nome ou o material que indique sua participação não serão liberados sem a sua permissão.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida ao Sr.(a). Todas as páginas deverão ser rubricadas por você e pelo pesquisador responsável ou pelas pós graduandas da pesquisa. Os questionários coletados no presente estudo serão armazenados para análises relativas a este projeto e ainda, poderão ser utilizados em outras pesquisas da mesma área de estudo. Os resultados desse projeto e de outros futuros serão apresentados, comunicados e/ou publicados no meio científico, mas sempre preservando sua confidencialidade e privacidade. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa, e depois desse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e confidencialidade, atendendo à legislação brasileira, em especial, à Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, e utilizarão as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____
 _____, documento _____, contato
 _____, fui informado(a) dos objetivos da pesquisa de maneira clara e detalhada, e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer minhas dúvidas.

Viçosa, _____ de _____ de 202__.

Assinatura do voluntário

Prof Hércia Stampini Duarte Martino
 Líder do Projeto de Pesquisa (DNS/UFV)

Thauana Lorena Silva Magalhães
 Mestranda (DNS/UFV)

Nomes e números dos telefones dos investigadores:

Pesquisadora responsável: Profª Hércia Stampini Duarte Martino

Endereço: Universidade Federal de Viçosa - Departamento de Tecnologia de Alimentos

Campus Universitário – CEP: 36571-000, Viçosa, MG.

Telefone: 31-3612-5207 e-mail: hercia@ufv.br

Em caso de discordância ou irregularidades sob o aspecto ético desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP/UFV – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

Universidade Federal de Viçosa - Edifício Arthur Bernardes, piso inferior

Av. PH Rolfs, s/n – Campus Universitário - Cep: 36570-900 Viçosa/MG

Telefone: (31) 3612-2316 - Email: cep@ufv.br - www.cep.ufv.br Atendimento de segunda a sexta-feira das 8:00 às 12:00.

APÊNDICE B – Escala hedônica de 9 pontos para a análise sensorial

Nome _____ Sexo _____

Faixa etária: () 15 a 20 () 20 a 30 () 30 a 40 () Acima 40

Por favor, avalie a amostra utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou do produto. Marque a posição da escala que melhor reflita o seu julgamento.

AMOSTRA: _____

- (9) Gostei extremamente**
- (8) Gostei muito**
- (7) Gostei moderadamente**
- (6) Gostei ligeiramente**
- (5) Indiferente**
- (4) Desgostei ligeiramente**
- (3) Desgostei moderadamente**
- (2) Desgostei muito**
- (1) Desgostei extremamente**

Cor: _____

Textura: _____

Sabor: _____

Impressão Global: _____

Indique a sua intenção de compra em relação a amostra provada seguindo a escala abaixo:

- (1) Certamente compraria**
- (2) Provavelmente compraria**
- (3) Talvez compraria**
- (4) Provavelmente não compraria**
- (5) Certamente não compraria**

Intenção de compra: _____

APÊNDICE C – Questionário de seleção de voluntários



Universidade Federal de Viçosa
 Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
 Programa de Pós Graduação em Ciência da Nutrição

Av. P.H. Rolfs S/N - Campus Universitário. Viçosa, MG. – CEP.: 36570.000 Tel.: 031 3612-5186 Fax: 031 3612-5187

I – DADOS PESSOAIS

Data: ___/___/___

1. Nome:

2. Data de nascimento: ___/___/___

Idade: _____

3. Endereço: _____

4. Telefone Casa: _____ Trabalho: _____ Cel: _____

5. E-mail: _____

6. Escolaridade:

7. Ocupação:

8. Altura: _____ Peso: _____ Perímetro da cintura: _____

II - HISTÓRIA MÉDICA

9. Você ou seus familiares já apresentaram ou apresentam algumas destas doenças:

Estado Atual					
	Nunca	Data diagnóstico	Pouco controlado	Bem controlado	Curado
Doença cardiovascular					
Diabetes					
Hipoglicemia					

Hipertensão arterial					
Câncer					
Anorexia/Bulimia					
Doenças psiquiátricas					
Anemia					
Osteoporose					
Tireoidopatias					
Doença renal					
Doença celíaca					
Doença intestinal crônica					
Outras doenças *					

*Especifique: _____

10. Você faz uso de algum medicamento? () Não () Sim

Quais: _____

11. Você tem alguma alergia a medicamentos, alimentos ou outras substâncias, ou alguém de sua família já apresentou algum tipo de alergia?

() Não () Sim

Quais: _____

Sintomas: _____

12. Você tem alguma aversão alimentar? (alimentos que você acredita que fazem mal a sua saúde, devido a alguma experiência passada, em que, após a ingestão, você apresentou alguma reação desagradável ou doença). Favor excluir da resposta as possíveis intolerâncias ou alimentos que você apenas não gosta.

() Não () Sim

Quais: _____

13. Você tem alguma intolerância alimentar? (intolerância à lactose ou glúten) () Não () Sim
Quais: _____

Sintomas: _____

14. Você fuma ou usa outro tipo de fumo, se sim qual frequência? () Não () Sim

Quais: _____

15. Você consome bebida alcoólica? Se sim, qual tipo e com que frequência? () Não
() Sim

Especifique: _____

16. Você pratica atividades físicas regulares? () Não () Sim

Quais: _____

III - INFORMAÇÕES DIETÉTICAS

17. Indique as horas do dia em que você consome refeições e lanches. Coloque a letra R para refeições e L para lanches sob cada hora do dia.

manhã e início da tarde

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

— — — — — — — — — — —

tarde e noite

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

— — — — — — — — — — —

18. Após os 18 anos de idade:

Qual o maior peso que você já teve e com que idade? Peso: _____ Idade: _____

Qual o menor peso que você já teve e com que idade? Peso: _____ Idade: _____

19. Você perdeu ou ganhou mais do que 5Kg nos últimos 3 meses?

() Não () Sim () Perdeu ____Kg () Ganhou ____Kg

20. Existe algum alimento que você não ingere (por motivos religiosos ou por que não gosta)? _____

21. Você utiliza alguma forma de suplemento alimentar? (ex: vitaminas, minerais, proteínas etc.)

Não Sim. Se sim, liste abaixo:

Marca do produto	Tipo de suplemento	Dosagem	Frequência de uso
------------------	--------------------	---------	-------------------

22. Uma variação de 3 kg afetaria o modo como você vive hoje?

Nada Um pouco Moderadamente Muito

APÊNDICE D – Questionário de frequência de consumo alimentar



Universidade Federal de Viçosa
 Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
 Programa de Pós Graduação em Ciência da Nutrição

Av. P.H. Rolfs S/N - Campus Universitário. Viçosa, MG. – CEP.: 36570.000 Tel.: 031 3612-5186 Fax: 031 3612-5187

Nome: _____ Data: ____/____/____

Leite e derivados	Quantas vezes você come	Unidade	Pequena	Média	Grande
Leite integral	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Leite desnatado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Iogurte convencional	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Iogurte light	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Queijo branco	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Queijo amarelo	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Requeijão convencional	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Requeijão light	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Pães e substitutos					
Pão francês	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Pão de forma convencional	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Pão de forma Light	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Pão integral	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Pão de queijo	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Biscoito salgado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Biscoito polvilho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Biscoito de maisena	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Biscoito recheado diet	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Biscoito recheado convencional	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Biscoito Waffer diet	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Biscoito Waffer convencional	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Bolo diet	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Bolo convencional	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Gorduras					
Margarina convencional	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Margarina Light	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Manteiga	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Maionese convencional	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Maionese light	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Azeite	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Cereais					
Arroz	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Arroz integral	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Arroz temperado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Batata Frita	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Mandioca Frita	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Batata cozida	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Mandioca cozida	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Angu	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			

Milho Verde	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Macarrão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Lasanha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Macarrão instantâneo	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Coxinha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Quibe	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Esfiha/ enroladinho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Empada	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Pastel	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Pizza	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Farinha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Farofa	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Frutas					
Laranja	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Banana	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Maçã	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Pêra	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Mamão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Melancia/ melão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Abacaxi	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Uva	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Outras frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Suco de laranja natural	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Suco de outras frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Leguminosas					
Feijão	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Feijão tropeiro	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Soja	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Verduras/ legumes					
Alface	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Agrião	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Repolho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Espinafre	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Couve	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Couve-flor, brócolis	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Cenoura crua	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Cenoura cozida	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Abóbora cozida	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Tomate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Beterraba	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Chuchu	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Abobrinha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Quiabo	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Pepino	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Sopas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Carnes					
Carne suína magra	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Carne suína gorda	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Bacon, torresmo	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Frango sem pele	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Frango com pele	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Peixes	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			

Linguiça	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Salsicha	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Ovo cozido	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Ovo frito/ omelete	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Presunto, mortadela	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Hambúrguer	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Carne bovina magra	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Carne bovina gorda	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Carne Moída	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Carne suína magra	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Bebidas					
Refrigerante diet	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Suco artificial diet	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Refrigerante convencional	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Suco artificial convencional	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Suco de fruta com açúcar	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Suco de fruta sem açúcar	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Doces e miscelâneas					
Chocolates	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Arroz doce	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Doce de leite	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Doces de fruta	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Sorvete	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Pipoca	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Achocolatado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Chips®	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			
Outros Alimentos	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	D S M			

D (diária), S (semanal), M (mensal), N (nunca).

APÊNDICE F – Termo de consentimento livre e esclarecido para o ensaio clínico agudo

Universidade Federal de Viçosa

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós Graduação em Ciência da Nutrição

Av. P.H. Rolfs S/N - Campus Universitário. Viçosa, MG. – CEP.: 36570.000 Tel.: 031 3612-5186 Fax: 031 3612-5187

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr.(a) está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar de uma pesquisa que irá avaliar o efeito de uma intervenção alimentar sobre a resposta glicêmica, nas sensações subjetivas de apetite e ingestão alimentar de indivíduos eutróficos. Esta pesquisa faz parte de um estudo maior intitulado “Efeito do consumo de milho (*Pennisetum glaucum* (L.) R. BR.) nas respostas metabólicas em indivíduos adultos” e terá como objetivo desenvolver uma bebida (contendo milho, híbrido ADRg 9070) e uma controle (contendo maltodextrina), e avaliar a aceitação sensorial dessas bebidas.

Em virtude da pandemia por COVID-19, faz-se necessário que sejam seguidas as medidas de segurança. Assim, durante nossos contatos devemos usar máscaras, manter distanciamento, usar álcool em todos os instrumentos e móveis todas as vezes que se fizer necessário. Ainda como forma de garantir a sua segurança, o pesquisador responsável pela entrevista apresentará o Certificado Nacional de Vacinação e usará além de máscara, a Face Shield.

Para participar do estudo, o Sr.(a) deverá comparecer ao Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, em um horário pré-definido de acordo com sua disponibilidade para realização de uma triagem. Nessa triagem, adotaremos os seguintes procedimentos: medidas de peso, altura, percentual de gordura corporal (bioimpedância elétrica) e pressão arterial; avaliação da glicemia capilar (por punção digital); aplicação de questionários de triagem contendo perguntas relativas aos dados pessoais, ao estilo de vida e ao histórico pessoal e familiar de doenças; questionário de avaliação do nível de atividade física habitual e questionário de frequência alimentar. A triagem terá duração de aproximadamente 1h30.

Após esta triagem, o Sr. (a) receberá uma refeição padronizada (lasanha e suco), os quais iremos fornecer, que deverá ser consumida na noite anterior ao consumo das bebidas a serem testadas. Ao total o Sr. (a) receberá 4 refeições padronizadas, correspondente a 4 dias de teste. Durante o estudo, será necessário comparecer ao laboratório por 4 dias não consecutivos, após jejum de

10 a 12 horas, para consumir uma das bebidas testadas ou uma solução glicosada. Em cada dia, será necessário permanecer no laboratório durante 2 horas para aferição da glicemia capilar (por punção digital) em 8 momentos diferentes, coleta de sangue em 4 momentos diferentes e responder a 7 questionários contendo 6 perguntas cada para avaliação da sensação de apetite. Após cada sessão do estudo, será necessário preencher 1 registro alimentar nas 24 horas posteriores ao consumo da bebida testada. Após o período de 2 horas em que permanecerá no laboratório, o Sr. (a) receberá uma refeição (biscoito, iogurte e café) e será liberado para exercer suas atividades normais.

Serão utilizados apenas materiais descartáveis. Os riscos envolvidos na pesquisa consistem em sentir as pontas dos dedos doloridas nos dias de realização do experimento e queda de pressão arterial, desmaios ou mal-estar devido a coleta de sangue. Para evitar este efeito, as punções serão feitas em partes menos sensíveis dos dedos por pessoas treinadas, bem como a coleta de sangue será realizada por enfermeiro contratado. Além disso, caso ocorra algum mal-estar durante a coleta de sangue a equipe o conduzirá a unidade de atendimento médico mais próxima. A aplicação dos questionários e as avaliações antropométricas e de composição corporal serão realizadas em ambiente adequado e de forma individualizada utilizando-se as técnicas padronizadas e preconizadas na literatura científica. Com relação aos questionários caso o Sr. (a) sinta algum constrangimento, devido a determinada pergunta, poderá se negar a responder uma, duas ou até mesmo todas as perguntas se as mesmas lhe causarem qualquer desconforto. De acordo com os relatos na literatura, não há riscos para o indivíduo devido ao consumo da bebida teste. No entanto, caso ocorra algum desconforto a equipe de pesquisa se responsabilizará pelos cuidados com os voluntários.

Quanto aos benefícios, ao final do estudo o Sr.(a) receberá uma avaliação do seu estado nutricional e de saúde, bem como orientações para melhorar sua alimentação habitual.

Para participar deste estudo o Sr.(a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr.(a) tem assegurado o direito à indenização. O Sr.(a) receberá assistência integral e imediata pelo tempo necessário, cujos custos serão de inteira responsabilidade dos pesquisadores. A equipe de trabalho não se responsabiliza por informações não prestadas a você, que possam interferir no seu estado de saúde.

Este estudo não trará prejuízos financeiros e todo o material necessário será fornecido pela equipe de pesquisa. Todos os gastos decorrentes da participação na pesquisa, incluindo gastos

com transporte e alimentação para você e seu(s) acompanhante(s), quando for o caso, serão ressarcidos. Além disso, não haverá nenhuma forma de contrato de trabalho ou remuneração para com o voluntário.

O Sr.(a) tem garantida plena liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem necessidade de comunicado prévio. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr.(a) é atendido(a) pelo pesquisador. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. O Sr.(a) não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar. Seu nome ou o material que indique sua participação não serão liberados sem a sua permissão.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida ao Sr.(a). Todas as páginas deverão ser rubricadas por você e pelo pesquisador responsável ou por uma das pós graduandas da pesquisa. Os questionários coletados no presente estudo serão armazenados para análises relativas a este projeto e ainda, poderão ser utilizados em outras pesquisas da mesma área de estudo. Os resultados desse projeto e de outros futuros serão apresentados, comunicados e/ou publicados no meio científico, mas sempre preservando sua confidencialidade e privacidade. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa, e depois desse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e confidencialidade, atendendo à legislação brasileira, em especial, à Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, e utilizarão as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____
_____, documento _____, contato _____, fui informado(a) dos objetivos da pesquisa de maneira clara e detalhada, e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer minhas dúvidas.

Viçosa, _____ de _____ de 20__.

Assinatura do voluntário

Prof Hercia Stampini Duarte Martino
Líder do Projeto de Pesquisa (DNS/UFV)

Thauana Lorena Silva Magalhães
Mestranda (DNS/UFV)

Nomes e números dos telefones dos investigadores:

Pesquisadora responsável: Profª Hércia Stampini Duarte Martino

Endereço: Universidade Federal de Viçosa - Departamento de Tecnologia de Alimentos

Campus Universitário – CEP: 36571-000, Viçosa, MG.

Telefone: 31-3612-5207 e-mail: hercia@ufv.br

Em caso de discordância ou irregularidades sob o aspecto ético desta pesquisa, você poderá consultar:

CEP/UFV – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

Universidade Federal de Viçosa - Edifício Arthur Bernardes, piso inferior

Av. PH Rolfs, s/n – Campus Universitário - Cep: 36570-900 Viçosa/MG

Telefone: (31) 3612-2316 - Email: cep@ufv.br - www.cep.ufv.br

Atendimento de segunda a sexta-feira das 8:00 às 12:00.

APÊNDICE G – Material suplementar do artigo 1**Germinated and non-germinated cooked whole millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) flours shows promising effect on protein quality, biochemical profile and intestinal health *in vivo***

Thauana Lorena Silva Magalhães ^a, Bárbara Pereira da Silva ^a, Mariana Grancieri ^a, Haira Guedes Lúcio ^a, Renata Celi Lopes Toledo ^a, Roberta Ribeiro Silva ^b, Carlos Wanderlei Piler de Carvalho ^c and Hércia Stampini Duarte Martino ^{a*}

^aDepartment of Nutrition and Health. Universidade Federal de Viçosa. Av. Purdue, s/n, Campus Universitário, Viçosa – MG, Brazil, Zip Code: 36.570-900. E-mail: thauana.magalhaes@ufv.br; barbarapereira2805@gmail.com; mariana.grancieri@ufv.br; haira.lucio@ufv.br; renatacelly@yahoo.com.br; hercia@ufv.br

^bDepartment of Nutrition, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas – MG, Brazil, Zip Code: 37130-000. E-mail: betaribeiro@hotmail.com

^cEmbrapa Agroindústria de Alimentos. Av. das Américas, nº 29.501, Guaratiba, Rio de Janeiro – RJ, Brazil, Zip Code: 23.020-470. E-mail: carlos.piler@embrapa.br

* Corresponding author: e-mail: hercia@ufv.br; Phone: +55-31-3612-5188; Fax number: +55-31-3899-2541.

Supplementary Table 1 Composition of the experimental diets.

Ingredients (g/100 g)	Experimental diets			
	CC	Aproteic	NM	GM
Casein*	12.02	0.00	3.00	3.00
Germinated millet flour	0.00	0.00	0.00	55.58
Conventional millet flour	0.00	0.00	55.31	0.00
Dextrinized starch	13.20	13.20	13.20	13.20
Corn starch	45.74	57.76	7.78	8.54
Sucrose	10.00	10.00	10.00	10.00
Soybean oil	7.00	7.00	4.70	4.58
Fiber (microcrystalline cellulose)	6.99	6.99	0.96	0.05
Mineral mix	3.50	3.50	3.50	3.50
Vitamin mix	1.00	1.00	1.00	1.00
L-cystine	0.30	0.30	0.30	0.30
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25
Composition of diets (%)				
Carbohydrates	68.90	68.90	68.90	68.90
Proteins	9.50	9.50	9.50	9.50
Lipids	7	7	7	7
Caloric density (kcal/g)	3.8	3.9	3.7	3.6

Composition of the experimental diets based on the standard rodent diet (AIN-93G). CC (casein control diet); Aproteic (free protein diet); NM (non-germinated millet diet); GM (germinated millet diet). *Casein based on 79% protein content.

Supplementary Table 2 Essential amino acid profile, chemical score (score AA), and PDCAAS according to the standard FAO¹ of the experimental diets.

Amino acids	(mg/g protein)			Standard FAO (2013)	Score AA			PDCAAS		
	CC	NM	GM		CC	NM	GM	CC	NM	GM
Tryptophan	11.54	14.24	13.71	11.00	1.36	1.68	1.61	-	-	-
Lysine	68.67	41.04	39.69	58.00	1.20	0.72	0.70	-	61.50	58.33
Histidine	29.96	27.58	26.21	21.00	1.50	1.38	1.31	-	-	-
Threonine	46.38	42.46	40.55	34.00	1.50	1.37	1.31	-	-	-
Methionine + Cysteine	21.68	79.95	73.58	25.00	0.80	2.96	2.73	76.50	-	-
Valine	65.04	59.06	57.80	35.00	1.51	1.37	1.34	-	-	-
Isoleucine	51.88	45.87	46.02	28.00	1.62	1.43	1.44	-	-	-
Leucine	104.72	105.08	103.70	66.00	1.59	1.59	1.57	-	-	-
Phenylalanine + Tyrosine	72.90	86.93	85.21	63.00	1.40	1.67	1.64	-	-	-

CC (diet of casein control group); NM (diet of non-germinated millet group); GM (diet of germinated millet group); Score AA (quotient of the division between the mg of aa/g protein CC, NM or GM and the mg of aa/g protein standard FAO); Standard FAO (2013) (FAO, 2013) (United Nations Food and Agriculture Organization (FAO), theoretical standard for essential amino acids for children aged 6 months to 3 years); PDCAAS (multiplication between the 1st amino acid limited and the true digestibility of experiment with rats). True Digestibility: CC = 95.27; NM = 85.42; GM = 83.77.

Reference

- 1 FAO, Dietary protein quality evaluation in human nutrition, *FAO Food Nutr Pap*, 2013, **92**, 1–66.

APÊNDICE H – Material suplementar do artigo 2

The effects of acute consumption of a beverage containing extruded pearl millet flour on glycemic and insulinemic control, food intake, and appetite sensation in adults: a randomized crossover clinical trial.

Table S1 Characterization of the participants' food intake at baseline.

Volunteer	Baseline food intake (kcal)					FIB/1000
	Kcal	CHO	PTN	LIP	FIB	kcal
1	1898.73	253.39	80.56	62.55	24.52	26.58
2	2871.04	413.87	84.10	97.68	39.56	40.19
3	1556.67	199.56	64.27	55.71	15.55	21.79
4	1286.77	182.64	46.06	41.33	17.93	18.01
5	1470.67	113.61	110.45	63.83	17.11	20.59
6	1869.25	250.78	92.76	55.01	24.30	26.17
7	1968.07	288.14	69.74	59.61	21.83	27.55
8	2511.16	318.47	89.26	97.81	13.63	35.16
9	1945.69	269.21	83.46	59.45	24.52	27.24
10	1666.95	185.96	76.26	68.67	15.69	23.34
11	1314.54	110.13	122.77	42.55	9.98	18.40
12	2024.91	235.32	90.33	80.26	16.98	28.35
13	1962.25	258.19	91.98	62.40	31.34	27.47
14	1976.41	253.67	88.08	67.71	40.67	27.67

The values are the average of three 24-hour food records in the baseline phase. Kcal (kilocalorie); CHO (carbohydrates); PTN (proteins); LIP (lipids); FIB (dietary fiber).