



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS**

Virgílio Gavicho Uarrota

**PERFIL METABÓLICO PRIMÁRIO (PROTEÍNAS, AMIDO E
LIPÍDEOS) E SECUNDÁRIO [CAROTENÓIDES,
ANTOCIANINAS E ÁCIDOS (POLI)FENÓLICOS] DE GRÃOS
DE OITO VARIEDADES CRIOULAS DE MILHO**

**Florianópolis
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS**

Virgílio Gavicho Uarrota

**PERFIL METABÓLICO PRIMÁRIO (PROTEÍNAS, AMIDO E
LIPÍDEOS) E SECUNDÁRIO [CAROTENÓIDES,
ANTOCIANINAS E ÁCIDOS (POLI)FENÓLICOS] DE GRÃOS
DE OITO VARIEDADES CRIOLAS DE MILHO**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biotecnologia da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre em Biotecnologia
Orientador: Prof. Dr. Marcelo
Maraschin

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

U11p Uarrota, Virgílio Gavicho
Perfil metabólico primário (proteínas, amido e lipídeos)
e secundário [carotenóides, antocianinas e ácidos
(poli)fenólicos] de grãos de oito variedades crioulas de milho
[dissertação] / Virgílio Gavicho Uarrota ; orientador, Marcelo
Maraschim. - Florianópolis, SC, 2011.
181 p.: grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia.

Inclui referências

1. Biotecnologia. 2. Milho crioulo. 3. Carotenóides.
4. Antocianina. 5. Fenóis. 6. Amido. I. Maraschim, Marcelo.
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 577.23

Virgílio Gavicho Uarrota

PERFIL METABÓLICO PRIMÁRIO (PROTEÍNAS, AMIDO E LIPÍDEOS) E SECUNDÁRIO [CAROTENÓIDES, ANTOCIANINAS E ÁCIDOS (POLI)FENÓLICOS] DE GRÃOS DE OITO VARIEDADES CRIOLAS DE MILHO

Dissertação julgada e aprovada em 17/02/2011, pelo Orientador e Membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de Concentração: Biotecnologia Agroflorestal; Linha de Pesquisa: Otimização de Bioprocessos; e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, CCB/UFSC.

Prof.^a. Dr.^a. Cláudia Maria Oliveira Simões
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Maraschin (Presidente/Orientador)

Prof.^a. Dr.^a. Ana Maria Viana (Titular/UFSC)

Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes (Externo/UNIVALI)

Prof.^a. Dr.^a. Edna Regina Amante (Titular/UFSC)

Florianópolis, Março de 2011

Dedicatória

Dedico este trabalho à memória do meu pai, Celestino Gavicho Uarrota e aos meus irmãos Teresa Gavicho Uarrota e Guitó Gavicho Uarrota;

À minha mãe Joaquina Joanguete, pelo amor, educação e apoio moral prestados durante a minha formação acadêmica;

Aos meus avós Uarrota, Marta, Maria, Joanguete, Piquina, pelo carinho durante a infância;

À minha família: Egídio, Luís, Almirante, Marcelino, Lindo, Mãezinha, Esperança, Francelina, Nélio, que sempre serviram de inspiração para a realização deste trabalho;

À Karine Margarida da Silva, pelo amor, carinho e apoio prestado.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é resultado do esforço de todos que direta e indiretamente ajudaram na concretização desta dissertação, por isso, os meus sinceros agradecimentos:

Aos meus pais, Celestino Gavicho Uarrota e Joaquina Joangute pelo apoio moral, social, económico, amor e zelo durante toda a minha vida, fica uma dívida incalculável.

Especial abraço para Nelio Gavicho Uarrota, pelo carinho e amizade.

Aos meus irmãos Marcelino, Lindo, Luís, Egídio, Esperança, Francelina, Mãezinha e Almirante por toda ajuda que têm prestado para a minha vida social e académica.

Aos meus tios e primos, José Faque, Margarida, Abel, Abelina, Martinha, Hibraímo, Nandinho, Carmona, Celestino, e Manuelinho pelo carinho, apoio moral e receptividade que sempre tiveram ao longo do meu percurso.

Aos meus sobrinhos e cunhadas Furruma, Uarrota, Helder, Gavicho, Tânia, Anabela, Akiko, Irraquiela e Julaida.

À família Soren Storm, Adriana Ingeringere e Priscilla Storm, pela recepção durante a minha chegada no Brasil e espírito de familiaridade, muito obrigado.

À minha amiga Júlia Novela e sua mãe Manuela, pela amizade, amor, carinho, receptividade e todo apoio que facilitaram para a minha recepção no Brasil, meu muito obrigado

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Marcelo Maraschin, que para além de educador, foi grande pai. Meu "Kanimambo", pelo alto sentido profissional, confiança demonstrada e fundamentalmente pelas normas científicas transmitidas.

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia de Moçambique (MCT) e ao CNPq-Brasil, pela concessão da bolsa de estudos, meu muito obrigado.

Ao grupo do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), Prof. Paulo Dias, Prof. Shirley, Priscilla, Beatriz Veleirinho, Simone Kobe, Luana, Diego, Ana, Maira, Carina Malinowsky, Fernanda Borba, Ricardo, Luisa, Luis, Bianca, Eduardo, Loïsiana, pela boa dinâmica do grupo, convivência e familiaridade.

À prof. Edna Regina Amante e ao grupo do Laboratório de Frutas e Hortaliças (LFH), pela alta receptividade, ajudas durante o trabalho e conhecimento transmitido.

Ao grupo do Laboratório de Algas Marinhas (LAMAR), Éder, Rodrigo, Prof. Zenilda Bouzon, e Shirley (Laboratório de Microscopia de Fluorescência- FLUORBEG), fica uma ajuda incalculável e muito obrigado pelo café durante as análises histoquímicas.

Ao prof. Robson Di Piero, pela confiança, conhecimento, amizade e por cima de tudo pelas cartas de referência fornecidas.

Aos meus Supervisores em Moçambique, Prof. Dr. Inácio Calvino Maposse e Dr. Rogério Marcos Chiulele (Universidade Eduardo Mondlane- UEM), pela confiança, cartas de referência e conhecimento transmitido.

Ao pessoal técnico do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), pelas ajudas durante as análises em Microscopia Eletrônica de Varredura.

À todos os professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, pessoal técnico e administrativo, discentes do Programa, e a UFSC em geral, pelo conhecimento científico e zelo que me deram.

À Joice Ferreira (Secretária do PPG-Biotecnologia) pelo todo auxílio fornecido desde a minha chegada no Brasil, atenção e carinho durante a formação.

Ao pessoal técnico do Campo Experimental da Ressacada-UFSC, em especial, o Eng. Octávio, Cláudio, Sr. Gregório, prof. Nagaoka por toda ajuda fornecida durante os experimentos de campo.

Ao prof. Valdir Soldi e Marly Soldi (Laboratório de Polímeros-Departamento de Química/UFSC), pela ajuda durante as análises de calorimetria diferencial de varredura.

Ao prof. Ivo Demiatte (Universidade de Ponta Grossa, Paraná, Departamento de Engenharia de Alimentos) pela ajuda nas análises sobre a viscosidade de amido.

À prof. Alícia de Francisco (Laboratório de Cereais-Departamento de Ciência de Alimentos/UFSC), pelas ajudas e conhecimento transmitido sobre Microscopia de Fluorescência.

Ao pessoal da Universidade de Aveiro, Departamento de Química (Portugal) pela ajuda fornecida nas análises de Espectroscopia Vibracional de Infravermelho médio com transformada de Fourier.

Ao Eng. Adriano Canci, e aos agricultores do Município de Anchieta em geral, pelo fornecimento de sementes crioulas de Milho.

À Lila Olimpio Manuel e sua família, Cacilda Mondlane e sua família, Virgínia Mandlate, Graciosa Augusto, pela amizade e convivência.

Aos meus amigos no Brasil e Moçambique, Karine, Ramila, Thiago e sua família, Lucinha, César, Priscilla e sua Família, Junior, Luís Bô, Delfim Vilissa, José Acácio, Jeremias Sacuze, Manuelinho, Sérgio Moniz, Sérgio Baptista, Albertina Mulumba, Custema, Azael, Dique, Lutigardo, Nelson, Agostinho, Masmil, muito obrigado.

Aos meus colegas de trabalho em Moçambique, Escola Secundária Geral de Inhassunge (Zambézia), Escola UNIDADE 2, Escola Comunitária São Paulo e Banco de Microfinanças SOCREMO (Maputo) pela convivência.

A todo pessoal de serviços básicos da UFSC, da biblioteca e restaurantes.

***A todos, o meu "Kanimambo"
Obrigado!***

*Given the vastness of time and
the immensity of the universe is
an immense pleasure for me to
share one planet and one time
with you.*

Carl Sagan

*"Diante da vastidão do tempo e da
imensidão do universo, é um
imenso prazer para mim dividir um
planeta e uma época com você."*

*Carl Sagan
(Tradução de Virgílio Gavicho
Uarrota)*

RESUMO

O presente trabalho analisou o perfil metabólico primário (proteínas, amido e lipídeos) e secundário (carotenóides, antocianinas e compostos fenólicos) de oito variedades crioulas de milho desenvolvidas por pequenos agricultores do município de Anchieta (SC) e avaliou o efeito do ambiente sobre o teor daqueles metabólitos cultivando as mesmas variedades no campo experimental da UFSC (Florianópolis), assim como características físico-químicas e funcionais das farinhas e amidos de variedades crioulas e híbridas de milho. Os resultados mostraram diferenças na composição química (proteínas e amido) detectadas por técnicas histoquímicas assim como pela quantificação do teor daqueles compostos nas amostras de variedades de milho (amido, proteínas e lipídeos). Maior ocorrência de polissacarídeos ácidos, amido, celulose e proteínas foi vista para as variedades desenvolvidas em Anchieta (Geração F0). A quantificação do teor de proteínas revelou F0 como sendo a geração de maior ocorrência daqueles compostos. As variedades crioulas MG-0, MPA1-1, LP-1, RXE-1 mostraram-se como fontes de apreciável teor de lipídeos. O tamanho dos grânulos dos amidos de variedades crioulas foi bastante heterogênea, na grande parte são circulares e apresentando fibras na matriz do amido. O poder de inchamento, índice de solubilidade, capacidade de retenção de água foram em geral baixos para as variedades crioulas de milho. Conteúdos superiores de amilose foram detectados para as variedades R8C-0, RJ-0 e Fortuna. A espectroscopia de infravermelho (FT-IR) aliada a quimiometria (PCAs) revelou a presença de proteínas, lipídeos, amido como sendo os compostos majoritários, no entanto, foi notório a presença de açúcares e compostos de metabolismo secundário (terpenóides). Baixas temperaturas de gelatinização foram observadas para as variedades MPA1 e RXE (F0) e valores elevados para LP e RJ (F0). Menores viscosidades das pastas de amidos foram detectados para RJ, RXE, e PR (F0), no entanto, as variedades RJ e R8C apresentaram maior tendência a retrogradação. Em geral amidos de variedades da F1 apresentaram maior retrogradação.

A análise do conteúdo de metabólitos secundários em sementes, folhas e flores femininas das variedades crioulas e híbridas revelou maiores teores de carotenóides para as variedades LP (folhas), RX (flores femininas) e RXE (sementes). A geração F1 apresentou maior teor médio de

carotenóides comparativamente a F0 e variedades híbridas, revelando o efeito do ambiente na síntese daqueles compostos. O tratamento hidrotérmico aplicado na extração degradou os carotenóides. A CLAE, revelou serem as xantofilas (luteína e zeaxantina) os compostos majoritários em sementes de variedades crioulas, com destaque para as variedades RX, PR (F0), e PR, MG, RXE (F1). O teor de carotenóides foi superior na geração F1 assim como a síntese de α , e β -carotenos, com destaque destes em PR, MG e RXE (F1). A variedade híbrida BR SC 154 revelou superioridade em carotenóides totais por CLAE comparativamente a todas outras estudadas. Teores elevados de antocianinas foram detectados em folhas, flores, e sementes das variedades PR, MG e LP-0 respectivamente, enquanto que, teores elevados de fenólicos totais foram observados em flores, folhas e grãos de RJ, RX e R8C-0 respectivamente.

O estudo permitiu concluir que tanto amidos e farinhas das variedades F0, F1 e híbridas apresentaram algumas características desejáveis (alta viscosidade, baixa temperatura de empastamento, elevado teor de lipídios assim como teor médio de amilose) e podem ser usados para a obtenção de alguns produtos na indústria (Pães, pudins, sobremesas), fato que pode agregar mais valor, mais aplicabilidade e gerar novas perspectivas de uso destas variedades crioulas de milho e incentivo ao pequeno agricultor que vem desenvolvendo essas variedades ao longo de décadas. Variedades de milho crioulo exibiram quantidades apreciáveis de carotenóides, antocianinas e fenólicos existentes em diferentes partes da planta que vários outros relatos na literatura, e constituem ótimo material de exploração de compostos do metabolismo secundário para fins farmacêuticos, saúde e na indústria cosmética, fato que vai agregar mais valor e preservação deste germoplasma.

Palavras-chave: Milho crioulo (*Zea mays* L.); carotenóides; antocianinas; compostos fenólicos, amido.

ABSTRACT

This study examined the primary metabolic profile (protein, starch and lipid) and secondary (carotenoids, anthocyanins and phenolics) of eight maize landraces developed by small farmers in the municipality of Anchieta (SC) and assessed the effect of environment on the metabolite content of those cultivating the same varieties in the experimental field of UFSC (Florianópolis). Physico-chemical and functional properties of flours and starches of maize landraces and hybrid varieties were also studied. The results showed differences in chemical composition (protein and starch) detected by histochemistry techniques as well as the quantification of the content of those compounds in the samples of maize varieties (starch, proteins and lipids). Increased occurrence of acidic polysaccharides, starch, cellulose and protein was seen for the maize landraces developed in Anchieta (F0 generation). The quantification of protein content revealed higher occurrence of those compounds for F0 generation. The landraces MG-0, MPA1-1, LP-1, RXE-1 appeared as sources of appreciable levels of lipids. The particle size of starches from landraces was very heterogeneous, in large part are circular and presenting fibers in the matrix of starch

The swelling power, solubility index, and water holding capacity were generally low for maize landraces. Higher amylose content was detected for the varieties R8C-0, RJ-0 and Fortuna. Infrared spectroscopy (FT-IR) coupled with chemometrics (PCA) revealed the presence of proteins, lipids, starch as the major components, however, was evident the presence of sugars and secondary metabolites compounds (terpenoids). Low gelatinization temperatures were observed for varieties MPA1 and RXE (F0) and high values for LP and RJ (F0). Lower viscosity of starch pastes were detected for RJ, RXE, and PR (F0), however, the varieties RJ, R8C showed higher retrogradation. In general the F1 varieties of starches showed higher retrogradation.

The analysis of secondary metabolites in seeds, leaves and maize silks of landraces and hybrid showed higher levels of carotenoids for the varieties LP (leaves), RX (maize silks) and RXE (seeds). The F1 generation showed a higher average content of carotenoids compared to F0 and hybrid varieties, revealing the effect of environment on the synthesis of those compounds. The hydrothermal treatment degraded carotenoids extraction. HPLC revealed to be the xanthophylls (lutein

and zeaxanthin) as the major components in seeds of local varieties, especially for RX, PR (F0), and PR, MG, RXE (F1). The carotene content was higher in the F1 generation as well as the synthesis of α , and β -carotene, especially those in PR, MG and RXE (F1). The hybrid variety BR 154 SC showed superiority in carotenoids by HPLC compared to all other studied. High levels of anthocyanins were detected in leaves, maize silks, and seed varieties of PR, MG and LP-0, respectively, whereas high levels of phenolics were observed in maize silks, leaves and grains of RJ, R8C and RX-0 respectively.

The study showed that both varieties of starches and flours of F0, F1 and hybrid had some desirable features (high viscosity, low temperature tightness, high fat content as well as medium amylose) and can be used to obtain certain products in industry (breads, puddings, desserts), which can add more value, more applicability and generate new prospects for using these varieties of maize and encouragement to the small farmer who has been developing along these varieties of maize landraces. Maize landraces presented appreciable amounts of carotenoids, anthocyanins and phenolic compounds detected in different plant parts than several other reports in the literature, and provide great raw materials of secondary metabolic compounds for pharmaceutical, health and cosmetics industry, a fact that will add more value and preservation this germplasm.

Keywords: Maize landraces (*Zea mays* L.); carotenoids; anthocyanins; phenolic compounds; starch.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1	Detalhe da estrutura química da amilose	37
Figura 2	Detalhe da estrutura química da amilopectina	38
Figura 3	Estados físicos de amido durante a cocção, resfriamento e armazenamento	42
Figura 4	Representação esquemática do grão de milho, evidenciando seus principais componentes estruturais	49
Figura 5	Reação de saponificação dos ácidos graxos e formação de sabão	52
Figura 6	Representação estrutural dos ácidos graxos saturados e insaturados	53
Figura 7	Exemplos ilustrando a predominância dos ácidos graxos em Sebo bovino, manteiga, óleo de côco e de milho	54
Figura 8	Curva padrão de amilose obtida usando-se soluções de amilose-amilopectina	64
Figura 9	Detalhes da coloração celular de grão de variedades de milho crioulo com azul de toluidina, mostrando reação metacromática do núcleo e paredes celulares, indicativa da presença de polissacarídeos ácidos	69
Figura 10	- Micrografias de células de grãos de variedades crioulas de milho coradas com ácido periódico de Schiff demonstrando a reação positiva para a ocorrência de polissacarídeos neutros	70
Figura 11	Detalhe da coloração de células de grãos de variedades crioulas de milho na presença de azul brilhante de Coomassie, mostrando a presença de proteínas no citoplasma e mais intensamente no núcleo	71
Figura 12	Teor de umidade de amostras de farinhas de variedades crioulas de milho	76
Figura 13A	Micrografias dos grânulos de amido extraídos de grãos de variedades crioulas	89
Figura 13B	Micrografias dos grânulos de amido extraídos de grãos de variedades crioulas e híbridas	90
Figura 14	Termogramas de DSC dos amidos de milho obtidos	

	em suspensão amido-água de 30%.	95
Figura 15	Curvas de viscosidade das pastas de amido de milhos crioulos	98
Figura 16A	Perfil espectral de infravermelho médio de amostras de farinhas de variedades crioulas de milho, geração F0	100
Figura 16B	Espectros de infravermelho médio de amostras de farinhas de variedades crioulas de milho, geração F1	103
Figura 16C	Espectros de infravermelho médio de amostras de farinhas de variedades crioulas de milho, variedades híbridas	103
Figura 16D	Distribuição fatorial dos componentes principais dos espectros de FT-IR de farinhas de variedades crioulas e híbridas de milho	107

Capítulo 2

Figura 1	Visão simplificada das principais vias de síntese de metabólitos secundários e suas relações com o metabolismo primário	137
Figura 2	Estrutura básica dos terpenos	138
Figura 3	Biossíntese dos terpenos	139
Figura 4	Detalhes da estrutura química de carotenos e carotenóides de importância biológica	141
Figura 5	- Vias biossintéticas de carotenóides a partir do precursor fitoeno	141
Figura 6	Detalhe da estrutura química do beta-caroteno	142
Figura 7	Estrutura química básica dos compostos fenólicos ...	147
Figura 8	Via do ácido chiquímico para biossíntese de compostos fenólicos e alcalóides	148
Figura 9A	Detalhe da estrutura química das antocianidinas	149
Figura 9B	Detalhe da estrutura química das antocianinas	149
Figura 9C	Detalhe da estrutura química do cátion flavilium	150
Figura 10A	Rendimento do teor de carotenóides totais em grãos de milho, geração F0 sem tratamento hidrotérmico ..	159
Figura 10B	Rendimento do teor de carotenóides totais em grãos de milho, geração F0 com tratamento hidrotérmico .	159
Figura 11A	Rendimento do teor de carotenóides totais em grãos de milho, geração F1 sem tratamento hidrotérmico ..	160
Figura 11B	Rendimento do teor de carotenóides totais em grãos de milho, geração F1 com tratamento hidrotérmico .	160

Figura 12A	- Rendimento do teor de carotenóides totais em grãos de milho, variedades híbridas sem tratamento hidrotérmico	161
Figura 12B	Rendimento do teor de carotenóides totais em grãos de milho, variedades híbridas com tratamento hidrotérmico	161
Figura 13A	Rendimento do teor de carotenóides totais em folhas de milho, geração F1.....	163
Figura 13B	Rendimento do teor de carotenóides totais em flores femininas de milho, geração F1	163
Figura 14A	Rendimento de antocianinas totais em grãos de milho, geração F0	166
Figura 14B	- Rendimento de antocianinas totais em grãos de milho, geração F1	166
Figura 14C	Rendimento de antocianinas totais em grãos de milho, variedades híbridas	167
Figura 15A	Rendimento de antocianinas totais em folhas de milho, geração F1	169
Figura 15B	Rendimento de antocianinas totais em flores femininas de milho, geração F1	169
Figura 16A	Rendimento do teor de compostos fenólicos totais em grãos de milho, geração F	170
Figura 16B	Rendimento do teor de compostos fenólicos totais em grãos de milho, geração F1	170
Figura 16C	- Rendimento do teor de compostos fenólicos totais em grãos de milho, variedades híbridas	170
Figura 17A	Rendimento do teor de compostos fenólicos totais em folhas de milho, geração F1	172
Figura 17B	Rendimento do teor de compostos fenólicos totais em flores femininas de milho, geração F1	172

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição relativa (% base seca) e solubilidade das frações protéicas em grãos de milho, consoante ao tecido de ocorrência	50
Tabela 2	Composição centesimal do endosperma, embrião, pericarpo, ponta e do grão de Zea mays	51
Tabela 3	Conteúdos médios de proteínas de grãos de variedades crioulas de milho e híbridas	73
Tabela 4	Rendimento de amido, teor médio de amilose e lipídeos e características físico-químicas e funcionais de farinhas de grãos de VMC, geração F0	83
Tabela 5	Rendimento de amido, teor médio de amilose e lipídeos e características físico-químicas e funcionais de farinhas de grãos de VMC, geração F1 e variedades híbridas	84
Tabela 6	Propriedades térmicas dos amidos de milho determinadas por calorimetria diferencial de varredura (DSC)	93
Tabela 7	Características funcionais da pasta dos amidos de grãos de milho de variedades crioulas (gerações F0 e F1) e híbridas	97
Tabela 8	- Classes de compostos detectados nos espectros de FT-IR de farinhas das variedades crioulas de milho, geração F0	101
Tabela 9	Bandas características e seus compostos representantes em FT-IR	104
Tabela 10	Classes de compostos detectados nos espectros de FT-IR de farinhas das variedades crioulas de milho, geração F1	105

Capítulo 2.

Tabela 1	Características diferenciais do metabolismo primário e secundário vegetal	134
Tabela 2	Metabólitos secundários com funções primárias e secundárias no metabolismo vegetal	136
Tabela 3	Efeito dos substituintes do anel na cor das antocianinas	150

Tabela 4	Conteúdo dos carotenóides em grãos de variedades crioulas de milho, geração F0 determinadas por CLAE	164
Tabela 5	Teor de carotenóides em variedades crioulas de milho, determinadas por CLAE	165

SUMÁRIO

Capítulo 1. Perfil metabólico primário (proteínas, amido e lipídeos) e caracterização físico-química, funcional e espectroscópica (FT-IR) e térmica de farinhas e amidos de 8 variedades crioulas de milho (*Zea mays* L.)

1. Introdução.....	27
2.1 Objetivos gerais.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3. Revisão bibliográfica.....	33
3.1 Importância econômica do milho.....	33
3.1.1 Milho crioulo.....	34
3.2 Amido de milho.....	35
3.2.1 Amilose.....	36
3.2.2 Amilopectina.....	38
3.2.3 Características desejáveis do amido.....	40
3.2.4 Aplicação industrial do amido.....	41
3.3 Propriedades do amido.....	41
3.3.1 Solubilidade.....	42
3.3.2 Capacidade de ligação dos grânulos de amido a água.....	43
3.3.3 Poder de inchamento e índice de solubilidade.....	43
3.3.4 Gelatinização.....	44
3.3.5 Retrogradação.....	46
3.3.6 Viscosidade.....	47
3.3.7 Sinérese.....	47
3.3.8 Perfil reológico do amido.....	47
3.4 Teor de proteínas.....	48
3.5 Teor de lipídeos.....	50
3.6 Espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier.....	55
4. Materiais e Métodos.....	57
5. Resultados e Discussão.....	69
6. Conclusões.....	109
7. Referências bibliográficas.....	111

Capítulo 2. Análise do perfil metabólico secundário (carotenóides, antocianinas e compostos fenólicos) de oito variedades crioulas de milho (*Zea mays* L.).

1. Introdução.....	129
2.1 Objetivos gerais.....	131
2.2 Objetivos específicos.....	131
3. Revisão bibliográfica.....	133
3.1 Metabólitos secundários.....	133
3.1.1 Terpenos.....	138
3.1.2 Carotenóides.....	140
3.1.3 Biossíntese dos carotenóides.....	141
3.1.4 Licopêno.....	143
3.1.5 α e β -carotênos.....	143
3.1.6 β -criptoxantina.....	143
3.1.7 Luteína e Zeaxantina.....	143
3.2 Importância dos carotenóides.....	144
3.3 Fatores que influenciam o teor dos carotenóides.....	145
3.4 Compostos fenólicos.....	147
3.4.1 Biossíntese dos compostos fenólicos.....	147
3.4.2 Antocianinas.....	148
3.4.3 Funções das antocianinas em Vegetais.....	150
3.4.4 Fatores que afetam a extração, o isolamento e estabilidade das antocianinas.....	151
3.4.5 Importância econômica e na saúde dos compostos fenólicos e antocianinas.....	152
4. Materiais e Métodos.....	155
5. Resultados e Discussão.....	159
6. Conclusões.....	175
7. Referências bibliográficas.....	177

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) representa um dos cereais mais cultivados no mundo, precedido apenas pelas culturas do trigo e do arroz (LOPEZ-MARTINEZ et al., 2009). A produção mundial de milho foi de 810,97 milhões de toneladas na safra 2009/2010, com estimativa de aumento para 826,07 milhões de toneladas para a safra 2010/2011 (CONAB, 2010/2011; USDA, 2010), com destaque aos EUA, maior produtor mundial, contribuindo com 50% da produção daquele cereal. No Brasil, 4º maior produtor mundial (CONAB, 2010/2011), os estados do PR (23,3%), MT (15,2%), MG (11,1%) e RS (10,2%) (DESENBAHIA, 2010/2011) são os principais produtores. A produção brasileira de milho representa 6,1% da produção mundial e constitui uma importante fonte de energia, proteínas e outros nutrientes para o consumo humano e animal (FAOSTAT, 2010).

Todas as evidências científicas levam a crer que *Z. mays* L. seja uma espécie de origem americana, onde era cultivada desde o período pré-colombiano. Historicamente, na alimentação humana o milho tem sido consumido *in natura*, como milho verde cozido, ou na forma de produtos derivados dos grãos secos como a farinha, pão, massas, canjica e fubá (FAOSTAT, 2010).

Puro ou como ingrediente de outros produtos, o milho é uma importante fonte energética para o homem. Ao contrário do trigo e do arroz que são refinados durante seus processos de industrialização, o milho conserva sua casca, que é rica em fibras e de importância à eliminação de toxinas do organismo humano. Além das fibras, o grão de milho é constituído de carboidratos, proteínas e vitaminas do complexo B. Possui bom potencial calórico, sendo constituído de grandes quantidades de açúcares e lipídeos. Além disto, o milho contém vários minerais como ferro, fósforo, potássio e zinco, porém é rico em ácido fítico que dificulta a absorção destes elementos (FAOSTAT, 2010). Este cereal é considerado um alimento nutritivo que contém quase todos os aminoácidos essenciais, sendo exceções a lisina e o triptofano.

A partir dos anos 50 a agricultura vem experimentando uma série de transformações e, dentre estas, as derivadas do melhoramento genético foram, possivelmente, as que mais afetaram o sistema de produção e a vida dos agricultores. Neste contexto, as variedades de milho crioulas (VMC) foram gradativamente substituídas por genótipos melhorados, em paralelo à adoção de pacotes tecnológicos para subsidiar sua produção. As VMC mostram-se mais tolerantes às variações de fatores climáticos, mais resistentes ao ataque de patógenos e atendem aos princípios da Agroecologia (MENEGUETTI et al., 2002).

Variedades crioulas são aquelas melhoradas e adaptadas por agricultores a determinadas condições edafoclimáticas, utilizando métodos próprios e sistemas de manejo específicos, desde que a agricultura se iniciou há cerca de dez mil anos (CORREA; WEID, 2006). Desta forma, as variedades crioulas atendem a um dos princípios básicos da Agroecologia que é o de desenvolver plantas adaptadas às condições locais da propriedade, capazes de tolerar variações ambientais e o ataque de organismos prejudiciais. Outro aspecto importante consiste na maior autonomia do agricultor que pode coletar as sementes destas variedades e replantá-las no ano seguinte, adquirindo maior independência do mercado de insumos e gerando um material que em função de sua variabilidade genética torna-se cada vez mais vigoroso e adaptado ao solo e clima local (CORREA; WEID, 2006).

Ao contrário das variedades híbridas comerciais, cujo potencial produtivo está diretamente ligado ao emprego de altas doses de insumos químicos, as variedades crioulas requerem pouco ou nenhum aporte de insumos externos, já que são adaptadas aos estresses ambientais locais a que foram submetidas durante seus processos evolutivos. Nesse sentido, mesmo em condições ambientais adversas, como as que freqüentemente são encontradas na realidade da agricultura familiar, as variedades crioulas e locais são capazes de manter produções satisfatórias (CORREA; WEID, 2006). Além disto, a variação genética entre as populações crioulas origina um conjunto genético adaptado que pode ser utilizado em programa de melhoramento regional para otimizar a interação de cultivares com o ambiente (MIRANDA et al., 2007) na

busca por genes tolerantes e/ou resistentes aos fatores bióticos e abióticos (ARAÚJO; NASS, 2007).

Em Santa Catarina, a Associação de Pequenos Agricultores do Oeste de Santa Catarina (Apaco) e o Centro Vianei de Educação Popular de Lages iniciaram um trabalho de resgate das sementes crioulas e contribuíram para que a discussão e a mobilização pela autonomia na produção de sementes e a Agroecologia se difundissem em todo o Estado (VOGT et al., 2007). Na mesorregião do oeste catarinense, especialmente no município de Anchieta, esse trabalho consolidou-se e alcançou repercussão nacional. A partir de 1996, o Sindicato dos Trabalhadores na Agricultura Familiar de Anchieta (Sintraf/Anchieta), com apoio da Prefeitura Municipal e de algumas ONGs, tem promovido ações de fomento ao resgate, uso e conservação de variedades locais de diversas espécies, especialmente o milho (VOGT et al., 2007).

Estudos visando à determinação de perfis metabólicos de células, tecidos e órgãos vegetais têm sido realizados em número crescente, com aplicação em diversas áreas, na obtenção de novos fármacos, descoberta de novos genes, elucidação de rotas metabólicas, correlação entre perfis metabólicos e patofisiologias, efeitos da inserção de (trans) gene(s) sobre o metabolismo, identificação de marcadores biológicos de toxicidade e a diferenciação de variedades selvagens daquelas modificadas geneticamente (WINK, 1999). No contexto do presente trabalho, o conhecimento das particularidades metabólicas das variedades de milhos crioulos (VMC), assim como a caracterização físico-química e funcional de seus amidos e farinhas, contribuirá à determinação do potencial de uso de matérias primas oriundas daqueles genótipos, gerando perspectivas de utilização diferenciada e acentuando eventualmente seu valor econômico. De fato, o conhecimento da variabilidade química de VMC reveste-se de interesse econômico, especialmente às indústrias farmacêutica, cosmética e alimentar, além de contribuir para o resgate daquele germoplasma, com possibilidades de aplicação direta em programas de melhoramento genético.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

- a) Determinar o perfil metabólico primário (proteínas, amido e lipídeos) de grãos de oito VMC (*Zea mays* L.);
- b) Determinar as características físico-químicas e funcionais de farinhas e amidos de grãos das VMC em estudo.

2.2 Específicos

- a) Analisar histoquimicamente grãos das VMC visando à detecção de proteínas, polissacarídeos estruturais e de reserva;
- b) Quantificar as proteínas, o amido, os lipídeos e a amilose de grãos das variedades de milho em análise;
- c) Determinar o poder de inchamento, o índice de solubilidade, a capacidade de retenção de água e a viscosidade da pasta das farinhas das VMC;
- d) Analisar as propriedades reológicas e a morfologia dos grânulos de amidos dos genótipos em estudo;
- e) Determinar o perfil espectral de infravermelho médio e a similaridade de composição química macromolecular das farinhas das VMC.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Importância econômica do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma das gramíneas cujo grão, mercê das suas qualidades organolépticas e nutritivas, tem assegurado o seu consumo em larga escala, na quase totalidade do globo terrestre. A maioria das populações dos países que o cultivam tem-no como alimento humano sob as mais variadas formas, também o destinando ao consumo dos animais e à indústria (LIMA, 1975).

Em escala mundial, o milho tem aumentado sensivelmente sua área cultivada, notadamente para suprir as demandas do mercado de alimentação animal. No Brasil, a cultura deste cereal remonta a períodos anteriores ao descobrimento e à colonização portuguesa, apresentando posição privilegiada e merecido destaque na economia nacional nos tempos atuais. Em termos de área plantada e de produção de grãos, é o segundo cereal de maior importância no Brasil, sendo que apenas nos últimos anos perdeu a primeira colocação à cultura da soja (VILARINHO, 2005).

Na indústria, seus grãos são matéria-prima para a obtenção de diversos produtos, tais como: álcool etílico e butílico, acetona, uísque, açúcar, dextrina, glucose, óleos, cerveja, vinagre, farinha grossa e fina, tintas, vernizes e sabão, por exemplo. Além disto, é extensivamente utilizado na alimentação animal, sob a forma de grão, ração balanceada e forragem verde (LIMA, 1975).

O milho é cultivado em todos os Estados do Brasil e em quase todas as propriedades agrícolas, tanto em pequena escala (agricultura familiar) como para a exportação, estando presente em toda a cadeia produtiva animal. É uma cultura de grande e diversificada utilização na sociedade moderna e um dos produtos agrícolas de mais ampla distribuição mundial, tanto na produção, quanto no consumo.

Embora o Brasil seja o quarto maior produtor mundial de milho (CONAB 2010/2011), sua produtividade é baixa. Em França, Itália e EUA, a produtividade média de milho é superior a 8.000 kg/ha, enquanto

no Brasil situa-se em torno de 4.316 kg/ha, inferior à produtividade média mundial de 5.180 kg/ha (RIGON et al., 2010). No entanto, a produtividade brasileira tem crescido sistematicamente, passando de 1.874 kg/ha, em 1990, para 3.330 kg/ha, em 2004 e 4.065 kg/ha na safra 2008/2009 (DESENBAHIA, 2010). Esse aumento de produtividade se dá, em parte, pelo uso crescente de cultivares geneticamente melhoradas e pelo aperfeiçoamento das condições de cultivo, com a adoção de tecnologias modernas tais como, correção do solo, adubação, variedades modernas, controle eficiente de plantas daninhas, moléstias/pragas e mecanização (VILARINHO, 2005). De fato, as regiões com as melhores produtividades caracterizam-se por adequadas condições edafoclimáticas e uso de tecnologias modernas, enquanto aquelas com menores produtividades caracterizam-se por práticas de manejo de forma quase artesanal, com baixo nível de uso de insumos modernos e, não raro, para consumo próprio (ARAUJO, 2009).

3.1.1 Milho crioulo

O sistema da produção agrícola da Região Sul do País, especialmente no Estado de Santa Catarina, está baseado na unidade de produção familiar, onde ainda é possível encontrar variedades locais de muitas espécies. Neste contexto, a produção agrícola garante a sobrevivência das famílias e sua permanência, sendo o milho usualmente seu principal produto, por servir de base na alimentação de animais e dos habitantes (SHIVA, 2001).

Variedades autóctones de milho (crioulas e locais) têm sido cultivadas por pequenos produtores ao longo de muitos anos e mais recentemente vem despertando interesse como valiosas fontes de características genéticas desejáveis e adaptabilidade a condições ambientais adversas. É considerado como crioulo o milho que teve o seu melhoramento genético limitado a intervenção manual humana, sem interferência dos meios tecnológicos (SHIVA, 2001).

As sucessivas crises do setor agrícola nacional desencadearam a busca por alternativas de produção de alimentos com menor custo, de modo a garantir a sobrevivência e a permanência das famílias no campo, via

construção de um sistema independente do modelo vigente do agronegócio. Sob este enfoque, o resgate de sementes crioulas de diversas espécies é reconhecido como de importância à manutenção e ao desenvolvimento da agricultura familiar catarinense e do Brasil, por exemplo, bem como aos programas de melhoramento genético, permitindo a ampliação de bases genéticas estreitadas ao longo das últimas décadas. Assim, aliado ao seu reconhecido potencial produtivo, composição química, valor nutritivo e multiplicidade de aplicações, o milho apresenta relevante papel sócio-econômico, além de constituir-se em indispensável matéria-prima a diversos complexos agroindustriais (FRANCELLI; NETO, 2000). Contudo, a despeito deste cenário, definições acerca dos potenciais de uso de grãos de VMC são escassas, justificando a investigação fitoquímica detalhada destes genótipos, como estratégia de aplicação dedicada/otimizada das matérias primas deste cereal.

3.2 Amido de milho

As plantas através da energia solar, do dióxido de carbono e da água sintetizam amido, uma importante reserva química de energia que a tecnologia explora na forma de um polímero com inúmeras propriedades funcionais. Devido à diversidade biológica e ambiental, os amidos se apresentam como grânulos das mais diversas formas, tamanhos e propriedades. O domínio e o conhecimento dessas características químicas são uma importante ferramenta à valorização do seu potencial. Esse polissacarídeo natural representa de 70 a 80% das calorias consumidas pelo homem (MARCON et al., 2007).

O amido é constituído basicamente por dois polímeros de α -D-glucose: amilose e amilopectina. A maioria dos grânulos de amido contém de 20 a 30 % de amilose e de 70 a 80% de amilopectina, com exceção de amidos de milho ceroso, obtidos por melhoramento genético e que contém 100% de amilopectina (MARCON et al., 2007).

Conforme relatam Singh et al. (2009), amilose e amilopectina são sintetizadas via processos enzimáticos altamente regulados. As isoformas de GBSS (*granule-bound starch synthase*) são responsáveis pela

biossíntese de amilose, enquanto a síntese de amilopectina é mais complicada e decorrente da atividade da SSS (*soluble starch synthase*) e outras enzimas. As características funcionais do amido são afetadas pelo teor de amilose, distribuição das ramificações das cadeias de amilopectina, conteúdos de fosfato mono-éster, fosfolipídeos, lipídeos, tamanho e distribuição do grânulo, estrutura cristalina e sua arquitetura. Em alguns cereais como o trigo, por exemplo, a amilopectina tem sido relatada em contribuir na adsorção de água, inchamento e características da pasta dos grânulos de amido, enquanto a amilose e os lipídios tendem a retardar esses processos (SINGH et al., 2009). Jane et al. (1999) concluíram que a distribuição das ramificações de amilopectina e a forma da amilose produzem um efeito sinérgico na viscosidade da pasta do amido. Amidos de milho ceroso e aqueles com alto teor de amilose apresentam características específicas. A vantagem do amido ceroso tem sido atribuída ao aumento da vida útil de prateleira do pão e à formação de texturas leve, viscosa e glutinosa da pasta. Por sua vez, altos teores de amilose têm funcionalidades que incrementam o valor nutricional do produto.

3.2.1 Amilose

A amilose é uma molécula essencialmente linear formada por unidades de D-glucose ligadas em $\alpha(1\rightarrow4)$ com um pequeno número de ramificações (BULÉON et al., 1998). Seu grau de polimerização é controverso e parece ser dependente do vegetal de origem e do estágio de crescimento (FRENCH, 1984). A Figura 1 ilustra a estrutura da amilose. Embora representada por uma estrutura de cadeia linear, a amilose é, de fato, freqüentemente helicoidal. O interior da hélice contém átomos de hidrogênio, sendo, portanto hidrofóbico, permitindo à amilose formar complexos com ácidos graxos livres, com alguns álcoois e com o iodo. A complexação com o iodo é uma importante ferramenta de diagnóstico para caracterização do amido. Complexos de amilose com gorduras e emulsificantes como mono e di-glicerídeos podem alterar a temperatura de gelatinização do amido, a textura e o perfil de viscosidade da pasta resultante, limitando a retrogradação (MATSUGUMA, 2006).

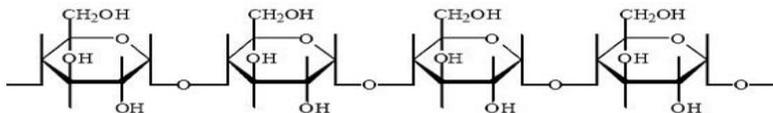


Figura 1- Detalhe da estrutura química da amilose (WHISTLER et al., 1984)

A amilose é um dos componentes responsáveis pela estrutura do grânulo de amido e sua quantificação é de grande importância para se entender o comportamento do amido. Conforme relatado por Hu et al. (2010), a pequena ramificação química na estrutura da amilose contribui para o seu valor nutricional. A amilose é digerida mais lentamente, fornecendo benefícios à saúde humana. Estudos clínicos recentes indicam que a amilose é importante na redução do impacto glicêmico e da insulina nos alimentos (BEHALL; SCHOFIELD, 2005) e em aumentar a capacidade do corpo em metabolizar gorduras, o que ajuda a manter o peso de forma saudável (HIGGINS et al. 2004). Evidências científicas dos benefícios à saúde podem promover a demanda de grãos de alto teor de amilose no mercado futuro, porém o aumento do teor de amilose nos grãos de milho requer melhor entendimento dos mecanismos genéticos e ambientais que controlam o metabolismo deste polissacarídeo (HU et al., 2010).

O teor de amilose tem sido historicamente determinado pelo procedimento de ligação desta macromolécula com o iodo, através dos métodos amperométrico, potenciométrico, ou por espectrofotometria (CHEN; BERGMAN, 2007). Estes métodos se baseiam na propriedade do iodo em formar complexos helicoidais com amilose. No entanto, o iodo também se liga à amilopectina (grau de polimerização, GP>60), o que causa a superestimação do teor de amilose. Adicionalmente, fosfolípidos e ácidos graxos livres competem pelo iodo na formação de complexos com a amilose, o que causa a subestimação dos teores de amilose. Em função disto, o teor de amilose determinado por estes métodos tem sido designado amilose aparente (CHEN; BERGMAN, 2007).

3.2.2 Amilopectina

A amilopectina é uma molécula altamente ramificada, formada por unidades de D-glucose ligadas em $\alpha(1\rightarrow4)$ e com 5% a 6% de ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ nos pontos de ramificação (BULÉON et al., 1998). Possui um GP de 10^4 a 10^5 e peso molecular na ordem de 50 a $500 \cdot 10^6$ (BILIADERIS, 1991). As ramificações da amilopectina apresentam conformação em dupla hélice e o comprimento das cadeias varia de acordo com a origem do amido e a espécie, usualmente com 20 a 30 resíduos de glucose (MARCON et al., 2007). A Figura 2 ilustra a estrutura química da amilopectina.

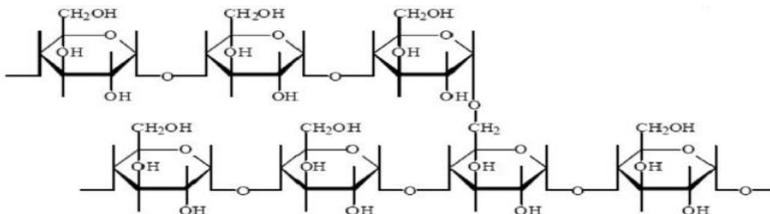


Figura 2- Detalhe da estrutura química da amilopectina (WHISTLER et al., 1984).

De acordo com Xiao-Peng et al. (2010), a amilopectina como componente principal do amido desempenha importante função na formação da estrutura e nas propriedades físico-químicas do grânulo daquele polissacarídeo. A amilopectina também define as distintas qualidades de sabores no milho com teores de amilose similares, sendo que a distribuição das longas cadeias de amilopectina varia grandemente entre os genótipos de milho. O conhecimento atual sobre a estrutura da amilopectina e sua influência nas características físico-químicas do amido tem sido alvo de críticas, devido às discrepâncias entre os métodos de extração e dosagem em diferentes experimentos. Han et al. (2001), usando amilopectinas de GP acima de 100 em cromatografia de gel encontraram correlação negativa entre a quebra da pasta do amido e a massa molecular daquele polissacarídeo. Por sua vez, Cai et al. (2006) detectaram a existência de correlação positiva entre o pico de viscosidade e a quebra da pasta. O teor de amilopectina foi correlacionado

negativamente com a temperatura de gelatinização (VANDEPUTTE et al., 2003a; 2003b; 2003c), enquanto amilopectinas com GP entre 6-7 e 12-22 foram relacionadas com o poder de inchamento e retrogradação (VANDEPUTTE et al., 2003a, 2003b, 2003c; JANE et al., 1999). No entanto, poucos são os estudos neste contexto utilizando amostras de amilopectinas de VMC.

Fredriksson et al. (1998) relatam que em geral o grânulo de amido inchado é mais enriquecido de amilopectina, enquanto a amilose difunde-se ao exterior dos grânulos. Amidos cerosos normalmente tendem a inchar mais do que amidos ricos em amilose (TESTER; MORRISON, 1990a; HERMANSSON; SVEGMARK, 1996). As mudanças que ocorrem no amido durante o armazenamento têm sido atribuídas ao teor de amilopectina, enquanto o comportamento de retrogradação foi relacionado com a amilose (ORFORD et al., 1987).

Raphaelidis e Georgiadis (2006) comentam que o grau de inchamento do grânulo e a quantidade de amilose ou amilopectina lixiviados são governados por inúmeros fatores: quantidade de água disponível, temperatura e tempo de aquecimento e a presença de lipídeos, os quais retardam o inchamento dos grânulos e inibem a lixiviação da amilose do grânulo devido à formação de complexos de inclusão entre amilose e moléculas de lipídios.

O estudo das propriedades reológicas do amido na presença de lipídios apresenta problemas, pois os complexos de inclusão formados tendem a precipitar e o amido retrograda facilmente à temperatura ambiente. Além disto, há limitada publicação sobre os efeitos dos lipídios nas propriedades reológicas do amido e informações conflituosas. No entanto, a elucidação do teor de lipídios em variedades crioulas de milho e o estudo da reologia vêm contribuir ao entendimento do efeito desses componentes sobre as propriedades funcionais do amido, por exemplo.

Singh et al. (2009) relatam que a amilopectina contribui na capacidade de retenção da água, poder de inchamento e características da pasta do amido. A análise de características físico-químicas do amido das VMC é

de interesse por subsidiar a definição de formas de uso otimizado daquela biomassa.

3.2.3 Características desejáveis do amido

A estrutura macromolecular do amido lhe confere propriedades particulares, tais como solubilidade, viscosidade, poder de gelatinização e de adesão. Amidos naturais podem não apresentar propriedades adequadas ao uso industrial, de modo que as empresas de alimentos, cosmética e farmacêutica recorrem, em muitos casos, ao uso de amidos modificados. As razões que levam à modificação, segundo BeMiller (1997), são: modificar as características de cozimento (gelatinização), diminuir a retrogradação, reduzir a tendência das pastas em formarem géis, aumentar a estabilidade das pastas ao resfriamento e congelamento, aumentar a transparência das pastas ou géis, melhorar a formação de filmes, aumentar a adesividade, adicionar grupamentos hidrofóbicos e introduzir poder emulsificante (CEREDA et al., 2002).

Neste contexto, as indústrias de alimentos e os produtores agrícolas estão interessados na identificação e no desenvolvimento de espécies que produzam amidos nativos com características físico-químicas especiais e propriedades semelhantes a dos amidos modificados. Esses amidos poderiam substituir amidos modificados quimicamente, ou ainda abrir novos mercados (KIM et al., 1995). Há várias restrições ao uso de amidos modificados como, por exemplo, proteção à saúde do consumidor e ao ambiente, segurança de trabalho e economia nos custos de produção. A redução do uso de produtos químicos permitiria também a colocação no mercado de um produto mais natural, um aspecto de crescente interesse por parte do consumidor (HOCH, 1997). Nos últimos anos, muitos amidos foram introduzidos para uso alimentar, e.g., o amido do milho ceroso (*waxy corn*) e o com alto teor de amilose (ALEXANDER, 1996). No primeiro caso, o amido apresenta maior estabilidade ao calor, maior viscosidade, com transparência excepcional da pasta e sabor adocicado. Amidos com altos teores de amilose, 45 a 55% de amilose, apresentam baixa viscosidade inicial e produção de gel macio após o resfriamento. De forma similar, amidos de milho com 30 a 35% de

amilose têm sido utilizados especialmente para melhorar a textura da massa de pães e pizzas (CEREDA et al., 2002).

3.2.4 Aplicações industriais do amido

Nas indústrias agroalimentares, os amidos e derivados são utilizados como ingredientes, componentes básicos dos produtos, ou aditivos adicionados em baixas quantidades para melhorar a elaboração, apresentação, ou conservação do produto. Os produtos de hidrólise (xaropes de glucose ou de maltose, maltodextrinas) e de isomerização (iso-glucose ou frutose) são utilizados nas indústrias de balas, chocolates, bolos, pastelarias, geléias e de sobremesas por suas propriedades anti-cristalizante, adoçante e higroscopicidade (CEREDA et al., 2002).

Além do consumo em alimentos, grande quantidade de amido é destinada às indústrias de papel, de colas, de resinas e plásticos, fármacos, detergentes, tintas, agroquímica, de enzimas e têxtil (CEREDA et al., 2002).

3.3 Propriedades do amido

As propriedades do amido envolvem suas características físicas (estrutura, cristalinidade, aparência, condutibilidade térmica e elétrica e atividade ótica); químicas (composição química, teores de amilose, amilopectina e outros constituintes) e funcionais (solubilidade, gelatinização, retrogradação e hidrólise) (CEREDA et al., 2002).

Segundo Mestres (1996), as propriedades funcionais e nutricionais do amido são, em grande parte, devidas ao estado físico do alimento que muda durante o preparo do mesmo. Com a cocção, o amido nativo passa a uma pasta e depois com o resfriamento e armazenamento a um gel, conforme demonstrado na Figura 3.

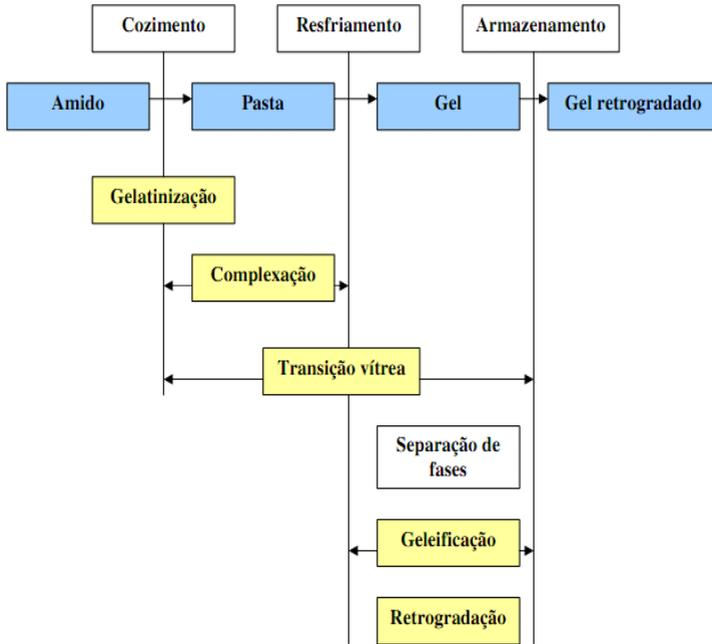


Figura 3- Estados físicos do amido durante a cocção, resfriamento e armazenamento. Adaptado de Mestres (1996) e Cereda et al. (2002).

3.3.1 Solubilidade

O amido puro tem coloração branca, é insípido e, se adicionado à água fria e mantido sob agitação, forma uma suspensão de aspecto leitoso, separando-se após repouso. Embora uma pequena fração seja solubilizada quando agitado em água, este polissacarídeo é considerado praticamente insolúvel. Baseado nesta característica pode-se obter, em escala industrial, o amido purificado (CEREDA et al., 2002).

3.3.2 Capacidade de ligação dos grânulos de amido à água

As moléculas de água intimamente adsorvidas às macromoléculas são denominadas "água ligada" e refletem a habilidade de uma superfície molecular em formar ligações fracas, não-covalentes, com a água (RICKARD et al., 1991). O teor de "água ligada" aos grânulos de amido influencia as características de expansão destes, sendo que altas taxas de ligação resultam da perda de associação dos polímeros no grânulo nativo (SONI et al., 1985). Considera-se que os sítios de ligação de água são os grupos hidroxila e seus átomos de oxigênio no ambiente interno da molécula de glucose (WOOTTON; BAMUNUARACHCHI, 1978). A formação de um grande número de ligações de hidrogênio entre as moléculas determina uma redução nas superfícies disponíveis para tais ligações com as moléculas de água.

3.3.3 Poder de inchamento e índice de solubilidade

Os grânulos de amido nativos, nas suas diferentes percentagens de amilose e amilopectina, tamanho e compactação dos grânulos, apresentam poder de inchamento característico. Os grânulos de amido, quando submetidos ao aquecimento com excesso de água (>60%) sofrem hidratação e expansão (AMANTE, 1986) causando uma transição irreversível (gelatinização) pela perda da birrefringência (perda da cruz de malta) e pelo desaparecimento da cristalinidade (ZAVAREZE et al., 2009). Durante a gelatinização, a estrutura cristalina do amido é rompida devido ao relaxamento de ligações de hidrogênio e as moléculas de água interagem com os grupos hidroxilas da amilose e amilopectina, causando um aumento de tamanho dos grânulos e solubilização parcial do amido (ZAVAREZE et al., 2009). Como consequência da entrada e retenção da água, ocorre a substituição das ligações de hidrogênio existentes entre amilose/amilose, amilose/amilopectina e amilopectina/amilopectina por ligações amilopectina/água/amilopectina e, em menores proporções, amilose/água/amilopectina e amilose/água/amilose. Com a adsorção de água, grande parte da amilose é liberada dos grânulos, contribuindo para o índice de solubilidade. A solubilização da amilose é função da conformação do grânulo e do envolvimento desta com as regiões amorfas, constituídas principalmente por amilopectina. A determinação

do poder de inchamento e do índice de solubilidade contribui para estimar o tipo de organização dos grânulos de amido (MARCON et al., 2007).

Segundo Ratnayake e Jackson (2006), a absorção de água pelos grânulos de amido nas regiões amorfas desestabiliza sua estrutura cristalina, resultando na perda da birrefringência, que é uma das definições de gelatinização. Sob aquecimento contínuo, os grânulos incham mais, levando à perda da estrutura cristalina, o que pode causar a completa separação da amilose e amilopectina. Tester e Morrison (1990) reportaram que o inchamento do amido é primariamente uma propriedade da amilopectina, porque amidos cerosos usualmente incham mais, comparativamente a amidos com baixo teor daquele polissacarídeo. Por sua vez, Gomand et al. (2010) relatam que durante o inchamento a amilose atua como diluente. De fato, amidos ricos em amilose mostram inchamento e solubilidade restritos, mesmo após um período prolongado de aquecimento (LEACH et al., 1959).

3.3.4 Gelatinização

A gelatinização é um processo de absorção de energia durante o aquecimento de suspensões de amido-água e pode ser caracterizada por uma endoterma obtida através de calorimetria diferencial de varredura. A perda da birrefringência é observada com microscópio de luz polarizada (perda da cruz de malta) e o desaparecimento da cristalinidade evidenciada pela difração de raios X (WHISTLER; BEMILLER, 1997).

Segundo Whistler e BeMiller (1997), a gelatinização e a formação da pasta ocorrem porque, com o aumento da temperatura da suspensão amido/água, as moléculas constituintes do grânulo daquele polissacarídeo vibram e giram violentamente, fazendo com que as ligações de hidrogênio intermoleculares sejam quebradas e substituídas com moléculas de água, o que produz uma hidratação extensiva. O efeito de mobilidade é percebido primeiramente nas regiões amorfas, as quais estão em estado vítreo, não cristalino. Quando os grânulos aquecidos na presença de até 60% de água, que é plasticizante para o amido, alcançam a sua temperatura de transição vítrea, as regiões amorfas plasticizadas

sofrem uma transição de fase, passando do estado vítreo para o estado pastoso.

Com o inchamento do grânulo durante o aquecimento, observa-se a perda da birrefringência ou da cristalinidade e o aumento da transparência da pasta. De forma contrária, no resfriamento deste a opacidade e a firmeza da pasta tendem a aumentar em alguma extensão, consoante à origem do amido (MARCON et al., 2007). Além disto, a transparência da pasta é afetada pelo conteúdo de amilose, sendo que teores elevados daquela macromolécula geram pastas mais opacas. Por fim, o pH, a presença de sais e os procedimentos de solubilização do amido também afetam a transparência da pasta.

Informações sobre a temperatura de formação da pasta, resistência à ação mecânica dos grânulos hidratados, viscosidade máxima e temperatura na qual se detecta o efeito do resfriamento sobre a viscosidade são extraídas a partir de curvas de viscosidade, obtidas em viscoamilografo (AMANTE, 1986). O conhecimento destas características irá melhorar a funcionalidade e aplicação dos amidos das VMC.

Por fim, a gelatinização, o poder de inchamento e o índice de solubilidade revelam o grau de ligações associativas dos grânulos de amido (AMANTE, 1986). O amido de cereais é mais consistente, pouco viscoso e de coloração mais opaca, enquanto amidos de tubérculos formam géis mais fracos, pouco consistentes, porém mais viscosos e transparentes (MARCON et al., 2007). Vários estudos têm demonstrado que variações genéticas, condições climáticas e de solo e época de colheita afetam as propriedades do amido, e.g., forma e tamanho dos grânulos, propriedades físicas (viscosidade e retrogradação) e químicas (teor de amilose e fósforo) (FRANCO et al., 2001). A caracterização das VMC no contexto em foco subsidiará as aplicações de suas matérias-primas de forma otimizada, valorizando aquele genoplasm.

3.3.5 Retrogradação

Durante o armazenamento das pastas amiláceas, as moléculas gelatinizadas do polímero começam a se reassociar, fazendo com que ocorra a formação de cristais, o que favorece uma estrutura mais ordenada (ATWELL et al., 1998). Com o resfriamento do gel, as cadeias de amido perdem energia e as ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila das moléculas de amilose adjacentes tornam-se mais fortes, proporcionando firmeza ao gel e aumento da opacidade (AMANTE, 1986). Esse processo de cristalização das cadeias de amido recebe o nome de retrogradação.

A retrogradação da amilose ocorre em três estágios, iniciando com estiramento da α -hélice por quebra das ligações intramoleculares. Em seguida, ocorre a ruptura das ligações com água e a reorientação das moléculas com formação de ligações de hidrogênio entre moléculas adjacentes. Nesse processo, ocorre o fenômeno chamado de sinérese que corresponde à expulsão da água para fora do gel (AMANTE, 1986).

Ishiguro et al. (2000) afirmam que a retrogradação está relacionada com o teor de amilose e a distribuição do tamanho de suas cadeias, ocorrendo preferencialmente na fração amilósica com *ca.* 100 unidades de glucose (JANE, 1995) e nas cadeias mais longas de amilopectina. Por sua vez, Amante (1986) comenta que a retrogradação depende da massa molecular dos polímeros envolvidos, sendo maior em cadeias de tamanho médio e grande (>100 unidades de glucose), uma vez que polímeros de menor massa molecular desenvolvem movimento browniano, impedindo a formação de associações de maior estabilidade. Adicionalmente, fatores como o pH, temperatura e o teor de fosfolipídeos também afetam a retrogradação (AMANTE, 1986), com a redução desta propriedade funcional do amido quando este apresenta altos teores de fosfolipídeos (LIN; CZUCHAJOWSKA, 1998).

3.3.6 Viscosidade

A transição de uma suspensão de amido em água para pasta, sob aquecimento, é acompanhada pelo aumento de viscosidade (CEREDA, 2002). A viscosidade está relacionada com características estruturais do amido e, portanto, a fatores como origem botânica, teor de amilose, fosfolipídeos, lipídeos, proteínas, fibras, estrutura cristalina, tamanho dos grânulos, arquitetura granular, presença de cátions metálicos e enzimas podem afetar a viscosidade da pasta de amido. A viscosidade de pastas de amido parece ser determinada por dois fatores: o grau de inchamento dos grânulos e a resistência desses grânulos à dissolução pelo calor, ou fragmentação pela agitação mecânica. Amidos ricos em amilose apresentam grânulos com inchamento limitado, decorrente da rigidez interna das moléculas fortemente associadas, não expandindo o suficiente para formar pastas viscosas quando cozidos em água sob condições normais (SCHOCH; MAYWALD, 1986).

3.3.7 Sinérese

A liberação de água ou sinérese, que ocorre em consequência da retrogradação é uma propriedade indesejável, principalmente para produtos prontos como pudins, por exemplo, os quais são congelados e descongelados. A sinérese, retrogradação e mudanças de textura da pasta após congelamento e descongelamento são reportadas como negativas à qualidade do produto (LEE et al., 2002; MATSUGUMA, 2006). Portanto, amidos das VMC com baixa sinérese podem ser úteis à produção de derivados que necessariamente passam por ciclos de armazenamento com congelamento e descongelamento.

3.3.8 Perfil reológico do amido

A reologia tem sido definida como o estudo da deformação dos objetos sob a influência de forças aplicadas a eles (LEWIS, 1993). As características reológicas das pastas ou géis de amido dependem, dentre outros fatores, da configuração e do poder de intumescimento dos grânulos, teor de amilose lixiviado durante o rompimento do grânulo e da interação entre os componentes da pasta (NAVARRO et al., 1996).

Pela variação das condições de gelatinização do amido, uma ampla faixa de microestruturas pode ser produzida, a qual determina as propriedades reológicas dos sistemas. O grânulo de amido é o principal elemento estrutural que contribui para as diferenças nas propriedades reológicas devido aos seus distintos estados de intumescimento, desintegração, acúmulo de cadeias de amilose e amilopectina no espaço intergranular (CONDE-PETIT et al., 1988). Amilose e amilopectina contribuem diferencialmente no comportamento reológico do grânulo de amido, estando a amilose associada às alterações de curto prazo, enquanto a amilopectina é responsável pelo aumento, em longo prazo, da rigidez das pastas (NAVARO et al., 1996). De fato, quanto maior o número de cadeias longas da amilopectina, maior será a dureza do gel e da pasta (LIN et al., 2002).

3.4 Teor de proteínas

O milho é largamente empregado na alimentação humana e animal como fonte energética, devido ao seu alto conteúdo em amido, disponível de forma facilmente digerível e de baixo custo. No entanto, em termos de fonte protéica este cereal deixa a desejar, pois além de possuir baixos teores médios (cerca de 10%), sua proteína é de baixa qualidade biológica, principalmente em relação aos aminoácidos essenciais (OLIVEIRA et al., 2004). Pequenas variações nos conteúdos protéicos têm sido observadas em amostras de grãos de milho, em função da fertilidade do solo, condições climáticas e sistemas de manejo (OLIVEIRA et al., 2004). Além disto, a composição química do grão de milho é variável nas diferentes partes do grão (Figura 4), com maiores concentrações protéicas no endosperma (74%) e gérmen (26%) (CAPOBIANGO, 2006).

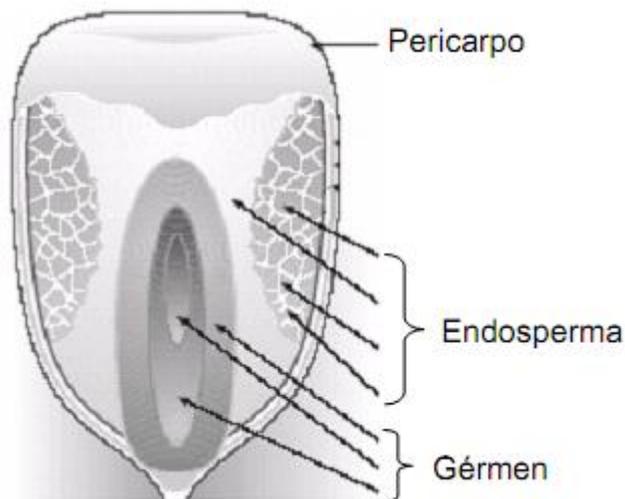


Figura 4- Representação esquemática do grão de milho, evidenciando seus principais componentes estruturais (CAPOBIANGO, 2006).

As proteínas do milho podem ser agrupadas de acordo com suas solubilidades, a saber: albuminas (solúveis em água); globulinas (solúveis em solução salina); prolaminas (solúveis em solução alcoólica forte) e glutelinas (solúveis em meio alcalino) (KUHLEN, 2007). A fração prolamínica (α -zeína) é a de maior concentração em milhos, representando 50% a 60% do total de proteínas (OLIVEIRA et al., 2004). De acordo com Capobiango (2006), as frações prolamina e glutelina compõem 85 a 90% das proteínas do milho. A Tabela 1 demonstra o conteúdo percentual e a solubilidade das frações protéicas das diferentes partes constituintes do grão de milho.

Tabela 1- Distribuição relativa (% de base seca) e solubilidade das frações protéicas em grãos de milho, consoante ao tecido de ocorrência (CAPOBIANGO, 2006).

Proteína	Solubilidade	Grão inteiro	Endosperma	Gérmen
Albumina	água	8	4	30
Globulina	sal	9	4	30
Glutelinas	álcali	40	39	25
Zeína	álcool	39	47	5

É sabido que os conteúdos das frações proteicas do grão de milho não são constantes e variam de acordo com o tipo de grão, podendo ser alteradas por genes mutantes. São conhecidos vários genes que determinam esta característica, sendo o gene *opaco-2* o mais conhecido, induzindo uma diminuição significativa na síntese de α -zeína e o aumento das frações de β -zeína (OLIVEIRA et al., 2004). Isto constitui uma vantagem do ponto de vista nutricional, uma vez que a α -zeína é de menor disponibilidade em relação à β -zeína. Deste modo, disponibiliza mais prontamente os aminoácidos essenciais lisina e triptofano, normalmente em baixas concentrações em grãos daquele cereal, conferindo-lhes maior valor biológico (OLIVEIRA et al., 2004).

No Brasil, programas de melhoramento genético de milho visando o aumento do teor e qualidades protéicas são relativamente recentes. O conhecimento do teor de proteínas em variedades locais de milho merece destaque no setor agrícola, levando-se em conta a posição que ocupa a cultura na dieta.

3.5 Teor de lipídeos

De acordo com Cereda et al. (2002), o amido de milho nativo, com umidade na faixa de 10-12%, apresenta cerca de 0,7% de lipídios. As primeiras variedades daquele cereal ricas em óleos foram desenvolvidas em 1986 e híbridos contendo lipídeos entre 6-8% já estão disponíveis no

mercado. O uso destas variedades ricas em lipídeos reside majoritariamente na alimentação animal, devido a sua alta energia metabolizável na alimentação (HOJILLA-EVANGELISTA; JOHNSON, 2003). A Tabela 2 resume a composição de lipídeos no grão de milho, evidenciando os teores proeminentes destes metabólitos nos tecidos do embrião.

Tabela 2- Composição centesimal do endosperma, embrião, pericarpo, ponta e do grão inteiro de *Zea mays* L.(CAPOBIANGO, 2006).

Fração	Grão (%)	Amido (%)	Proteína (%)	Lipídeos (%)
Grão inteiro		71,5	10,3	4,8
Endosperma	82,3	86,4	9,4	0,8
Embrião	11,5	8,2	18,8	34,5
Pericarpo	5,3	7,3	3,7	1,0
Ponta	0,8	5,3	9,1	3,8

Os lipídeos são biomoléculas hidrofóbicas essenciais para a manutenção de várias estruturas dos seres vivos e atuam em diversos processos metabólicos. Possuem alta solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água. Encontram-se distribuídos em todos tecidos principalmente nas membranas celulares e nas células de gorduras (QMCWEB, 2011).

Existem diversos tipos de moléculas diferentes que pertencem à classe dos lipídios. Embora não apresentem nenhuma característica estrutural comum, todas elas possuem muito mais ligações carbono-hidrogênio do que as outras biomoléculas, e a grande maioria possui poucos heteroátomos. Isto faz com que estas moléculas sejam pobres em dipolos localizados (carbono e hidrogênio possuem eletronegatividade semelhante). Uma das leis clássicas da química diz que "*o semelhante*

dissolve o semelhante": daí a razão para estas moléculas serem fracamente solúveis em água ou etanol (solventes polares) e altamente solúveis em solventes orgânicos (geralmente apolares) (QMCWEB, 2011).

Ao contrário das demais biomoléculas, os lipídios não são polímeros, isto é, não são repetições de uma unidade básica. Embora possam apresentar uma estrutura química relativamente simples, as funções dos lipídios são complexas e diversas, atuando em muitas etapas cruciais do metabolismo e na definição das estruturas celulares (QMCWEB, 2011).

Os lipídeos podem ser classificados em ácidos graxos (grupo mais abundante de lipídeos nos seres vivos) derivados de ácidos carboxílicos ou da hidrólise de triacilglicerídeos. Este grupo é geralmente chamado de lipídios saponificáveis, porque a reação destes com uma solução quente de hidróxido de sódio produz o correspondente sal sódico do ácido carboxílico, isto é, o sabão (Figura 5) (QMCWEB, 2011).

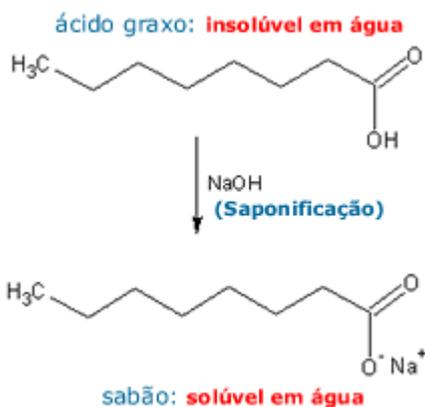


Figura 5-Reação de saponificação dos ácidos graxos e formação de sabão (QMCWEB, 2011).

Os ácidos graxos também podem ser classificados como **saturados** ou **insaturados** (Figura 6), dependendo da ausência ou presença de ligações duplas carbono-carbono. Os insaturados (que contém tais ligações) são facilmente convertidos em saturados através da hidrogenação catalítica (este processo é chamado de redução). Os insaturados costumam ser divididos em monoinsaturados (uma ligação dupla), poliinsaturados (muitas ligações duplas) e eicosanóides (incluem as prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina e tromboxanos). A presença de insaturação nas cadeias de ácido carboxílico dificulta a interação intermolecular, fazendo com que, em geral, estes se apresentem, à temperatura ambiente, no estado líquido; já os saturados, com uma maior facilidade de empacotamento intermolecular, são sólidos. A margarina, por exemplo, é obtida através da hidrogenação de um líquido - o óleo de milho ou de soja, que é rico em ácidos graxos insaturados (QUIMICA10, 2011).

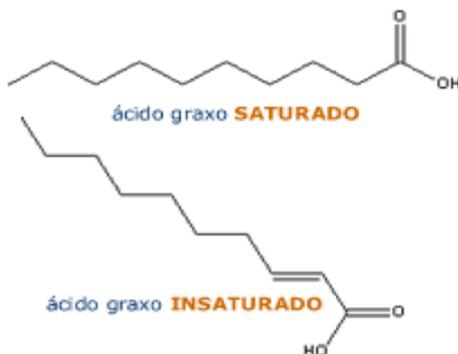


Figura 6-Representação estrutural de ácidos graxos saturados e insaturados (QUIMICA10, 2011).

Exemplos de ácidos graxos saturados podem ser: ácido láurico (C 12:0); ácido palmítico (C16:0); ácido esteárico (C18:0) e de ácidos graxos insaturados podem ser: ácido oléico C18:1 (uma ligação dupla); ácido linoléico C18:2 (duas ligações duplas); ácido linolênico C18:3 (três ligações duplas) e ácido araquidônico C20:4 (quatro ligações duplas) (QUIMICA10, 2011). A Figura 7 mostra alguns exemplos da predominância de ácidos graxos em óleo de milho, côco, sebo bovino e na manteiga.

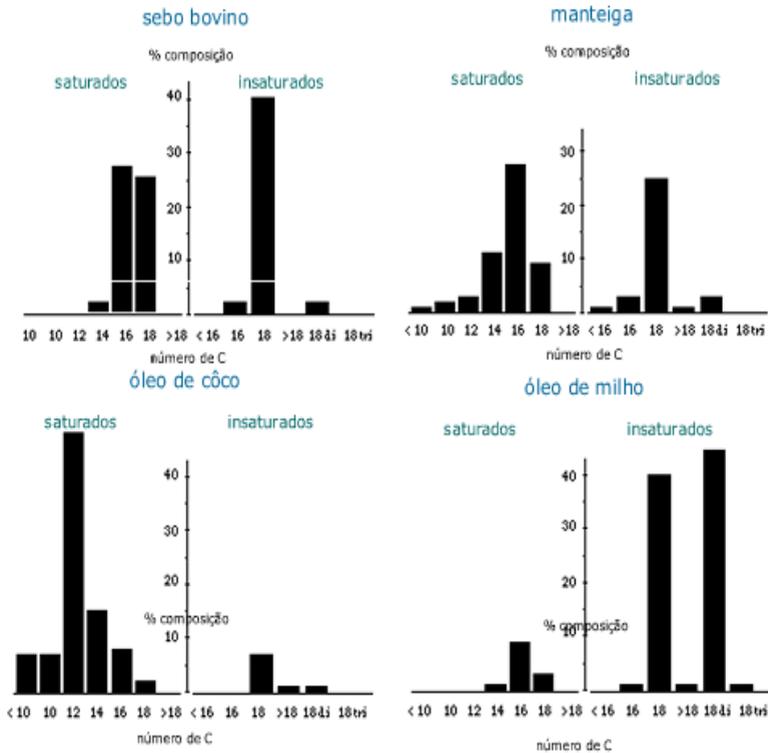


Figura 7- Exemplos ilustrando a predominância de ácidos graxos em Sebo bovino, manteiga, óleo de côco e de milho (QMCWEB, 2011).

Para além do grupo mencionado anteriormente, os lipídeos também podem ser classificados em triacilglicerídeos (gorduras neutras- são ésteres do glicerol) podendo ser chamadas de gorduras (caso se encontrem no estado sólido a temperatura ambiente) ou óleos (líquido); fosfolipídeos (ésteres do glicerofosfato-derivado fosfórico do glicerol-são anfífilos); esfingolipídeos (derivados de amino álcool); os esteróides (lipídeos derivados do colesterol) e prostaglandinas. Estes lipídios (prostaglandinas) não desempenham funções estruturais, mas são importantes componentes em vários processos metabólicos e de comunicação intercelular. Segundo o químico Michael W. Davidson, da

Florida State University, "*prostaglandins act in a manner similar to that of hormones, by stimulating target cells into action. However, they differ from hormones they act locally, near their site of synthesis, and they are metabolized very rapidly. Another unusual feature is that the same prostaglandins act differently in different tissues*". Um dos processos mais importantes controlados pelas prostaglandinas é a inflamação (QUIMICA10, 2011).

3.6 Espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia do infravermelho é um dos métodos clássicos para a determinação da estrutura molecular de compostos, sendo bastante sensível à composição química e à arquitetura das moléculas. O grande conteúdo de informação adquirida pode se aplicar também para sistemas biológicos como, por exemplo, na definição de perfis metabólicos (BARTH, 2007). Esta técnica possui muitas vantagens, sendo aplicada a compostos de alto e baixo peso molecular, requerendo um tempo de análise reduzido, pouca quantidade de amostra (10-100 µg) e custo relativo baixo.

Forrest e Cove (1992) afirmaram que a espectroscopia de FT-IR tem sido sugerida para amidos como uma técnica adequada para estimar o grau de substituição decorrente de diversos métodos de modificação daquele polímero natural. Demiate et al. (2000), Domaltova et al. (1998), Dupuy et al. (1997) relataram o uso da FT-IR como forma de obter a separação entre as classes dos amidos. Essa técnica tem se mostrado útil, sobretudo em indicar alterações na rede cristalina, permitindo uma separação rápida dos amidos nativos e modificados.

O perfil de bandas espectrais de FT-IR revela características de componentes químicos individuais da amostra, gerando informações a respeito dos metabólitos primários e secundários que a constituem, possibilitando a discriminação de espécies vegetais, assim como tipos químicos dentro de uma mesma espécie (SCHULZ; BARANSKA, 2007). Neste sentido, a combinação da FT-IR com técnicas estatísticas multivariadas constitui-se em uma ferramenta de fácil e rápida análise de

caracterização quimiotaxonômica. Mais recentemente, contudo, esta abordagem vem ganhando espaço nas indústrias de processamento de alimentos e bebidas, permitindo de forma rápida e segura diagnosticar a qualidade da matéria-prima e/ou de produtos derivados, autenticar alimentos e seus ingredientes (DOWNEY, 1998) e determinar o teor de compostos de interesse, i.e., carotenóides em genótipos de milho (BERARDO et al., 2004).

De fato, a espectroscopia de infravermelho médio, aliada a técnicas quimiométricas (PCAs), constitui uma importante ferramenta à discriminação da composição química do milho, incluindo a rápida autenticação de genótipos crioulos daquele cereal (KUHNNEN et al., 2010). Estes autores comentam que a combinação desta abordagem experimental com a ressonância magnética nuclear uni e bidimensional (1D- e 2D-RMN) permite a análise metabolômica de tecidos/órgãos vegetais, definindo seus fenótipos bioquímicos e a discriminação de matrizes complexas (extratos vegetais) de acordo com suas peculiaridades de composição química.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção de sementes de milho crioulo

Sementes de variedades de milho crioulo foram adquiridas no município de Anchieta, extremo oeste de Santa Catarina, Brasil (2010- Geração F0). Amostras deste material foram semeadas em área da Fazenda da Ressacada (CCA), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), para obtenção da geração F1. Oito variedades de milho crioulo foram estudadas, a saber: Língua de Papagaio (LP), Mato Grosso Palha Roxa (MG), Roxo (RX), Roxo do Emilio (RXE), Palha Roxa (PR), Rajado (RJ), Rajado 8 Carreiras (R8C) e MPA1. Para efeitos de comparação, duas variedades híbridas de milho (Fortuna e BR SC 154), fornecidas pela EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina) e recomendadas ao plantio em Santa Catarina, foram também estudadas.

4.2 Desenho experimental do ensaio de campo

A condução do ensaio no campo experimental seguiu o delineamento completamente casualizado (DCC). A análise e correção do solo foram feitas previamente ao plantio (Junho, 2009) de nabo forrageiro, uma espécie enriquecedora de nitrogênio ao solo. A semeadura do milho ocorreu em Agosto de 2009, utilizando-se 2 a 3 sementes/cova, em área de 40 x 30 m². Cada variedade foi semeada em 2 linhas consecutivas, constituindo um tratamento. No total, 16 linhas foram semeadas, num espaçamento de 25cm por planta e 1m entre linhas. O controle de ervas daninhas foi feito manualmente, assim como o combate das lagartas do cartucho de milho (adição de água no cartucho foliar). A colheita dos grãos de milho ocorreu em fevereiro de 2010, sendo o milho seco em estufa (60°C, peso constante) e armazenado a temperatura ambiente, em sacos de polietileno.

4.3 Material analisado

O estudo teve como material amostral os grãos de milho. Nas análises histoquímicas foram usados grãos integrais de milho, enquanto para os estudos físico-químicos e espectroscópicos os grãos de milho foram

triturados em moinho laboratorial de facas (MB Braeski C.Q) para obtenção de granulometria fina (farinha), seguido de secagem em estufa (60°C, peso constante) e armazenamento em sacos de polietileno até posterior análise.

4.4 Análises histoquímicas

As 18 amostras dos genótipos em estudo (geração F0, F1 e híbridas) foram processadas para análises histoquímicas e morfológicas em microscopia de luz seguindo os procedimentos:

4.4.1 Fixação

As amostras de grãos de milho foram fixadas em solução de paraformaldeído 2,5 %, em tampão fosfato (0,2M, pH 7,2), durante 6 a 8 h, a 4° C. Após a fixação, o material foi lavado em tampão fosfato (2x), por 10 minutos (BOUZON, 1993).

4.4.2 Desidratação

A desidratação das amostras foi feita em uma série de soluções aquosas de etanol em concentrações crescentes (v/v, 30%, 50%, 70%, 90% e duas vezes em 100%), com duas trocas de 15 minutos em cada concentração, à temperatura ambiente (SCHMIDT, 2009).

4.4.3 Pré-infiltração e infiltração

A pré-infiltração das amostras foi realizada com uma mistura de 1: 1 de etanol absoluto e historesina glicolmetacrilato (GMA), durante 4 h. Posteriormente, o material foi infiltrado em resina pura por 24 horas (SCHMIDT, 2009).

4.4.4 Inclusão

A inclusão foi realizada na mesma resina em histomoldes, com adição de polimerizador, à temperatura ambiente, por 2-3 h (SCHMIDT, 2009).

4.4.5 Preparo das secções

As amostras foram seccionadas em micrótomo manual de parafina modelo Leica RM 2135, equipado com navalhas de tungstênio. As secções com espessura de 5µm foram distendidas em placa de Petri com água à temperatura ambiente, coletados com lâminas de vidro, ou coletados nas lâminas sobre gotas de água destilada e secas a 37°C, em placa quente, por 30 minutos.

4.5 Microscopia ótica

Os materiais foram visualizados e fotografados em microscópio Olympus (modelo BX41), equipado com sistema de captura de imagem digital (Olympus QColor-3C, Q-imaging, 3.3 Mpixel). Os materiais foram submetidos aos seguintes testes histoquímicos:

4.5.1 Azul de Toluidina (AT-O)

Este corante foi utilizado para identificar polissacarídeos ácidos (contendo agrupamentos carboxila, fosfato ou ésteres sulfúricos), através da reação de metacromasia. As lâminas contendo as secções foram tratadas com solução aquosa de AT-O 0,5%, acidificada com HCl 1N, pH 3,0, por 30 segundos, lavadas em água destilada e secas ao ar (Schmidt, 2009). As lâminas foram montadas com bálsamo de Canadá.

4.5.2 Ácido periódico de Schiff (PAS)

Foi utilizado para identificar a presença de polissacarídeos neutros (amido e celulose). As secções foram oxidadas com solução aquosa de ácido periódico a 1%, durante 30 minutos, lavadas em água corrente e coradas com o reativo de Schiff por 30 minutos. Subsequentemente, foram lavadas em água corrente, secas ao ar e montadas com bálsamo de Canadá. Como controle da reação de PAS, os polissacarídeos das amostras foram acetilados, via tratamento dos cortes histológicos com piridina pura e solução de piridina: anidrido acético (60: 40, v/v), ou omitindo a oxidação pelo ácido periódico e submetendo-as à coloração descrita (SCHMIDT, 2009).

4.5.3 Azul brilhante de Coomassie (CBB)

Este teste foi utilizado para identificar a presença de proteínas. As lâminas contendo as secções (4µm) foram coradas por 24 h em CBB 0,02%, diluído em solução etanólica acidificada de Clark. Posteriormente, foram lavadas na mesma solução, seguido de enxágüe em água destilada e secagem ao ar, em temperatura ambiente (SCHMIDT, 2009). Para controle, as lâminas contendo as secções foram incubadas a 37°C em solução contendo inibidor de proteases (tiosemicarbazida de prata – 1%) e coradas conforme descrito. As lâminas foram montadas com bálsamo de Canadá.

4.6 Caracterização físico-química, espectroscópica e térmica da pasta das farinhas e de amidos das variedades crioulas de *Zea mays* L.

4.6.1 Teor de umidade

O teor de umidade das amostras foi determinado segundo método da *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC, 1994). Cadinhos de porcelana foram mantidos à 105⁰C, durante 2 horas, resfriados em dissegador e pesados. Cerca de 3g de amostra foram transferidos aos cadinhos e secos em estufa, por 8 horas, à 105⁰C (peso constante). A umidade foi determinada por diferença de massas, conforme a equação 1.

$$\left[U(\%) = \frac{Ca - Cv}{a} \times 100 \right] \text{ (Equação 1)}$$

Onde: U -umidade em (%); Ca - massa do cadinho com amostra; Cv - massa do cadinho vazio; a - massa da amostra.

4.6.2 Preparo das farinhas

Amostras de grãos das variedades em estudo foram selecionadas e trituradas em moinho laboratorial de facas (MB Braeski C.Q), gerando uma farinha com cerca de 0,5mm de diâmetro médio de partículas.

7.6.3 Poder de inchamento e índice de solubilidade das farinhas de milho

A determinação do poder de inchamento e solubilidade utilizou o método de Leach, McCowen e Schoch (1959), com modificações descritas por Marcon et al., (2007); Adebooye e Singh, (2008) e Aryee et al. (2006). Amostras (*ca.* 500mg) foram transferidas a tubos de centrifuga graduados (50 mL) e 40 mL de água destilada-deionizada foram adicionados. A suspensão foi agitada (Vórtex) e aquecida a 95^oC, em banho-maria, por 30min, com agitação constante. As amostras foram resfriadas e centrifugadas (2500rpm, 20min). 10 mL do sobrenadante foram pipetados para placas de Petri de peso conhecido e levado a estufa (60^oC, 12 horas) para evaporação e posterior uso na determinação do índice de solubilidade. O gel formado (precipitado) foi pesado e o índice de solubilidade e poder de inchamento foram estimados usando as equações 2 e 3.

$$\left[SI(\%) = \frac{Wr \times Ww}{(Ws \times 10)} \times 100 \right] \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: SI - índice de solubilidade (%); Wr - peso do resíduo seco; Ww - peso da água; Ws - peso da amostra.

$$\left[SP(\%) = \frac{Wg}{Wm} \times 100 \right] \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: SP - poder de inchamento (%); Wg - peso do gel; Wm - peso da amostra com umidade corrigida.

4.6.4 Capacidade de retenção de água

A capacidade de retenção de água (WBC) das farinhas de milho em estudo foi determinada pelo método de Yamazaki (1953), modificado por Medcalf e Gilles (1965). Uma suspensão aquosa foi obtida dissolvendo-se 500mg de farinha em 10 mL de água destilada-deionizada. A

suspensão foi agitada por 30 minutos e centrifugada (3000 rpm, 10 min). O sobrenadante foi descartado, a farinha úmida drenada por 10 minutos e depois pesada. A capacidade de retenção de água foi estimada conforme descrito previamente (SEABRA et al., 2002), utilizando-se a equação 4.

$$\left[WBC (\%) = 1 - \frac{(D_w - W_w)}{(T_w)} \times 100 \right] \quad (\text{Equação 4})$$

Onde: WBC - capacidade de retenção de água (%); D_w - massa seca; W_w - massa úmida; T_w - total de água adicionada

4.7 Isolamento da amilose

Para isolamento da amilose a partir das amostras de amido foram testadas três metodologias. Posteriormente, considerando os valores de rendimento de isolamento, a facilidade de execução e a manipulação de menor impacto ecológico e à saúde do operador elegeu-se o método preferencial para manipulação e análise da totalidade das amostras (item 4.7.3).

4.7.1 Método de Mua e Jackson (1995) - Método de precipitação com *n*-butanol

A amilose foi isolada da fração amídica utilizando-se solução de *n*-butanol a 10%. Uma suspensão de amido (4%, p/v) foi preparada e aquecida a 45°C, durante uma hora e com agitação suave. Após a dispersão, a suspensão foi centrifugada (3000 rpm), por 20 minutos. Para precipitar a amilose, *n*-butanol (num volume igual a um terço do volume do sobrenadante) foi adicionado à mistura, seguido de agitação e incubação (2h) desta à temperatura ambiente. O meio de reação foi centrifugado (3000 rpm, 20 min), coletando-se o precipitado (amilose). O resíduo obtido da primeira centrifugação foi ressuspenso em metanol e centrifugado para a obtenção de amilopectina. Ambas as frações de amilose e amilopectina foram secas em estufa de ar forçado a 45°C, atê peso constante.

4.7.2 Método de Kim e Willett (2004) - Método de separação de fases

Amostra de amido (15g) foi adicionada de 15 mL de água destilada, 50 mL de NaOH 1N, seguido de agitação por 5 minutos e neutralização (HCl 3N) a pH neutro. Água destilada-deionizada foi adicionada para perfazer 100 mL de solução, a qual foi agitada (1 min – Vórtex) e incubada à temperatura ambiente por 24 h. O ar dissolvido na suspensão foi removido com o auxílio de uma bomba de vácuo, resultando em uma suspensão bifásica, sendo a superior rica em amilose e a inferior constituída majoritariamente por amilopectina.

4.7.3 Método de Williams et al. (1970)

Cerca de 25g de amido foram transferidos a um béquer e adicionados de 25 mL de água destilada-deionizada fria. Posteriormente, sob agitação manual e lentamente adicionou-se água destilada-deionizada a 80^oC ao meio de reação, até o volume total de 150 mL, seguido de incubação por 5 minutos. À pasta de amido homogênea obtida, 1 litro de água (60^oC) foi adicionado, sob lenta agitação em banho-maria (60^oC), por 4 horas. Neste processo, extrai-se a amilose dos grânulos de amido, sendo a suspensão remanescente resfriada e centrifugada (3000 rpm, 20 min), recuperando-se o precipitado (amilopectina bruta) e o sobrenadante (amilose solúvel). O precipitado foi adicionado de etanol absoluto (25% do volume do sedimento), disperso em fina camada fina sobre vidro de relógio e seco em dessecador com sílica gel. O sobrenadante foi adicionado de metanol p.a. (20% do volume), filtrado sob vácuo em suporte de celulose, decantado (4 h) e centrifugado (3000 rpm, 20 min). O precipitado recolhido foi adicionado de etanol 95% (3V) e filtrado (papel de filtro Whatman), seguido da coleta e secagem do filtrado sobre vidro de relógio, em dessecador a temperatura ambiente.

4.8 Teor de amilose

O conteúdo de amilose no amido extraído no item 4.7.3 foi determinado usando o método de Williams, Kuzina e Hlynka (1970). Cerca de 20mg de amostras de amido foram tomados e 10 mL de solução de KOH 0,5N foram adicionados, seguido de agitação. A amostra dispersa foi transferida para frasco volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com água destilada-deionizada. Uma alíquota (10 mL) desta solução teste foi transferida para um frasco volumétrico de 50 mL, adicionando-se 5 mL de HCl 0,1N e 0,5 mL de reagente iodo. O volume da solução foi completado para 50 mL e a absorbância (625 nm) lida em espectrofotômetro (Gold Spectrum lab 53). A determinação do teor de amilose foi feita usando curva-padrão externa, com uma solução de amilose e amilopectina nas proporções (0:18; 2:16; 4:14; 6:12 e 8:10 - Figura 5).

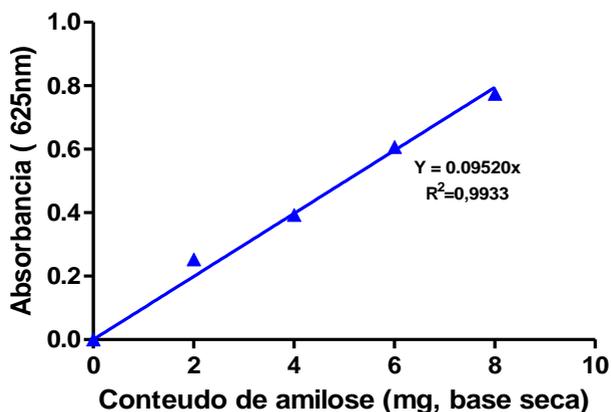


Figura 8- Curva-padrão de amilose obtida usando-se soluções de amilose: amilopectina (0:18; 2:16; 4:14; 6:12 e 8:10 mg, m/m, respectivamente.)

4.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos amidos das VMC

Como previamente descrito por Freitas et al. (2004), o desengorduramento das amostras de farinhas (5g) foi feito inicialmente por extração em refluxo com éter etílico, durante 6 h, em aparato de Soxhlet, seguido da secagem das amostras em estufa (100⁰C, peso constante).

Cerca de 10mg de amostras de farinhas foram montadas em suportes (*stubs*) de alumínio de face dupla, cobertos com adesivo de carbono. As amostras foram cobertas com ouro com auxílio de um sistema de Polarina (polaron E5001 SEM coating system), seguido de visualização do material amostral em microscópio eletrônico de varredura (modelo JEOL JSM-6390LV), a 10 Kv. As imagens foram visualizadas e as micrografias gravadas para posterior análise.

4.9.1 Teor de lipídeos

O teor de lipídios foi determinado segundo método da *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC, 1994), com modificações. Amostras (~ 5g) de farinha dos milhos em estudo foram coletadas, acondicionadas em cartuchos especiais para determinação da matéria graxa e transferidas para um extrator Soxhleth com balões de tara conhecida, contendo 90 ml de éter etílico. As amostras foram mantidas em refluxo por 12 horas, seguido da coleta do conjunto balões + extrato organosolvente e secagem em estufa com ar circulante (100⁰C, 30min) para evaporação do éter etílico remanescente. Por fim, os balões foram retirados da estufa, arrefecidos em dissecador e pesados. O teor de lipídeos foi calculado a partir da equação 5, conforme descrito por Cereda et al. (2002).

$$\left[\text{TL}(\%) = \frac{(B_l - B_v)}{a} \times 100 \right] \quad (\text{Equação 5})$$

Onde: TL - Teor de lipídios (%); B1 - peso do balão com lipídios; Bv - peso do balão vazio; a - peso da amostra.

4.9.2 Teor de proteínas brutas (Nitrogênio total)

O teor de proteínas foi determinado baseando-se no método da AOAC 991.20 (2005), a partir de 100g de amostra de farinhas das variedades crioulas de milho em estudo. A amostra foi colocada em balões de Kjeldahl, adicionado 0,5g de mistura digestora e 4 mL de ácido sulfúrico concentrado. Foi digerida em bloco digestor dentro de capela até que o líquido esteja límpido (azul claro) e o produto da digestão transferido com ajuda da água destilada para o tubo destilador. 10 mL da solução de ácido bórico a 1% foram pipetados para um erlenmeyer de 125 mL e transferido para o reservatório do aparelho de destilação micro-Kjeldahl, através do copo abastecedor, cerca de 30 mL da solução de hidróxido de sódio a 50%. Destilado um volume aproximado de 75 mL e titulado o destilado com solução de ácido sulfúrico 0,01N em microbureta e feita uma prova em branco, usando mistura digestora e ácido sulfúrico. O teor de proteína foi calculado utilizando-se a equação 6.

$$\left[\text{Pr} \left(\text{g} / 100\text{g} \right) = \% \text{N} \times 6,25 \right] \quad (\text{Equação 6})$$

Onde: Pr - Proteína bruta; N - conteúdo de nitrogênio e 6,25 – fator de conversão.

4.9.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

As análises de espectroscopia vibracional de infravermelho médio foram realizadas segundo descrito previamente por Kuhnen (2007). Os espectros de absorvância das amostras de farinha de milho foram obtidos em espectrômetro Bruker IFS 55, equipado com um detector DTGS e sistema de refletância total atenuada (ATR *golden gate* - 45⁰ ângulo de incidência). Um espectro na ausência da amostra (branco) foi obtido previamente, enquanto para a análise do material amostral, *ca.* 100mg

foram dispersos sobre a superfície do cristal, seguido da coleta dos espectros. Os espectros foram obtidos na forma de absorvância (4000 a 600 cm^{-1}), com resolução de 4 cm^{-1} . Cinco réplicas/amostra foram coletadas, totalizando 130 espectros. Todos os espectros foram normalizados e corrigidos para a linha de base na região de interesse (3000 a 600 cm^{-1}). O fator K de 1,7 foi usado na deconvolução dos espectros (Opus v. 5.0, Bruker Biospin) (VAN SOEST et al., 1995; RUBENS et al., 1999).

4.9.4 Propriedades térmicas dos amidos de milho

4.9.4.1 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As características térmicas dos amidos isolados foram estudadas usando um calorímetro DSC-50, equipado com uma estação de análise de dados térmicos. Amostras (13g, peso seco) de amido foram transferidas a um recipiente (*Panela*) de alumínio com capacidade de $40\mu\text{L}$ e água destilada foi adicionada, de modo a se obter uma suspensão água-amido (30: 70, m/v). As amostras foram seladas hermeticamente e incubadas à temperatura ambiente (1 h), previamente à análise calorimétrica. O analisador de DSC foi calibrado com Índio e uma *Panela* vazia de alumínio foi usada como referência. As amostras foram aquecidas a uma taxa de $10^0\text{C}/\text{min}$, iniciando-se a 20^0C até 100^0C . As transições térmicas das amostras de amido foram definidas como: **To** (temperatura do início de aquecimento); **Tp** (pico da gelatinização); **Tc** (temperatura no fim do aquecimento) e **R** (variação da temperatura de gelatinização), calculada como sendo $2(\text{Tp}-\text{To})$ (KRUEGER et al., 1987).

4.9.5 Propriedades da pasta do amido de milho

4.9.5.1 Viscosidade

O comportamento reológico das farinhas de milho foi estudado usando um visco-analisador rápido (RVA-4, Newport Scientific, Narabeen, Austrália). Amostras de farinhas suspensas em água destilada-deionizada (8% de matéria seca, peso total de 28g), foram expostas a combinações de tratamentos térmicos e intervalos de tempo, aquecendo-se as farinhas

entre 48°C a 95°C, com velocidade de mistura de 160 rpm e estabilização à 95°C por 5 minutos. A viscosidade foi expressa em CentiPoise (1 cP = 0,1 Kg.m⁻¹s⁻¹). A temperatura inicial de aquecimento (**To**, *onset*) na subida da viscosidade foi definida como temperatura de empastamento; **TPV**, a temperatura na qual se atinge o pico de viscosidade; **Quebra**, é a diferença entre o pico da viscosidade máxima e mínima durante o empastamento e **Retrogradação** a diferença entre a viscosidade final e mínima durante o empastamento.

4.9.6 Análises estatísticas

Os dados foram coletados, sumarizados e submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando pertinente, ao teste de comparação de médias (Tukey – P<0,05), com auxílio dos pacotes estatísticos *Statistica* (versão 6.0) e *PrismGraph* (versão 5.0). O cálculo dos componentes principais (PCAs) para o conjunto de dados espectrais de infravermelho médio utilizou o pacote estatístico *The Unscrambler* (verão 9.5) (KUHNNEN et al., 2010), seguido da exportação dos dados processados (.dx) ao programa *Spekwin32* (versão 3.0) para a construção dos gráficos de distribuição fatorial e equações feitas em programa *MathType* versão 6. Todas as análises foram feitas em triplicata exceto o teor de proteínas, lipídeos, viscosidade e a calorimetria diferencial de varredura.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises histoquímicas das sementes de variedades crioulas de milho

As células de todas as VMC (F0 e F1) e híbridas reagiram metacromaticamente de maneira semelhante quando tratadas com AT-O, especialmente as paredes celulares e o núcleo (Figuras 9a, 9b, 9c e 9d). Nas variedades híbridas (6d), a reação do núcleo não foi tão intensa quando comparado às amostras de VMC. O citoplasma e o vacúolo apresentaram metacromasia de menor intensidade em todos os genótipos.

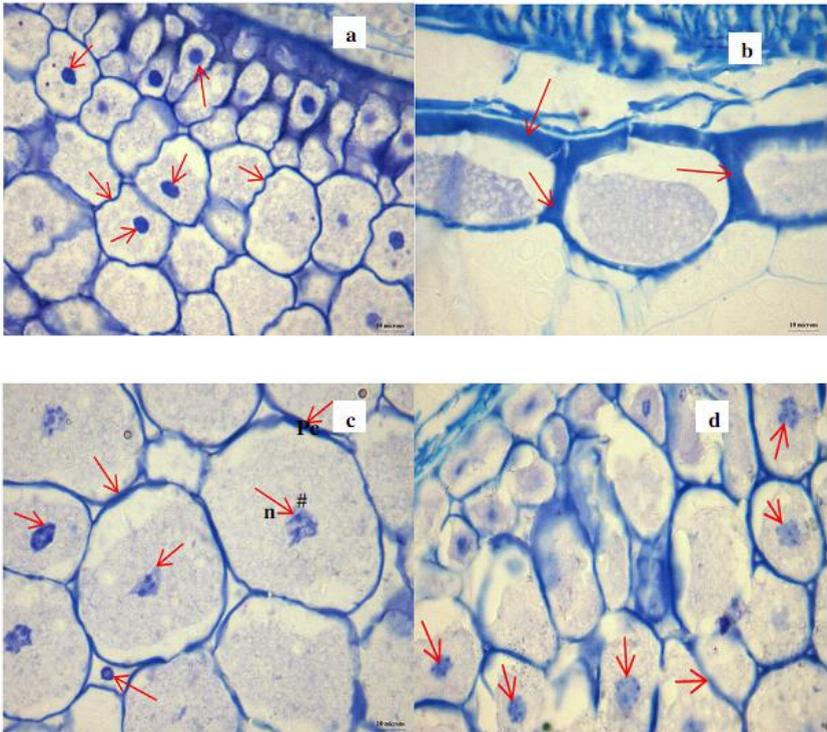


Figura 9- Detalhes da coloração celular de grãos de variedades de milho crioulo com azul de toluidina (AT-O), mostrando a reação metacromática do núcleo e paredes celulares indicativa da presença de polissacarídeos

ácidos. (a) RX-1; (b) MPA1-0; (c) RJ-1; (d) BR SC 154; Barra = 10 μ m, *
n = núcleo, **pc** = parede celular.

Quando as secções foram submetidas ao tratamento com PAS, detectou-se reação positiva para os polissacarídeos neutros (Figuras. 10a, 10b, 10c e 10d), revelando uma quantidade substancial de grânulos de amido no citoplasma de dimensões variadas e a presença de celulose nas paredes celulares e corticais. Todos os genótipos crioulos reagiram ao PAS, demonstrando forte prevalência do acúmulo de amido, i.e., a principal fonte de reserva glicídica de *Z. mays*, e celulose; um componente importante da fração fibras insolúveis dos grãos. Contudo, a reação foi mais intensa para as variedades MPA1-F1 e Fortuna e de menor intensidade para a VMC RJ-F0.

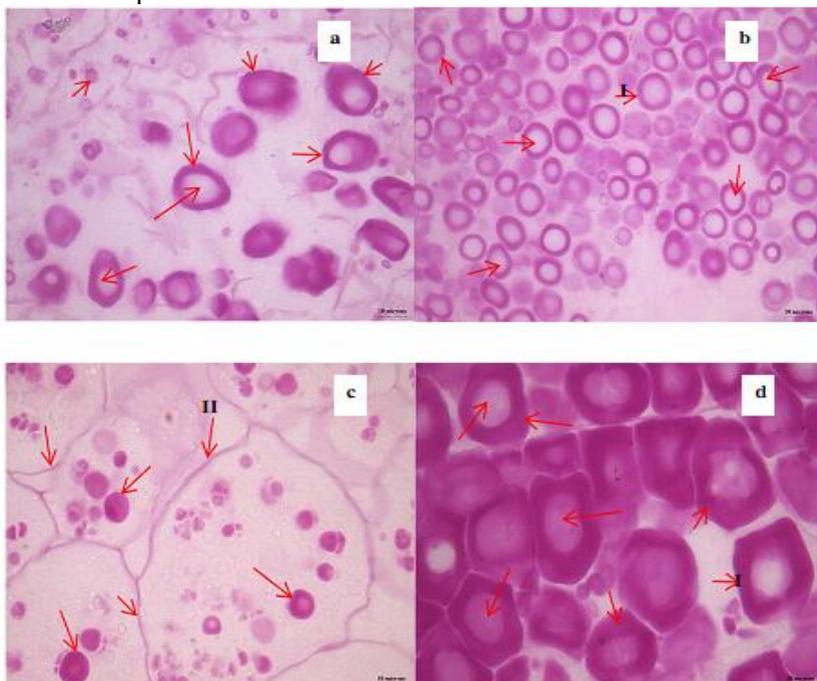


Figura 10- Micrografias de células de grãos de VMC coradas com ácido periódico de Schiff (PAS), demonstrando a reação positiva para a

ocorrência de polissacarídeos neutros: **I**) grânulos de amido e **II**) celulose de paredes celulares e corticais. **(a)** Fortuna; **(b)** R8C-0; **(c)** MG-1; **(d)** MPA1-1; Barra = 10µm.

A marcação das células dos grãos das VMC com azul brilhante de Coomassie (CBB) mostrou-se mais intensa, comparativamente às variedades híbridas. As células corticais e subcorticais reagiram marcando todo o citoplasma, com reação mais intensa para o núcleo, revelando a presença de proteínas nesta organela para todas as variedades (Figuras. 11a, 11b, 11c e 11d). Além disto, células de grãos da geração F0 das VMC apresentaram coloração mais intensa ao tratamento com CBB, sugerindo maior concentração de proteínas em relação à F1 e aos genótipos híbridos.

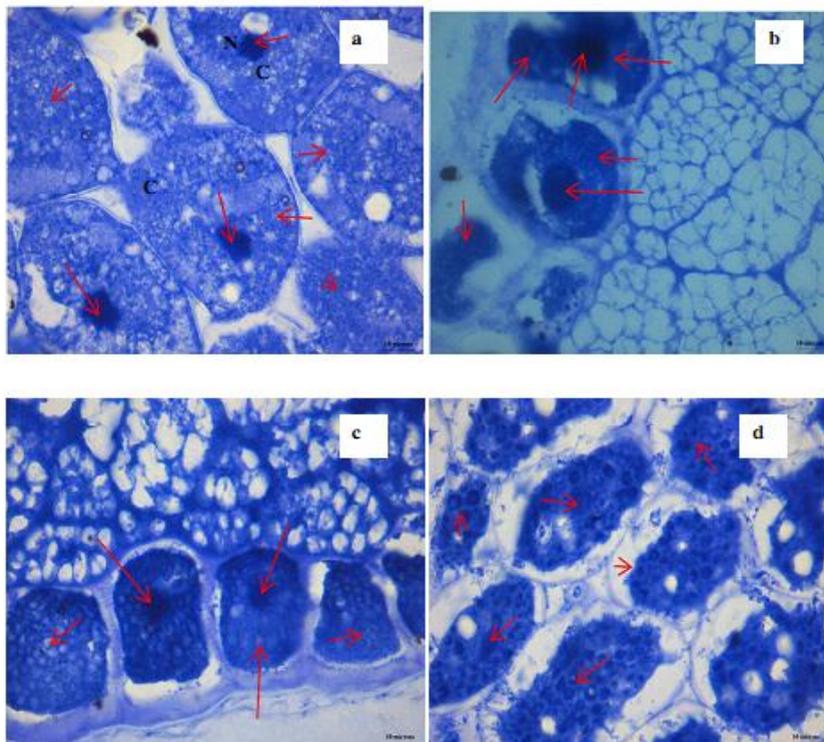


Figura 11- Detalhe da coloração de células de grãos de VMC na

presença de azul brilhante de Coomassie (CBB), mostrando a presença de proteínas no citoplasma e mais intensamente no núcleo. **(a)** LP-1; **(b)** Fortuna; **(c)** PR-0; **(d)** RJ-0; Barra = 10 μ m. C-citoplasma, N - núcleo.

5.2 Quantificação de proteínas

Os resultados de quantificação de proteínas dos grãos das VMC confirmaram os testes histoquímicos, revelando teores superiores daqueles metabólitos primários nas amostras da geração F0 em relação à geração F1 e variedades híbridas (Tabela 3). Na geração F0, a variedade LP destacou-se por seu conteúdo superior de proteínas, seguida dos genótipos RX, PR e RXE, no entanto não houve diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$). Na F1, maiores concentrações de proteínas foram detectados para as variedades RX, RXE e PR, enquanto nas variedades híbridas BR SC 154 mostrou-se superior à Fortuna. Destaca-se que o teor de proteínas foi bastante distinto entre as amostras das gerações F0 \rightarrow F1, sugerindo que as discrepâncias edafoclimáticas, por exemplo, existentes entre as regiões litorânea e extremo-oeste de Santa Catarina estão fortemente relacionados à síntese destes compostos do metabolismo primário.

Tabela 3- Conteúdos médios de proteínas (%N x 6,25) de grãos de variedades crioulas de milho e híbridas (n = 2). Letras distintas indicam diferenças significativas a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey entre os grupos da F0, híbridas e F1 respectivamente.

Variedade	Teor de Proteínas g /100g (%N x 6,25)
LP-0	11,59 _a
RX-0	11,02 _b
RJ-0	9,28 _c
MPA1-0	9,07 _c
RXE-0	10,55 _b
MG-0	8,54 _c
R8C-0	7,04 _d
PR-0	10,59 _b
Fortuna	6,03 _b
BR SC 154	9,52 _a
LP-1	6,96 _a
RX-1	7,18 _a
RJ-1	6,18 _b
MPA1-1	6,70 _a
RXE-1	7,05 _a
MG-1	6,05 _b
R8C-1	5,60 _b
PR-1	6,99 _a

Diversos trabalhos têm relatado teores de proteínas de grãos de milho inferiores ao observado neste estudo. Georget et al. (2008), Wu e Norton, (2001), Prasanna et al. (2001) descreveram conteúdos de 6,9 a 8,9 g/100g; enquanto Capobiango, (2006) detectou concentrações de 5,70 a 7,80 g/100g em fubá de milho, sugerindo que algumas das VMC destacam-se como fontes deste nutriente. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira et al. (2004) em variedades de milhos de alta qualidade protéica, de modo que as VMC LP, RX, RXE e PR poderão

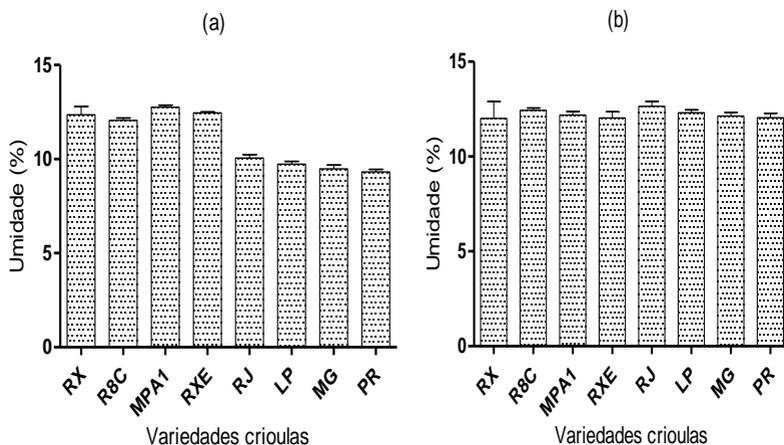
eventualmente ser utilizadas, por exemplo, em programas de melhoramento genético visando à melhoria da qualidade nutricional dos grãos, tais como, incremento de conteúdo protéico, e/ou preferencialmente destinadas à alimentação humana. Além disto, o maior valor biológico da proteína desses milhos implica também em seu melhor aproveitamento metabólico por animais monogástricos, como suínos, aves, peixes e equídeos (OLIVEIRA et al., 2004). Destaca-se, entretanto, o efeito diferencial de conteúdos protéicos dos grãos entre as gerações em estudo (F0→F1), um aspecto que requer estudos mais detalhados, especialmente considerando a diversidade de condições edafoclimáticas e de manejo das regiões aptas ao cultivo daquele cereal no estado catarinense. Apesar das VCM neste estudo terem apresentado teores elevados de proteínas, comparativamente aos estudos prévios com estes e outros genótipos de VMC (KUHNNEN, 2007), essa variação pode ser devida às condições de manejo e edafoclimáticas em alguma extensão, necessitando um estudo mais minucioso, a fim de determinar suas qualidades protéicas e agregar valor a este material crioulo.

As proteínas do milho contêm, em média, cerca de 2% de lisina, metade do valor recomendado pela FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) para o consumo humano. Sob o ponto de vista nutricional, lisina é o aminoácido mais limitante no endosperma do milho, seguido de triptofano (PRASANNA et al., 2001). Neste contexto, a análise de conteúdos de proteínas nos genótipos crioulos em estudo mostra-se relevante, especialmente quanto aos valores de concentração de lisina e triptofano.

As reservas de proteínas podem ser encontradas no endosperma e gérmen, no entanto, as proteínas do gérmen são superiores em qualidade e quantidade. Em relação a outros cereais, a qualidade protéica do milho (32,1%) é similar àquela do trigo (38%) e sorgo (32,5%), porém bastante discrepante do arroz (79,3%) (CAPOBIANGO, 2006). Os teores de proteínas encontrados nas VCM em estudo são importantes para o agricultor familiar, principalmente em países em desenvolvimento com escassos recursos financeiros para aquisição de proteína animal.

5.3 Teor de amilose e lipídeos e propriedades físico-químicas e funcionais das farinhas e amidos de VMC.

Previamente às análises de composição química (amido, amilose e lipídeos) e propriedades físico-químicas e funcionais, o teor de umidade das amostras de farinhas foi determinado. Os valores obtidos situaram-se entre 8 a 13%, (Figuras 12a, 12b e 12c), em acordo às normas para as análises físico-químicas daquelas biomassas, e.g., poder de inchamento, índice de solubilidade, capacidade de retenção de água, teor de lipídios e determinação do tipo do grânulo de amido, conforme demonstrado nas Tabelas 4 e 5.



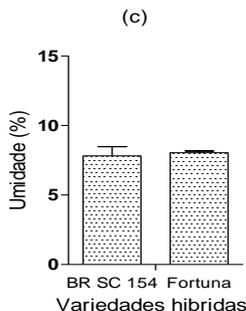


Figura 12- Teor de umidade (%) de amostras de farinhas de VMC. (a) Geração F0, (b) Geração F1 e (c) variedades híbridas. Os valores são representados como (media \pm desvio padrão) de três repetições (n =3).

5.3.1 Teor de amilose

O teor de amilose nas amostras variou de 5,30 (8,28%) a 15,85 mg de base seca (24,77%) para os genótipos da geração F0 e de 7,91 (12,37%) a 17,56 mg de base seca (27,43%) para aqueles da geração F1. As variedades híbridas apresentaram conteúdos de amilose bastante discrepantes, 7,64 mg de base seca (11,94% - BR SC 154) e 19,47 mg de base seca (30,43% - Fortuna). Dentre as VMC, R8C-0 (15,85 mg, base seca) e RJ-0 (14,32 mg, base seca) destacaram-se por seus teores superiores daquele polissacarídeo, diferindo do observado na geração F1, onde as variedades PR-1 (17,56 mg, base seca), RXE (14,11 mg, base seca) e MPA1-1 (12,97 mg, base seca) evidenciaram os conteúdos mais elevados (Tabelas 4 e 5). A amilose quantificada neste estudo foi obtida pelo método de Williams et al. (1970). Dos três métodos de isolamento de amilose testados, o método de Kim e Willet (2004) mostrou-se inefetivo na separação da amilose e amilopectina, devido à dificuldade de ajuste de pH da suspensão altamente viscosa formada durante o processo de isolamento. O método de Mua e Jackson (1995) apresentou rendimento de 1,70 g de amilopectina e 0,28 g de amilose, enquanto que

o método descrito por Williams et al. (1970) propiciou rendimentos de 0,4g de amilose e 19 g de amilopectina, além de ser ecologicamente mais interessante que o método de precipitação com *n*-butanol (MUA; JACKSON, 1995), ainda que mais laborioso.

Teores de amilose para milhos normais argentinos entre 16,1 e 23,5% foram descritos por Sandhu et al. (2005). Singh e Singh, (2003), Sandhu et al. (2004), Brandemarte et al. (2004) e Han et al. (2002) detectaram uma amplitude de valores de conteúdo de amilose de 15 a 25,1% para variedades de milhos normal, doce e ceroso. Por sua vez, VMC brasileiras apresentaram concentrações daquela macromolécula de 11,3 a 25,4% (KUHNEN, 2007), semelhante ao observado neste trabalho. Apesar dos resultados serem similares aqueles reportados por Kuhnen (2007), a metodologia usada por aquele autor difere em relação ao presente estudo.

O teor de amilose nos grânulos de amido varia de acordo com a fonte botânica e é afetado pelas condições climáticas e do solo ao longo do crescimento do fruto, especialmente durante o estágio de enchimento dos grãos (MORRISON; AZUDIN, 1987). O conteúdo de amilose em matérias-primas derivadas do milho, i.e., farinha, é de importância por afetar as propriedades funcionais daquela biomassa, tal como o poder de inchamento. Esta propriedade é fortemente atribuída à presença e conteúdo de amilopectina, enquanto a amilose têm ação diluente.

Além do poder de inchamento da farinha (e do amido), o teor de amilose afeta a solubilidade da fração amídica e da farinha de milho. O poder de inchamento e o índice de solubilidade fornecem evidências da magnitude das interações entre as cadeias de amido dentro das estruturas amorfas e domínios cristalinos dos grânulos. A extensão destas características é afetada pela relação amilose/amilopectina e pelas características químicas daqueles polissacarídeos, e.g., peso molecular, distribuição das cadeias, grau de polimerização e comprimento das ramificações das cadeias e sua conformação.

Chen e Bergman (2007), reportaram teores de amilose variando de 12,75 a 24,90% usando o método de quantificação daquele polissacarídeo por

reação com iodo (similar ao usado neste estudo) para cultivares de milho e arroz. Os autores comentam a dificuldade à obtenção de amilose pura decorrente, dentre outros fatores, da complexidade de separação dos polímeros amilose-amilopectina, da presença de lipídeos na amostra e das discrepâncias no grau de polimerização da amilose (GP = 230 a 3100) e amilopectina (GP = 700 a 22000). Além disto, a existência de algum grau de ramificação estrutural de amiloses concorre para dificultar sua extração, gerando baixos valores de rendimento. Neste sentido, a digestão prévia das amostras com uma isoamilase é sugerida à otimização do método de extração, por exemplo (CHEN; BERGMAN, 2007). Contudo, Mukerjea e Robyt, (2010) relatam que a digestão enzimática (isoamilase, i.e. β -amilase) do polissacarídeo poderá ser incompleta, indicando a presença de ramificações (α -1 \rightarrow 6, 4-5%) parciais em sua estrutura.

Apesar da amilose apresentar um coeficiente de absorção elevado (~ 1), não se deve ignorar a presença de alguma quantidade de amilopectina nos extratos, um fato que interfere nos valores de concentração obtidos, porque a absorbância de amostras de amidos mostra-se como função das diferenças do grau de polimerização das cadeias moleculares de seus constituintes, os quais, por sua vez, dependem da origem botânica de cada variedade.

Em seus experimentos, Sené et al. (1997) reportaram para milhos normais (milhos cujo teores de amilose e amilopectina não foram modificados por melhoramento moderno), teores de amilose de 11,5 a 22 mg/5mL pelo método de iodo. E para milhos híbridos Sené et al. (2000) reportaram ainda que a expressão genética modulada pelo meio ambiente afeta teores de amilose e amilopectina. Em duas gerações de milho híbrido (F0- ano 1994, e F1-ano 1995), amilose variou de 8-19% para F0 e de 6,9-19,4% para F1.

Por sua vez, a presença de lipídeos (mono, di, triglicerídios e fosfolipídios) na biomassa amostral diminui a quantidade de amilose livre devido à formação de complexos mais estáveis com aquele polissacarídeo, comparativamente ao complexo amilose-iodo. Em função disto, sugere-se uma extração prévia de lipídeos da amostra, como

estratégia para aumentar a eficiência de recuperação da amilose (GARCIA et al., 1995).

A temperatura, assim como o agente de complexação e sua concentração, também influenciam nos rendimentos de extração de amilose. Conteúdos superiores (6,4% a 8%) de amilose foram obtidos quando do aquecimento da solução de amilose (85⁰C, 30 min), comparativamente aos valores detectados à temperatura ambiente, na presença de agentes de complexação, como iodo, octanol e *n*-butanol. Este último composto mostrou-se mais efetivo na complexação com a amilose, em relação ao octanol e iodo (GARCIA et al., 1995).

Sené et al. (1997) e Bello-Pérez et al. (2009) comentam que a solubilização do amido é um fator limitante na determinação de seus componentes. Ao contrário do amido puro que gelatiniza espontaneamente em soluções aquosas alcalinas à 100⁰C, a solubilização de amidos não purificados leva à subestimação de valores, principalmente para genótipos de milho com alto teor de amilose. Adicionalmente, a solubilização não deve modificar a estrutura da amilose e amilopectina, tampouco suas afinidades ao iodo. Em linhagens de milho dentado, milho flint e híbrido (doce, amiláceo, e ceroso) valores de afinidade de 17 a 22g de iodo/100g de amilose e de 1,05 a 1,25g de iodo/100g de amilopectina foram detectados, claramente revelando as discrepâncias de afinidade entre aqueles constituintes amiláceos. Em função do exposto, recomenda-se a adoção de pré-tratamentos para uma rápida e efetiva solubilização da amilose. Por exemplo, para amidos resistentes à gelatinização (milhos com alto teor de amilose), o uso de solventes apróticos como o dimetilsulfóxido (DMSO), a adição de cloreto cálcio (CaCl₂) ao meio de reação e a sonicação deste a 70⁰C têm se mostrado efetivos. A digestão enzimática prévia da amostra é bastante específica, corroborando à obtenção de valores subestimados de teores de amilose em amidos resistentes à gelatinização (SENÉ et al., 1997). Portanto, uma combinação de métodos, e.g., solubilização em DMSO e digestão enzimática (α -amilase, 100⁰C \rightarrow , β -amilase, 50⁰C) resulta efetiva, ainda que laboriosa e dispendiosa em consumo de tempo, não servindo para uma análise de rotina.

Apesar do não desprezível número de variáveis que influenciam os valores de concentração de amilose de biomassas, os resultados encontrados neste estudo são bastante promissores e estão de acordo com estudos prévios (KUHNNEN, 2007). Entretanto, a padronização de métodos de extração de amilose e estudos mais detalhados são necessários à caracterização das biomassas de milhos crioulos quanto à sua fração amídica, como forma de definir sua eventual aplicabilidade nas indústrias agroalimentar, cosmética e farmacêutica, fato que poderá incrementar o valor econômico daquele germoplasma. De fato, o processo de separação e isolamento da amilose com alto grau de pureza ainda constitui um desafio à química analítica.

5.3.2 Teor de lipídeos

O teor de lipídeos nas amostras das VMC variou de 3,01% (RXE-0) a 5,53% (MG-0) para a geração F0. Diferentemente, na geração F1, a amplitude de valores daquela variável foi de 4,15% (R8C-1) a 5,43% (LP-1). Por sua vez, as variedades híbridas apresentaram conteúdos de 6,65% (BR SC 154) e 4,97% (Fortuna - Tabelas 4 e 5).

Genótipos de milho usualmente apresentam teores médios de lipídeos de 4%. As primeiras linhagens de milho contendo alto teor de lipídeos foram desenvolvidas em 1986 e híbridos contendo teores de 6-8% de lipídeos já estão disponíveis no mercado (HOJILLA-EVANGELISTA; JOHNSON, 2003). O teor de lipídeos no milho resulta do crescimento do gérmen na semente e a principal aplicação de milhos com alto teor de lipídeos é a alimentação animal, devido a seu alto valor de energia metabolizável. Os resultados deste estudo corroboram com aqueles reportados na literatura (CAPOBIANGO, 2006; HOJILLA-EVANGELISTA; JOHNSON, 2003), no entanto há que destacar de que os valores encontrados neste estudo se situam perto daqueles milhos considerados de alto teor lipídico.

A presença de fósforo e carotenóides em farinhas de milho pode afetar os resultados de quantificação lipídica, uma vez que são lipossolúveis e são extraídos conjuntamente. Os teores de lipídeos encontrados neste estudo influenciam fortemente o teor de amilose, a gelatinização do amido devido à formação de complexos com constituintes do amido

(DERYCKE et al., 2005) e concorrem à diminuição da viscosidade devido ao seu efeito lubrificante na suspensão amido-água, ainda que este efeito seja pequeno, porque complexos amilose-lipídeos aumentam a viscosidade (DAUTANT et al., 2007). O aumento da solubilidade por lixiviamento da amilose foi relatado como função do conteúdo de lipídeos no amido e na habilidade de formação de complexos do amido com lipídeos. Complexos amilose-lipídeos são insolúveis em água e requerem altas temperaturas para dissociarem (MORRISON, 1988; RAPHAELIDES; KARKALES, 1998).

Para além da aplicação como matéria-prima de alimentos animais, outros usos de milhos ricos em lipídeos parecem encontrar obstáculos devido aos custos elevados de processamento e qualidade do produto associados àquela característica. Pan et al. (1996) mostraram que frações de milho seco moído contendo quantidades apreciáveis de lipídeos apresentam problemas de oxidação durante o processamento. Além disto, o uso de variedades ricas em lipídeos na indústria moageira é insatisfatório, pois reduz o rendimento do amido e requer equipamento adicional para acomodar o tamanho aumentado do gérmen (HAUMANN, 1966), sendo que companhias que comercializam este tipo de milho têm procurado mecanismos custo-efetivos para a remoção do gérmen da matéria-prima (HAUMANN, 1966).

Sob outro ponto de vista, variedades de milho ricas em lipídeos são interessantes porque usualmente apresentam maiores teores e qualidade de proteínas (albuminas e globulinas), devido ao maior crescimento do gérmen (HOJILLA-EVANGELISTA; JOHNSON, 2003). De fato, o teor de lipídeos encontrado neste estudo (Tabelas 4 e 5) corrobora com os resultados da análise de proteínas observados às VMC (Tabela 4). Esta abordagem pode ser interessante à valorização destas biomassas de milho, uma vez que podem ser usadas à extração daquelas proteínas de importante valor nutricional. Estudos prévios (KUHNEN, 2007) demonstraram que VMC provenientes da região extremo-oeste de Santa Catarina (município de Anchieta) contêm quantidades apreciáveis destas proteínas (8,94 a 13,06 mg/g - globulinas e 0,56 a 1,42 mg/g - albuminas), comparativamente a genótipos híbridos (6, 35 a 11,40 - globulina e 0,54 a 1,52 - albumina). A relação destes resultados com os

encontrados neste estudo mostra de fato que as VMC possuem um adicional valor nutricional, o qual poderá ser melhor explorado em sistemas agroindustriais, gerando incrementos de rendimento econômico ao pequeno agricultor e estímulos à conservação destes genótipos de *Z. mays*.

5.3.3 Poder de inchamento

O poder de inchamento das farinhas das VMC da geração F0 mostrou-se proeminente em relação às variedades R8C ($10,52\% \pm 1,28$), MPA1 ($9,88\% \pm 1,87$), RXE ($9,82\% \pm 0,59$) e MG ($9,57\% \pm 1,73$). A variedade R8C-0 diferiu de forma significativa ($p < 0,05$) (Tabela 4). Para os genótipos da geração F1, maior poder de inchamento foi observado para RJ ($13,14\% \pm 1,50$), LP ($12,25\% \pm 0,54$) e R8C ($11,46\% \pm 0,81$), com diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) (Tabela 5). As variedades híbridas apresentaram valores similares no poder de inchamento, $10,88\% \pm 1,46$ e $10,87\% \pm 0,72$, para BR SC 154 e Fortuna, respectivamente.

Valores de poder de inchamento de amidos de 20,55 a 24,50% foram relatados por Sandhu et al. (2005), sendo as diferenças observadas atribuídas à presença de fibras nas farinhas de milho, as quais possuem maior capacidade de retenção de água. Os resultados do presente estudo são similares ao observado por Lee e Osman (1991), Horndok e Noomhorm (2007), Adebooye e Singh (2008) e Zavareze et al. (2009) e demonstraram uma relação inversa entre o poder de inchamento e o teor de umidade da biomassa amostral. Tal comportamento é atribuído à reorganização das moléculas de amido causadas pelas mudanças hidrotérmicas, gerando uma limitação na hidratação dos grânulos de amido e, conseqüentemente, redução no inchamento. As Tabelas 4 e 5 resumizam os resultados dos testes físico-químicos estudados.

Tabela 4- Rendimento de amido, teor médio de amilose e lipídeos e características físico-químicas e funcionais de farinhas de grãos das VMC, geração F0. Valores são apresentados como (media \pm desvio padrão) de três repetições (n =3) para o poder de inchamento, solubilidade, capacidade de retenção de água e teor de amilose. Letras distintas na coluna indicam diferenças estatísticas significativas, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. *Tamanho dos grânulos de amido determinados por MEV.

Variedades	Amilose (mg)	Lipídios (%)	Poder de inchamento (%)	Índice de solubilidade (%)	Capacidade de retenção de água (%)	Grânulos de amido* (μ m)
MPA1	7,74 \pm 0,16 _a	3,29	9,88 \pm 1,87 _a	7,51 \pm 0,91 _b	18,17 \pm 1,86 _b	11,80-18,80
PR	5,30 \pm 0,05 _g	3,74	8,74 \pm 0,42 _c	5,83 \pm 2,66 _c	18,89 \pm 0,67 _a	8,20-11,80
MG	8,69 \pm 0,18 _d	5,53	9,57 \pm 1,73 _a	7,86 \pm 0,49 _a	18,83 \pm 0,81 _a	8,40-12,00
LP	8,52 \pm 0,08 _d	3,38	8,07 \pm 0,16 _b	3,82 \pm 2,03 _d	18,36 \pm 0,46 _a	10,00-15,20
R8C	15,85 \pm 0,01 _a	4,46	10,52 \pm 1,28 _a	8,24 \pm 0,50 _a	17,43 \pm 0,47 _c	7,20-16,40
RJ	14,32 \pm 0,05 _b	3,10	8,44 \pm 0,47 _b	7,60 \pm 0,86 _b	17,56 \pm 0,78 _c	7,20-10,20
RXE	5,58 \pm 0,06	3,01	9,82 \pm 0,59 _a	7,12 \pm 0,22 _b	18,13 \pm 1,28 _b	9,40-16,60
RX	9,60 \pm 0,18 _c	3,02	8,70 \pm 0,31 _b	8,52 \pm 0,11 _a	18,19 \pm 0,23 _b	4,80-13,60

O conteúdo de fósforo da fração amídica é outro fator que afeta significativamente as características funcionais daquele polissacarídeo. Os fosfatos mono-ésteres estão covalentemente ligados a moléculas de amilopectina no amido e aumentam a viscosidade e clareza da pasta. No entanto, a presença de fosfolipídeos resulta em aspecto opaco, conferindo baixa viscosidade às pastas de amido em decorrência da formação de complexos com amilose e longas cadeias de amilopectina, resultando numa limitada solubilidade e inchamento (SCHOCH, 1942; SINGH et al., 2003).

Tabela 5- Rendimento de amido, teor médio de amilose e lipídeos e características físico-químicas e funcionais de farinhas de grãos das VMC (geração F1) e híbridas. Valores são apresentados como (média \pm desvio padrão) de três repetições ($n = 3$) para o poder de inchamento, solubilidade, capacidade de retenção de água e teor de amilose. Letras diferentes na coluna indicam diferenças estatísticas significativas entre as variedades a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. *Tamanho dos grânulos de amido determinados por MEV.

Variedades	Amilose	Lipídios	Poder de inchamento	Índice de solubilidade	Capacidade de retenção de água	Grânulos de Amido [*]
Geração F1	(mg)	(%)	(%)	(%)	(%)	(μ m)
MPA1	12,97 \pm 0,10 _c	5,03	9,08 \pm 0,47 _d	6,82 \pm 0,16 _c	18,17 \pm 1,86 _b	6,40-15,80
PR	17,56 \pm 0,10 _a	4,30	8,89 \pm 0,52 _d	7,05 \pm 0,48 _c	18,89 \pm 0,67 _a	10,40-15,40
MG	8,05 \pm 0,01 _f	4,74	9,55 \pm 0,44 _c	6,14 \pm 2,13 _d	18,83 \pm 0,81 _a	8,60-12,80
LP	9,58 \pm 0,18 _a	5,43	12,25 \pm 0,54 _a	12,73 \pm 1,09 _a	18,36 \pm 0,46 _a	7,30-13,40
R8C	7,91 \pm 0,05 _f	4,15	11,46 \pm 0,81 _b	8,46 \pm 1,09 _b	17,43 \pm 0,47 _b	7,40-18,40
RJ	10,61 \pm 0,04 _d	4,58	13,14 \pm 1,50 _a	14,39 \pm 3,11 _a	17,56 \pm 0,78 _b	11,60-16,60
RXE	14,11 \pm 0,05 _b	5,03	10,87 \pm 0,19 _b	7,50 \pm 1,14 _c	18,13 \pm 1,28 _b	9,80-13,60
RX	10,84 \pm 0,04 _c	4,96	9,85 \pm 0,30 _c	12,25 \pm 1,12 _a	18,19 \pm 0,23 _b	7,40-12,00
BR SC 154	7,64 \pm 0,03 _b	6,65	10,88 \pm 1,46 _a	7,81 \pm 0,67 _a	17,44 \pm 1,82 _a	9,00-16,40
FORTUNA	19,47 \pm 0,01 _a	4,97	10,87 \pm 0,72 _a	8,04 \pm 0,12 _a	17,62 \pm 1,82 _a	7,80-12,00

O poder de inchamento determinado neste estudo mede a entrada da água nos grânulos das farinhas de milho a temperaturas elevadas e ausência de forças de cisalhamento. Portanto, um sistema diferente do que acontece no estudo das propriedades da pasta em RVA (visco analisador rápido) onde o aquecimento ocorre com forças de cisalhamento, rompendo os grânulos nas farinhas (BLAZEK; COPELAND, 2008). A análise dos resultados deste estudo revelou não existir uma relação direta entre o poder de inchamento e o teor de amilose das VMC (Tabelas 4 e 5). Além disto, a não remoção de lipídios e proteínas nestas amostras poder ter influenciado o poder de inchamento destas.

Para Srichuwong et al. (2005), a estrutura do amido contribui para o seu poder de inchamento. Em sistemas alimentares, o aquecimento de amido

na presença de água resulta em sua gelatinização. Portanto, a estrutura cristalina do amido é rompida pelo aumento das ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e os grupamentos hidroxila do amido, o que induz o inchamento do grânulo e a difusão da amilose. O poder de inchamento contribui nas características de muitos produtos derivados de amido e no comportamento reológico deste polissacarídeo. A diminuição da água livre na suspensão e seu fluxo restrito devido ao espaço ocupado pelos grânulos inchados contribui para o aumento da viscosidade em sistemas de aquecimento de amidos (SRICHUWONG et al., 2005). O poder de inchamento é controlado basicamente pela estrutura da amilopectina, composição e arquitetura dos grânulos de amido (razão entre estrutura cristalina e amorfa) e componentes químicos outros do amido (SRICHUWONG et al., 2005), daí ser fundamental conhecer esta propriedade para variedades de milho crioulo, a fim de atribuir-lhes as melhores possibilidades de uso.

Singh et al. (2006), estudando milhos ceroso, doce e normal, reportaram valores de poder de inchamento de 7,8 a 39,1 (g/g). Amidos de milho ceroso apresentaram poder de inchamento entre 30,2 a 39,0 (g/g), enquanto para os genótipos de grãos doce e normal valores médios de 7,8g/g e 15,2 a 15,6 g/g foram detectados, respectivamente. Os autores justificam os resultados em função de que o milho ceroso tem maior capacidade de adsorção de água e, conseqüentemente, maior poder de inchamento. Os valores inferiores de poder de inchamento observados para os milhos doces devem-se aos seus maiores teores de amilose e lipídeos.

Freitas et al. (2004) comentam que o poder de inchamento representa a perda irreversível da organização dos grânulos, sendo um indicativo da gelatinização do amido (rompimento da ordem molecular dentro do grânulo) quando este é aquecido na presença da água e que a gelatinização é um processo de absorção de energia pelo amido. Portanto, os baixos valores de poder de inchamento das VMC em estudo sugerem a existência de fortes interações de amilose e amilopectina, e formação de complexos de amilose/amilopectina com lipídios e proteínas na matriz, de modo que maiores temperaturas são requeridas para o rompimento destas ligações. As informações sobre o poder de inchamento são úteis

para o processamento do amido destas variedades crioulas na indústria, dependendo produto final desejado (i.e., produtos que exijam menor entumescimento) uma vez que determina o comportamento da pasta do amido.

5.3.4 Índice de solubilidade

O índice de solubilidade nas farinhas de milho variou significativamente entre as gerações F0 e F1 de milhos crioulos ($p < 0,05$), com amplitudes de valores de 3,82% (LP-0) a 8,24% (RX-0) e 6,14% (MG-1) e 14,39% (LP-1). As variedades híbridas mostraram-se semelhantes para esta variável, e.g., 8,04% (Fortuna) e 7,81% (BR SC 154). As diferenças detectadas nas amostras das duas gerações (F0 e F1), assim como nas variedades híbridas, sugerem que fatores genéticos e do ambiente podem ter afetado as propriedades físico-químicas das farinhas e amidos das VMC. Resultados similares foram encontrados por Taboada-Gaytan et al. (2010) em populações de milhos híbridos analisadas ao longo de duas gerações de cultivo.

Nunez-Santiago et al. (2004) relataram índices de solubilidades de amidos de banana variando 14,12% a 17,08%, enquanto valores inferiores (15,36% a 21,72%) foram descritos por Sandhu et al. (2005) para amidos de milho derivados do cruzamento de duas linhagens. Segundo estes autores, interações intramoleculares nos amidos afetam significativamente sua solubilidade, bem como as discrepâncias de estruturas dos grânulos daquele polissacarídeo, conforme observado no presente estudo (Figuras 13a e 13b). De fato, a reduzida solubilidade encontrada para as amostras de amidos das VMC corrobora com os dados do poder de inchamento observados, uma vez que estas duas variáveis são intimamente correlacionadas.

De outra forma, índices elevados de solubilidade correspondem ao lixiviamento da amilose. A redução na solubilidade de amidos com baixa umidade e tratados com aquecimento indica a forte interação entre as cadeias de amilose e amilopectina, as quais formam estruturas estáveis e reduzem o lixiviamento das moléculas de amilose nos grânulos de amido (GOMES et al., 2005; ZAVAREZE et al., 2009; NWOKOCHA et al.,

2009). De acordo com Olayinka et al. (2008) e Tester e Morrison (1990), a formação de complexos amilose-lipídios pode ser responsável pela redução da solubilidade do amido. De acordo com Batista et al. (2010), complexos amilose-lipídeos são responsáveis por altas temperaturas iniciais da pasta, baixo pico de viscosidade, maior resistência ao cisalhamento e alta tendência a retrogradação. Portanto, os resultados encontrados neste estudo indicam que as interações intramoleculares dos amidos das VMC são bastante fortes, fato que exige temperaturas elevadas ($>95^{\circ}\text{C}$) para o seu processamento.

5.3.5 Capacidade de retenção de água

A capacidade de retenção de água das farinhas de milho situou-se entre 17,43% (R8C-0 e R8C -1) e 18,89% (PR-0 e PR-1), enquanto para as variedades híbridas foi de 17,62% (Fortuna) e 17,44% (BR SC 154). No entanto, não houve diferenças estatísticas significativas entre as variedades estudadas (Tabelas 4 e 5), revelando certas similaridades dos genótipos crioulas, como o poder de inchamento e índice de solubilidade, que se correlacionam com a variável em estudo. De fato, a baixa capacidade de retenção de água indica que as moléculas no amido estão fortemente associadas, o que conseqüentemente resulta em baixo poder de inchamento e solubilidade.

Valores da capacidade de retenção de água de 93,4% a 99,8% foram relatados por Kaur et al. (2002) em amidos de batata, sugerindo perda das interações amilose-amilopectina, assim como a formação de complexos destes polissacarídeos com fosfolipídeos, resultando na alta capacidade de retenção de água. Na indústria alimentar, produtos baseados no amido como, por exemplo, farinhas de cereais são cozidos durante os processos de extrusão. No entanto, o conhecimento de seus comportamentos em termos de capacidade de retenção de água é necessário para seu processamento, uma vez que a escolha das condições ótimas de processamento e a qualidade do produto final dependem das características reológicas destes materiais (DAUTANT et al., 2007; BEUCHAT, 1977; IWUOHA; KALU,1995).

Adebooye e Singh, (2008) e Sandhu et al. (2004) descrevem valores de capacidade de retenção de água de 70-170% e 96-107% para feijão caupi e milho, respectivamente. De acordo com estes autores, as diferenças na capacidade de retenção de água são atribuídas à estrutura dos grânulos de amidos dos genótipos estudados, similar ao observado para as VMC (Figuras 13a e 13b). Os autores também referem que amidos de milho de tamanho grande apresentaram alta capacidade de retenção de água, quando comparados aos amidos de menor tamanho. Tal fato relaciona-se às diferenças de disponibilidade de sítios de ligação da água com moléculas do amido. Portanto, os resultados deste estudo sugerem a existência de fortes interações intramoleculares nos amidos das VMC, o que requer temperaturas elevadas para o seu processamento. Ressalta-se, adicionalmente, que a capacidade de retenção de água afeta a gelatinização do amido (requerendo maiores temperaturas para gelatinizar) e reduz a viscosidade da pasta. Em função disto, os amidos dos milhos crioulos em estudo deverão, preferencialmente, ser utilizados na elaboração de produtos onde essas características sejam desejáveis.

5.3.6 Tamanho de grânulos de amido

O tamanho dos grânulos de amido determinado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) variou de 4,80 μm a 18,80 μm (geração F0) e de 6,40 μm a 16,60 μm (geração F1 e híbridas- tabelas 5 e 6). As Figuras 13a e 13b mostram detalhes da morfologia dos grânulos de amido de algumas variedades crioulas e híbridas. Apesar do processo de desengorduramento das amostras, foi possível detectar na matriz das micrografias a presença de fibras, o que poderá ter afetado negativamente o poder de inchamento e a solubilidade das amostras em estudo.

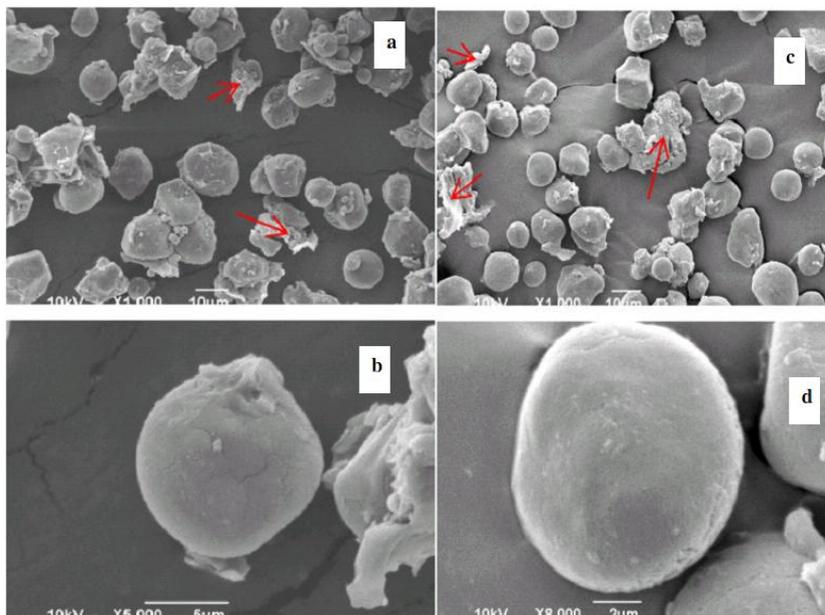


Figura 13a-Micrografias dos grânulos de amido extraídos de grãos de VMC. (a) variedade MG-0, (b) detalhe do formato esférico do grânulo de amido individualizado da variedade MG-0, (c) RJ-0, (d) detalhe do formato elipsóide do grânulo individualizado da variedade RJ-0. Barras = (a, b) 10 μ m; (c) 5 μ m e (d) 2 μ m. As setas indicam a presença de fibras no material amostral.

As diferenças na solubilidade e poder de inchamento de amidos de fontes botânicas diferentes podem ser também explicados pelas diferenças na estrutura morfológica dos grânulos de amidos (Figuras 13a, e 13b). Kaur et al. (2002a, b) reportaram elevado poder de inchamento e baixa solubilidade para amidos de batata com estruturas irregulares e tamanho maior de grânulo. De acordo com deWilligen (1976a, 1976b), grânulos de milho e trigo podem expandir em 30 vezes seu volume original sem desintegrar, sendo que a amilose desempenha um papel importante na restrição do inchamento inicial, uma vez que este procede mais

rapidamente após a lixiviação daquela macromolécula. O aumento da solubilidade e o concomitante aumento da clareza da suspensão são vistos como sendo resultado do inchamento dos grânulos de amido.

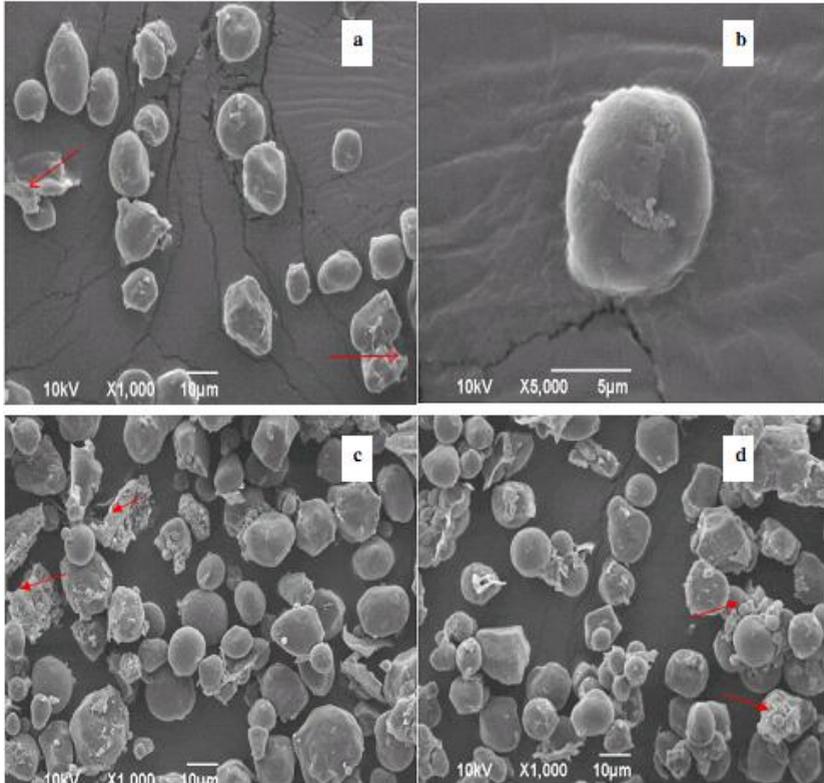


Figura 13b-Micrografias de grânulos de amido de grãos de variedades de milhos crioulos e híbridos. (a) BR SC 154, (b) detalhe do formato elipsóide do grânulo de amido individualizado da variedade híbrida BR SC 154, (c) RJ-0, (c) Fortuna, (d) RXE-1. Barras = (a, c, d) 10µm; (b) 5µm. As setas relevam a presença de fibras no material amostral.

As discrepâncias de solubilidade e poder de inchamento de grânulos de amido de fontes botânicas e genótipos são determinados, em alguma extensão, pela organização e padrão morfológico dos grânulos daquele

polímero (Figuras 13a e 13b) e também pelas diferenças nos teores de amilose e lipídios (Tabelas 4 e 5). De fato, o grânulo de amido se torna mais susceptível à desintegração durante o processo de solubilização e expansão, liberando maior quantidade de material solúvel durante sua desintegração, i.e., lixiviação da amilose (SINGH et al., 2003).

De acordo com Gray e BeMiller (2004), os métodos microscópicos fornecem evidências visuais dos sítios de reação nos grânulos de amido, ainda que o conhecimento detalhado das reações que ocorrem nestes locais requiera métodos dedicados. Os primeiros sítios reativos nos grânulos de amido são as regiões amorfas. No entanto, a reologia da dispersão do amido depende da concentração de grânulos, tamanho, distribuição dos grânulos, forma, deformação e das interações entre grânulos.

Genovese e Rao, (2003) demonstraram que o tamanho dos grânulos afetou a gelatinização em milho ceroso e sugerem que especial atenção deverá ser dada durante o empastamento, uma vez que este processo determina o inchamento e a integridade dos grânulos de amido. O aquecimento acima da temperatura de gelatinização resulta na desintegração dos grânulos, causando diminuição no volume destes e exsudação de seu conteúdo interno, especialmente amilose, para a suspensão. No entanto, a elasticidade da rede de amilose gelatinizada aumenta com o volume do grânulo e sua dureza. Os resultados aqui encontrados correlacionam-se com a gelatinização dos amidos, poder de inchamento, índice de solubilidade e capacidade de retenção da água, sugerindo que o grau de desordem e as diferenças morfológicas dos grânulos de amido afetaram significativamente a reologia e as pastas dos amidos das VMC. Em seu conjunto, estes resultados justificam, uma vez mais, a importância do conhecimento das características das frações macromoleculares da biomassa das VMC, especialmente no que se refere ao seu uso dedicado em âmbito industrial.

5.4 Propriedades térmicas de amidos

As temperaturas de gelatinização durante o aquecimento da suspensão aquosa de amidos de milho, a saber: temperatura de início de

gelatinização (**To**), temperatura no meio (**Tm**) e final de gelatinização (**Tc**) são mostradas na tabela 6, enquanto seus termogramas em DSC são apresentados nas Figuras 14a, 14b e 14c. **To** e **Tc** variaram de 67,15°C a 75,85°C e 72,64°C a 78,76°C, respectivamente. As variedades LP-0 (71,74°C), R8C-1 (75,85°C) e BR SC 154 (74,09°C) apresentaram elevadas temperaturas de início de gelatinização. Picos de gelatinização durante todo fluxo de aquecimento (desde 20°C) foram observados apenas para as variedades LP-0, RJ-0 e MPA1-0 (37,50°C; 41,32°C; 42,78°C) com entalpias de gelatinização de [8,37 kcal/g (0,035 J/g), 114,25 kcal/g (0,47821 J/g) e 51,01 kcal/g (0,21352 J/g)], respectivamente. Esse fato ocorreu porque durante o aquecimento as moléculas na região amorfa do amido sofrem uma transição de fase (sólido rígido → sólido elástico). Acima dessa temperatura, ocorre fusão completa dessas moléculas, passando à fase aquosa, um fenômeno chamado transição vítrea. De acordo com Mestres (1966), isto ocorre em condições de baixa umidade (25% p/p), sendo este fenômeno importante à retrogradação do amido. Cereda et al. (2002) comentam que amidos apresentam áreas cristalinas e amorfas, o que está relacionado à presença de macromoléculas ramificadas e lineares. Áreas cristalinas mantêm a integridade dos grânulos, permitindo que ocorra o inchamento destes e a não completa dispersão das macromoléculas. Durante o aquecimento de uma suspensão aquosa de amido, as áreas amorfas absorvem água rapidamente e incham, porém a estrutura do grânulo é mantida em alguma extensão pelas regiões cristalinas. Os grânulos inchados são elásticos e responsáveis pela viscosidade das pastas. A transição vítrea ocorre preferencialmente nessas regiões por sofrerem mudanças de fases mesmo a temperaturas baixas a de gelatinização (**Tg**).

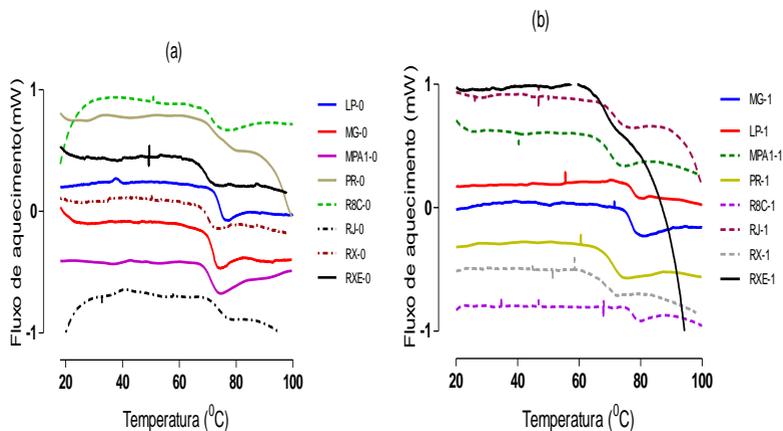
De acordo com Cereda et al. (2002), temperaturas de gelatinização de amidos nativos de milho variam de 62°C a 70°C, com entalpia média de 14 J/g. No entanto, o presente estudo revelou temperaturas acima destas, fato que é explicado pela existência de fortes interações intragranulares no amido, presença de lipídios e ramificações de amilopectina, o que requer temperaturas elevadas para a gelatinização. A não observância dos picos de gelatinização pode ser devida ao teor de umidade das amostras em estudo (30% de água). Baixas temperaturas de gelatinização refletem fraca cristalinidade no amido, enquanto que altas temperaturas, conforme

observado neste estudo indica alto grau de cristalinidade das moléculas (SINGH et al., 2009).

Tabela 6- Propriedades térmicas dos amidos de milho determinadas por calorimetria diferencial de varredura (DSC). **To** = Temperatura no início de gelatinização; **Tc** = temperatura no final da gelatinização; **Tm** = Temperatura no meio da gelatinização.

Variedade	Temperaturas de Gelatinização		
	Início To (°C)	Meio Tm (°C)	Fim Tc (°C)
LP-0	71,74	73,80	75,43
MG-0	69,96	71,74	73,34
MPA1-0	68,70	70,71	72,87
PR-0	69,03	74,01	78,21
R8C-0	69,26	71,25	73,41
RJ-0	70,84	73,92	76,80
RX-0	70,18	72,12	74,03
RXE-0	68,95	70,67	73,03
LP-1	74,51	76,88	78,76
MG-1	75,88	77,06	78,40
MPA1-1	67,23	69,88	72,64
PR-1	67,15	70,36	73,58
R8C-1	75,85	76,86	77,92
RJ-1	67,93	71,42	74,48
RX-1	66,10	69,73	73,62
RXE-1	66,72	68,95	73,49
BRSC154	74,09	76,42	78,73
FORTUN.	67,62	69,99	72,35

Os resultados das propriedades térmicas dos amidos (Tabela 6) podem também ser explicados pela estrutura e organização interna dos grânulos daquele polímero. Barichello et al. (1990), em estudo similar, observaram que altas temperaturas de transição resultam do elevado grau de cristalinidade do amido, o qual providencia uma estabilidade estrutural ao grânulo, tornando-o mais resistentes à gelatinização. De acordo com os mesmos autores, amidos com longas cadeias de ramificação da amilopectina caracterizam-se por uma alta temperatura de gelatinização, conforme observado neste estudo. De fato, valores térmicos elevados são indicativos de maior requerimento energético para gelatinizar as longas cadeias ramificadas de amilopectina. As diferenças entre cultivares também podem ser atribuídas à presença de regiões cristalinas na estrutura dos grânulos de amido dessas variedades. As Figuras 14a, 14b e 14c mostram os endotérmicos dos amidos de milho em estudo obtidas via DSC revelando que as variedades apresentaram perfis similares durante o aquecimento da pasta de amido.



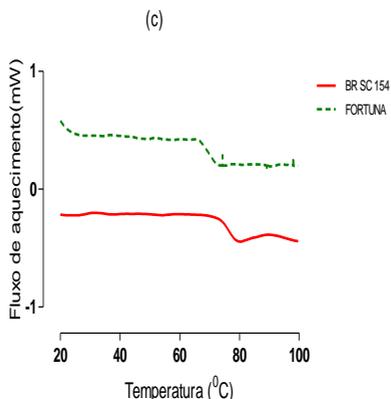


Figura 14-Termogramas de DSC dos amidos de milho obtidos em suspensão amido-água de 30%. **(a)** amidos de grãos de variedades crioulas - geração F0; **(b)** amidos de grãos de variedades crioulas - geração F1 e **(c)** amidos de grãos de variedades híbridas.

Diferenças em temperaturas de gelatinização nas variedades estudadas podem também ser atribuídas à variedade e condições do campo onde foram cultivadas (CEREDA et al., 2002). Além disto, o teor de umidade da biomassa amostral também afeta as temperaturas de gelatinização. Fredriksson et al. (1998) descreveram temperaturas de gelatinização de 59,6°C a 64,4°C para milho ceroso, com 60% de umidade. De outra forma, Shi e Seib, (1992) detectaram temperatura de gelatinização de 67°C, para amostras de milho ceroso com teor de umidade de 75%. De acordo com estes autores, a temperatura de gelatinização é controlada pelas regiões amorfas. Além disto, a temperatura de gelatinização mostra-se como função direta dos teores de amilose (KNUTSON, 1990), sendo também determinada pelo conteúdo de amido danificado e técnica de isolamento do amido (FREDRIKSSON et al., 1998). Berski et al. (2010) e Noda et al. (2005) detectaram amplitudes de valores de temperatura de gelatinização para aveia e batata de 60°C-65°C e 59,7°C-67°C, respectivamente. Segundo estes autores a presença de lipídeos influenciou para elevadas temperaturas de gelatinização, outro fator que pode ter levado as temperaturas encontradas neste estudo.

5.5 Propriedades da pasta dos amidos de milho

Os dados das variáveis picos de viscosidade, temperaturas de empastamento, temperaturas nos picos de viscosidade, quebra, viscosidades finais e mínimas e a retrogradação estão sumarizados na Tabela 7 assim como seus viscoamilogramas estão representados nas Figuras 15a, 15b, 15c. A temperatura de empastamento providencia uma informação sobre a temperatura mínima necessária para cozinhar uma amostra de farinha de milho. Os valores das temperaturas no pico da viscosidade máxima das VMC situaram-se entre 68,7°C a 99,95°C. Temperaturas mais elevadas ao empastamento dos amidos foram detectadas para as variedades R8C-F1 (99,95°C), R8C-F0 (99,05°C), RXE-F1 (99,05°C) e RJ-F1 (94,5°C). De forma contrária, as variedades MPA1-F0 (69,85°C) e RX-F1 (68,7°C) apresentaram os menores valores daquela variável. Para as variedades híbridas, Fortuna apresentou temperatura de empastamento de 91,60°C, diferindo em relação à BR SC 154 (75,95°C).

A retrogradação variou de 22 a 796 cP para as VMC, enquanto as variedades híbridas apresentaram valores de 143cP (BR SC 154) e 211cP (Fortuna). Comportamentos distintos de retrogradação foram detectados para os genótipos crioulos em estudo entre as gerações F0 e F1. Na geração F0, os menores valores de retrogradação foram detectados para as variedades LP (76cP) e RX (99cP), enquanto tal comportamento foi observado na geração F1 para os genótipos RX (22cP) e MPA1(169cP).

A temperatura na subida da viscosidade foi similar para todas as variedades, com valores em torno de 49°C. Por sua vez, valores superiores de viscosidade foram detectados para as variedades MG-F0 (343cP), R8C-F0 (212cP) e LP-F0 (200cP). Na geração F1, comportamento semelhante foi novamente observado para as variedades R8C (227cP) e LP (217), enquanto RX (247cP) destacou-se pelo maior valor de viscosidade da pasta de amido. Variedades híbridas apresentaram baixas viscosidades relativamente ao material crioulo.

Tabela 7. Características funcionais da pasta dos amidos de grãos de milho de variedades crioulas (gerações F0 e F1) e híbridas. Temperatura de empastamento - **T_p** (°C), temperatura na subida da viscosidade - **T_{pv}** (°C), pico da viscosidade - **V_p**, em centiPoise (cP) , Quebra (cP, calculada como viscosidade pico-viscosidade mínima), **V_f**, Viscosidade final (cP), Retrogração (cP, calculada como viscosidade final-viscosidade mínima), e **V_{min}**, viscosidade mínima na manutenção a 95^oC, expressa em (cP).

Variedade	Propriedades da pasta dos amidos						
	Temperatura no pico de viscosidade máxima	Temperatura Na subida da viscosidade	Pico de viscosidade	Viscosidade final	Viscosidade mínima	Quebra	Retrogração
	(°C)	(°C)	(cP)	(cP)	(cP)	(cP)	(cP)
MPA1-0	69,85	48,95	193	125	12	181	113
PR-0	87,95	49,05	188	228	37	151	191
MG-0	91,60	48,75	343	291	112	231	179
LP-0	69,90	48,95	200	125	49	151	76
R8C-0	95,05	48,90	212	772	94	18	578
RJ-0	75,15	49,20	179	446	103	76	343
RXE-0	74,70	49,05	188	176	36	152	140
RX-0	79,95	49,05	212	145	46	166	99
MPA1-1	87,60	49,05	191	224	55	136	169
PR-1	69,55	48,90	188	374	77	111	297
MG-1	92,50	49,05	201	697	180	21	517
LP-1	86,85	48,70	217	271	70	147	201
R8C-1	99,95	48,95	227	826	197	30	796
RJ-1	94,50	49,00	175	318	50	125	268
RXE-1	99,05	49,10	190	484	105	85	379
RX-1	68,70	48,70	247	105	83	164	22
FORT	91,60	49,05	170	251	40	130	211
BR SC 154	75,95	48,95	177	159	16	161	143

A viscosidade das pastas de amidos de cereais é determinada principalmente por fosfolipídeos que formam complexos com moléculas de amilose, retardando ou mesmo impedindo o inchamento dos grânulos. No entanto, outros efeitos estão relacionados à baixa solubilidade da amilose, tais como retardamento no empastamento e à limitada formação do gel de amido e o poder de inchamento (BERSKI et al., 2011). Os resultados aqui encontrados estão de acordo com relatos prévios em milho normal e ceroso (SHIRAI et al., 2007). As Figuras 15a, 15b e 15c

representam os amilogramas de viscosidade durante o aquecimento da pasta a diferentes temperaturas em visco analisador rápido.

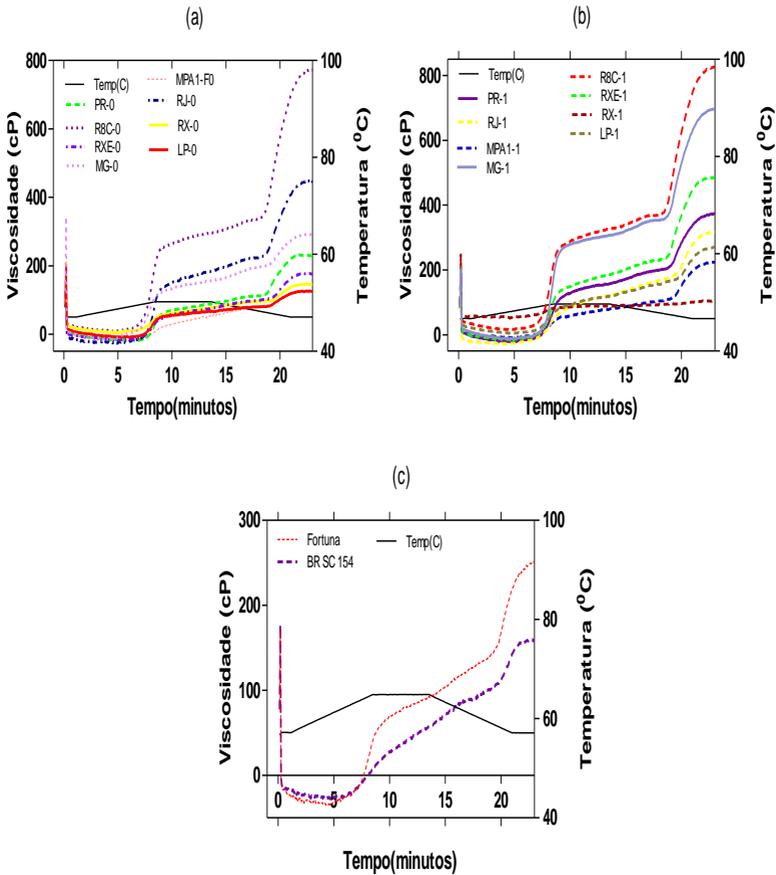


Figura 15-Curvas de viscosidade das pastas de amidos de milhos crioulos das gerações F0 (a) e F1 (b) e de variedades híbridas (c), determinadas em visco analisador rápido (RVA), utilizando-se uma suspensão com amido-água (30%).

O perfil dos viscoamilogramas (Figuras 15a, 15b, 15c) revelou alguma similaridade de comportamento viscoelástico para as amostras das duas gerações das VMC e também para as variedades híbridas. Blazek e Copeland (2008) referem que amidos cerosos produzem dispersões altamente gelatinosas durante o cozimento e formam géis suaves e leves. Ao contrário, proporções elevadas de amilose contribuem para o endurecimento e firmeza de géis de amido. Em géis constituídos basicamente de amilose, a interação entre moléculas envolve a formação de cadeias agregadas às duplas hélices. O aumento destas agregações na rede de amilose (gel) influencia a dimensão da rede do amido. Em amidos com baixo a médio teor de amilose, a amilopectina desempenha maior papel na rede de amido. À medida que o teor de amilose cresce na dispersão, aumenta a viscosidade desta, (BLAZEK; COPELAND, 2008; CEREDA et al., 2002), conforme observado para algumas das VMC neste estudo. Baixas temperaturas de empastamento (i.e., MPA1-0, MG-0, RX-1, PR-1) representam um potencial favorável das matérias-primas das VMC à produção de alimentos de preparo instantâneo como macarrões, sopas e sobremesas (i.e., pudins). As características viscoelásticas das VMC também determinam o potencial de aplicação do amido. Os amidos de cereais em geral são mais consistentes, opacos e de viscosidades mais baixas do que de tuberosas, e são usados na elaboração de sobremesas. A quebra representa a fragilidade dos grânulos inchados por ação do calor e agitação mecânica. No entanto, as variedades de milho que revelaram alta viscosidade (Tabela 9) podem ser usadas em substituição do amido da batata (mais caro e pouco disponível) na indústria, assim como aqueles com baixa viscosidade poderão ser usados, dependendo das características do produto desejado.

5.6 Espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR)

Os resultados da análise das farinhas de milho por FT-IR estão sumarizados nas Figuras 16a, 16b e 16c para as variedades da F0, F1 e híbridas, respectivamente. A análise destes espectros mostra a presença de diversos compostos do metabolismo primário (*fingerprinting*), e.g., proteínas, lipídeos, amilose e amilopectina, bem como bandas oriundas de metabólitos secundários (i.e., fenólicos, terpenóides).

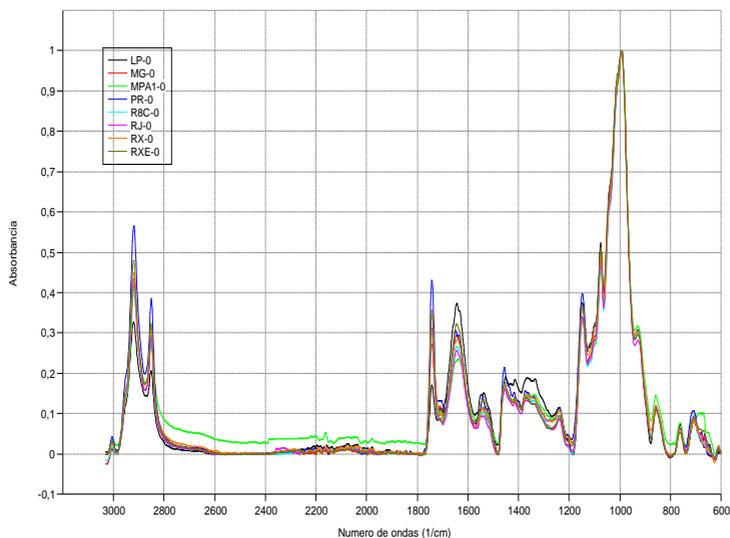


Figura 16a-Perfil espectral de infravermelho médio (FT-IR, 3000-600 cm^{-1}) de farinhas de variedades crioulas de milho – geração F0.

As bandas de maior intensidade representadas nas figuras 16a, 16b e 16c estão relacionadas com amilose e amilopectina. A presença de proteínas pode ser encontrada nas bandas 1235, 1245, 1655, 1665, 1670, 1675 e 1685 cm^{-1} . Lipídeos podem ser relacionados às bandas de 800-1100, 1266, 1300, 1444, 1660, 1670, 1750, 2850, 2885, 2940, 2970 cm^{-1} (SCHULZ; BARANSKA, 2007). A análise dos espectros permitiu detectar que a maioria das bandas encontra-se na região de *fingerprinting* (700-1500 cm^{-1}), havendo grande similaridade de perfis entre as variedades da F0. A Tabela 8 mostra as bandas de maior intensidade e os compostos relacionados, conforme relatado por Schulz e Baranska (2007) e Downey, (1998). De acordo com estes autores, terpenóides como o β -caroteno e a luteína podem ser identificados em 1140-1150 cm^{-1} , fato observado para todas as variedades em estudo (Tabela 8).

Tabela 8-Classes de compostos detectados nos espectros de FT-IR (3000-600 cm⁻¹) de farinhas das variedades crioulas de milho, geração F0.

Numero de			Numero de		
Variedade	ondas (1/cm)	Composto	Variedade	ondas (1/cm)	Composto
LP-0	2922	Lipídeos	RBC-0	2922	Lipídeos
	2852	Lipídeos		2852	Lipídeos
	1644	Proteínas		1744	Aminoácidos
	1148	Terpenóides#		1646	Proteínas
	1076	Lipídeos		1148	Terpenóides#
	994	AM/AP		1076	Lipídeos
	992	Aminoácidos		992	AM/AP
MG-0	2922	Lipídeos	RJ-0	2920	Lipídeos
	2852	Lipídeos		2852	Lipídeos
	1744	Aminoácidos		1744	Aminoácidos
	1646	Proteínas		1646	Proteínas
	1148	Terpenóides#		1148	Terpenóides#
	1076	Lipídeos		1076	Lipídeos
	994	AM/AP		994	AM/AP
MPA1-0	2920	Lipídeos	RX-0	2922	Lipídeos
	2850	Lipídeos		2852	Lipídeos
	1742	Aminoácidos		1742	Aminoácidos
	1638	Proteínas		1642	Proteínas
	1148	Terpenóides#		1148	Terpenóides#
	1076	Lipídeos		1076	Lipídeos
	994	AM/AP		994	AM/AP
PR-0	2920	Lipídeos	RXE-0	2922	Lipídeos
	2852	Lipídeos		2852	Lipídeos
	1744	Aminoácidos		1744	Aminoácidos
	1650	Proteínas		1646	Proteínas
	1456	Sacarose		1148	Terpenóides#
	1148	Terpenóides#		1076	Lipídeos
	1076	Lipídeos		992	AM/AP
	992	AM/AP			

AM = Amilose, AP = Amilopectina
β -Caroteno e Luteína

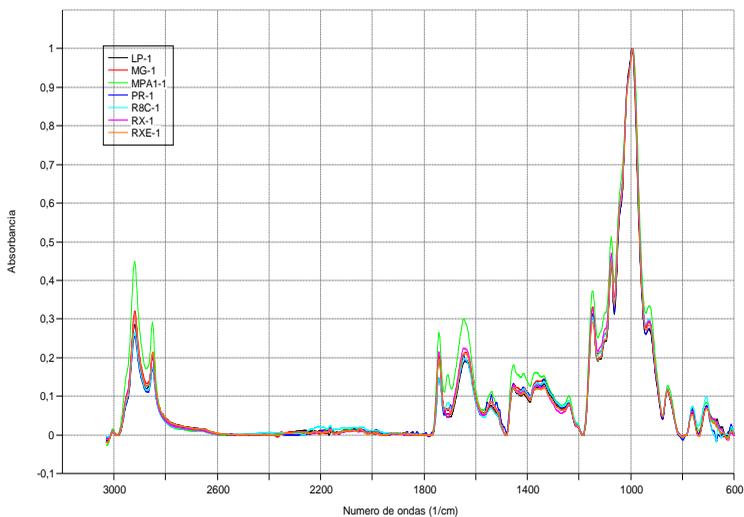


Figura 16b-Especros de infravermelho médio (FT-IR, 3000-600 cm^{-1}) de amostras de farinhas de variedades crioulas de milho (F1).

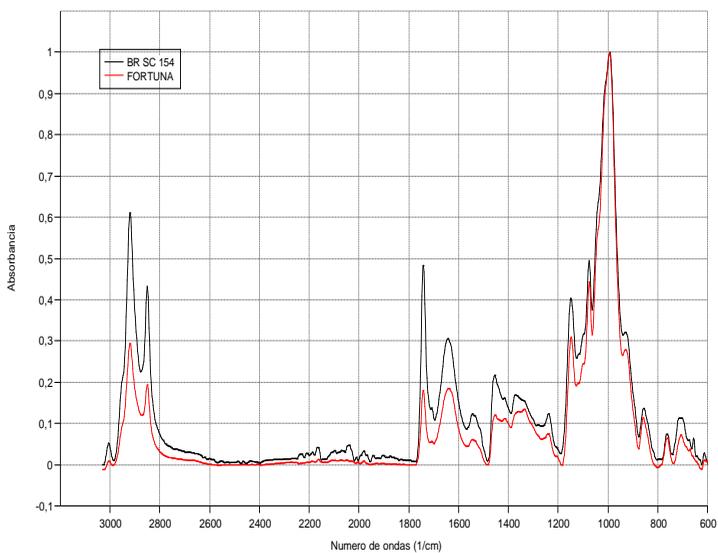


Figura 16c-Especros de infravermelho médio (FT-IR, 3000-600 cm^{-1}) de amostras de farinhas de variedades híbridas milho.

Tabela 9-Bandas características e seus compostos representantes em FT-IR (SCHULZ; BARANSKA, 2007).

Metabólitos	Composto	Banda característica (1/cm)	Grupamentos funcionais	
Aminoácidos	Metionina	630 • 670	C-S	
		700 • 746	C-S	
		2550 • 2550	S-H	
	Tirosina	850/830		
		1380		
	Triptofano	880		
		760		
	Fenilalanina	1008		
Ácido aspártico	1400•1430	(C=O)O		
Ácido glutâmico	1700•1750	(C=O)OH		
Proteínas	α-hélices	1655	CONH (Amida)	
		>1275	CONH (Amida)	
	Estrutura anti-paralela	1670	CONH (Amida)	
	Estrutura solvatada	1665	CONH (Amida)	
	Estrutura não ligada a hidrogênio	1245	CONH (Amida)	
		1685	CONH (Amida)	
Lípidos		3008	(=C-H)	
		2970	(CH ₃)	
		2940	(CH ₂)	
		2885	(CH ₃)	
		2850	(CH ₂)	
		1750	(C=O)	
		1670	(C=C) trans	
		1660	(C=C) cis	
		1444	(CH ₂)	
		1300	(CH ₂)	
		1266	(=C-H)	
		1100 • 800	(C-C)	
Monossacarídeos	α-glucose	847	(C-O-C)	
	β-glucose	898	(C-O-C)	
	β-frutose	898	(C-O-C)	
Dissacarídeos	Sacarose	1482	(C-O-C)	
		1126	(C-O-C)	
	Maltose	847	(C-O-C)	
		898	(C-O-C)	
		847	(C-O-C)	
Polissacarídeos	Celulose	898	(C-O-C)	
	Hemicelulose	1739		
	Amilose α	941		
	Amilopectina	898		
Terpenos		477		
		β-caroteno	1524, 1157, 1009, 1004	
		Luteína	1527	
			1157	
			1004	
Fenólicos	Antocianinas	800, 750, 800, 900, 920		
		1260, 1180		

Tabela 10-Classes de compostos detectados nos espectros de FT-IR (3000-600 cm⁻¹) de farinhas das variedades crioulas de milho, geração F1.

Variedade	Numero de		Variedade	Numero de	
	ondas (1/cm)	Composto		ondas (1/cm)	Composto
LP-1	2920	Lipideos	R8C-1	2922	Lipideos
	2852	Lipideos		1148	Terpenoides#
	1744	Aminoacidos		1076	Lipideos
	1148	Terpenoides#		994	AM/AP
	1076	Lipideos			
	996	AM/AP			
MG-1	2920	Lipideos	RX-1	2922	Lipideos
	2852	Lipideos		2852	Lipideos
	1742	Aminoacidos		1744	Aminoacidos
	1638	Proteinas		1646	Proteinas
	1148	Terpenoides#		1148	Terpenoides#
	1076	Lipideos		1076	Lipideos
	994	AM/AP	994	AM/AP	
MPA1-1	2922	Lipideos	RXE-1	2920	Lipideos
	2852	Lipideos		2852	Lipideos
	1744	Aminoacidos		1642	Proteinas
	1646	Proteinas		1148	Terpenoides#
	1148	Terpenoides#		1076	Lipideos
	1076	Lipideos		994	AM/AP
	992	AM/AP			
PR-1	2922	Lipideos			
	1648	Proteinas			
	1148	Terpenoides#			
	1076	Lipideos			
	994	AM/AP			

β -Caroteno e Luteína

AM = Amilose, AP = Amilopectina

A análise dos perfis espectrais de FT-IR (Figuras 16a, 16b, 16c) revelou similaridade de composição química das amostras de farinhas das variedades crioulas, assim como das variedades híbridas. Porém, não raro, a análise visual dos espectros de FT-IR não permite a extração de quantidades maximizadas de informações, de modo que a adoção de técnicas estatísticas multivariadas (análises de cluster, de fator

discriminante e de componentes principais, por exemplo) possibilita um entendimento mais detalhado das eventuais discrepâncias e/ou similaridades existentes no conjunto de dados espectrais.

São escassos os trabalhos relatados na literatura sobre análises de FT-IR em variedades crioulas de milho. Os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com aqueles reportados previamente por Kuhnen (2007). Os genótipos apresentaram um perfil de bandas semelhantes, o que sugere similaridades de composição química. Os picos de maior intensidade detectados neste estudo, e.g., 900-1300 cm^{-1} , se referem à presença de amilose, amilopectina, amido, celulose e pectina, lipídeos (2851-2920 cm^{-1}) e proteínas (1400-1500 cm^{-1}). Estes resultados são confirmados pelas análises histoquímicas e físico-químicas das VMC em estudo.

5.7 Análise de componentes principais (PCAs)

Neste estudo a análise de componentes principais foi usada para comparar o conjunto de dados espectrais de infravermelho (FT-IR). A análise de componentes principais é um dos mais versáteis métodos quimiométricos, por reduzir a dimensionalidade dos dados e preservar a variância sem a necessidade de muito conhecimento da definição dos dados (ERIKSSON et al., 2001). A aplicação de PCAs neste estudo para fins de análise do perfil metabólico primário (*fingerprinting*) permitiu uma separação clara entre as variedades crioulas e híbridas, a partir do cálculo dos componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2), conforme demonstrado na Figura 16d. Grande parte da variabilidade dos dados pode ser explicada por PC1 (66%), comparativamente ao PC2 (15%), no entanto, ambos expressaram 81% do total da variância dos dados espectrais de FT-IR. As variedades crioulas da geração F1 e híbridas agruparam-se em PC1 negativo, contrariamente ao observado para VMC-F0 (PC +), exceto para o genótipo MG-0. De fato, a discriminação dos genótipos ocorreu majoritariamente ao longo de PC1, ainda que MPA1-0 (PC1 +/PC2 +) e LP-0 (PC1 +/PC2 -) tenham apresentado uma composição química singular em relação aos demais genótipos em estudo. Não foi possível determinar as bandas espectroscópicas que causaram a tal separação entre as variedades em estudo, requerendo um estudo ainda mais minucioso.

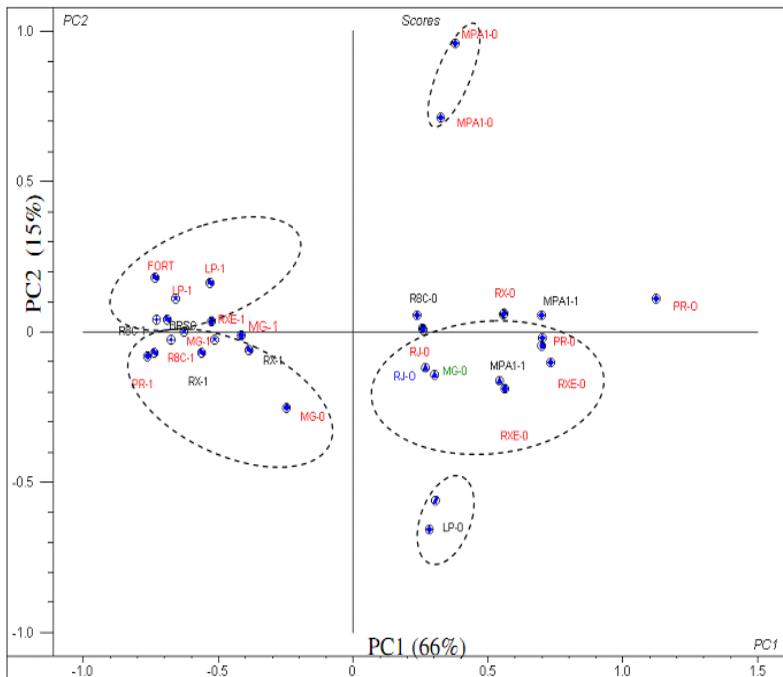


Figura 16d-Distribuição fatorial dos componentes principais (PC1 x PC2), calculados a partir dos dados espectrais (FT-IR, 3000 – 600 cm^{-1}) de farinhas de variedades crioulas (F0 e F1) e híbridas de milho.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho analisou-se o perfil de metabólitos primários (proteínas, lipídeos e amido) de grãos de VMC, via técnicas histoquímicas e espectroscópicas, assim como se procedeu à caracterização físico-química, térmica e da pasta dos amidos e farinhas daqueles genótipos, permitindo concluir que:

- a) As amostras de grãos das variedades F0 reagiram mais intensamente em relação às amostras da geração F1 e híbridas, perante azul de Toluidina, ácido periódico de Schiff e azul brilhante de Coomassie, sugerindo a ocorrência de maior teor de polissacarídeos ácidos, amido, celulose e proteínas naquele material.
- b) Variedades da F0 apresentaram elevados teores de proteínas, em geral superiores a aqueles relatados na literatura e podem ser explorados na geração de derivados ricos em proteínas.
- c) A análise das farinhas de milhos crioulos e de variedades híbridas, via FT-IR e quimiometria, revelou a presença de proteínas, lipídeos, amilose e amilopectina, celulose, como maiores bandas espectrais. No entanto, foi notória nas bandas a presença de vários outros polissacarídeos; compostos do metabolismo secundário (ex: fenólicos, terpenóides), fato que nos leva a concluir que este material crioulo possui uma diversidade química bastante vasta de compostos do metabolismo primário, que podem ser explorados na indústria agroalimentar.
- d) As biomassas das VMC apresentaram baixos valores de poder de inchamento, índice de solubilidade e capacidade de retenção de água das farinhas.
- e) Os genótipos crioulos MG-0, MPA1-1, LP-1, RXE-1 mostraram-se como fontes de apreciáveis de lipídeos.
- f) O tamanho de grânulos de amido foi bastante heterogêneo nas variedades de milho, com predomínio de grânulos arredondados e com presença de fibras na matriz.

- g) Conteúdos superiores de amilose foram encontrados para as variedades Fortuna, R8C-0 e RJ-0, revelando o potencial diferenciado daqueles genótipos com fontes daquele polissacarídeo às indústrias afins, e.g., geração de novos produtos ou modificação estrutural química para determinados fins alimentares, cosméticos e/ou farmacêuticos.
- h) A análise da calorimetria diferencial de varredura revelou baixas temperaturas de empastamento para as variedades MPA1 e RXE da F0 e valores elevados foram observados para LP-0 e RJ-0. Amidos com baixa temperatura de empastamento podem ser usados para processamento de alimentos de rápido cozimento, um aspecto de interesse industrial, especialmente na elaboração de alimentos de preparo rápido.
- i) Variedades RJ, RXE, PR da F0 exibiram menores viscosidades, sugerindo reduzido peso molecular das macromoléculas.
- j) Variedades RJ e R8C (F0) apresentaram maior tendência a retrogradação. No geral, as variedades F1, apresentaram maior retrogradação, característica dos amidos nativos. Dependendo do caso, amidos com alta retrogradação podem constituir um problema no armazenamento, principalmente quando o produto passa por ciclos de congelamento e descongelamento.
- k) Tanto amidos e farinhas das variedades F0, F1 e híbridas apresentaram algumas características desejáveis (alta viscosidade, baixa temperatura de empastamento, elevado teor de lipídeos assim como teor médio de amilose) e podem ser usados para a obtenção de alguns produtos na indústria (Pães, pudins, sobremesas), fato que pode agregar mais valor, mais aplicabilidade e gerar novas perspectivas de uso destas variedades crioulas de milho e incentivo ao pequeno agricultor que vem desenvolvendo essas variedades ao longo de décadas.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBOOYE, V.C.; SINGH, V. Physico-chemical properties of the flours and starches of two cowpea varieties (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Innovative Food Science and Emerging Technologies** 9, 92-100 (2008).

ALEXANDER, R.J. New starches for food application. **Cereal Foods World** 41, 796-799 (1996).

AMANTE, E.R. Caracterização de amidos de variedades de mandioca (*Manihot esculenta*, crantz) e da batata doce (*Ipomoea batatas*). Dissertação. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade de Viçosa, Minas Gerais. Brasil (1986).

ATWEL, W.L.; HOOD, L.F.; LINEBACK, D.R.; VANIANSMARSTON, E.; ZOBEL, H.F. The terminology and methodology associated with basic starch phenomena. **Cereal Foods World** 33, 306-311 (1988).

ARYEE, F.N.A.; ODURO, I.; ELLIS, W.O.; AFUAKWA, J.J. The physicochemical properties of flour samples from the roots of 31 varieties of cassava. **Food Control** 17, 916-922 (2006).

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of the AOAC International, 18th ed. Maryland/USA: AOAC 991.16, (1994).

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of the AOAC International, 18th ed. Maryland/USA: AOAC 991.20, (2005).

ARAUJO, P.M; NASS, L.L. Caracterização e avaliação de populações de milho crioulo. **Scientia Agrícola** 59, 589-593 (2002).

ARAUJO, C. Variação da produtividade de milho no Brasil: A produtividade conseguida pela cultura do milho no Brasil varia muito. **EMBRAPA, Milho e Sorgo**. Edição agronegócio. (2009).

BARICHELLO, V.; YADA, R.Y.; COFFIN, R.H.; STANLEY, D.W. Low temperature sweetening in susceptible and resistant potatoes: Starch structure and composition. **Journal of Food Science** 54, 1054-1059 (1990).

BATISTA, W.L.; DA SILVA, C.E.M.; LIBERATO, M.C. Propriedades químicas e de pasta dos amidos de trigo e milho fosforiados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 30, 88-93 (2010).

BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta** 1767, 1073-1101 (2007).

BELLO-PEREZ, L.A.; RODRIGUEZ-AMBRIZ, S.L.; AGAMA-ACEVEDO, E.; SANCHEZ-RIVERA, M.M. Solubilization effects on molecular weights of amylose and amylopectins of normal maize and barley starches. **Cereal Chemistry** 86, 701-705 (2009).

BERSKI, W.; PTASZEK, A.; ZIOBRO, R.; KOWALSKI, M., GRZESIK, B.; ACHREMOWICZ, B. Pasting and rheological properties of Oat starch and its derivatives. **Carbohydrate Polymers** 83, 665-671 (2010).

BERARDO, N.; BRENNA, O.V.; AMATO, A.; PISACANE, V.; MOTTO, M. Carotenoids concentration among maize genotypes measured by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). **Innovative Food Science and Emerging Technologies** 5, 393-398 (2004).

BEMILLER, J.N. Starch modification: Challenges and prospects. **Starch/Starke** 49, 127-131 (1997).

BEHALL, K.M.; SCHOLFIELD, D.J. Food amylose content affects postprandial glucose and insulin responses. **Cereal Chemistry** 82, 654-659 (2005).

BEUCHAT, L.R. Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 25, 258-261 (1997).

BILIADERIS, C.G. The structure and interactions of starch with food. **Physiology Pharmacology** 69, 60-78 (1991).

BOUZON, Z.L. Aspectos histoquímicos e ultraestruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídeos de *Hypnea musciformis* (Gigartinales-Rhodophyta). Dissertação. Universidade Federal de Paraná. Paraná. Brasil. (1993).

BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biology Macromolecules** 23, 85-112 (1998).

BLAZEK, J.; COPELAND, L. Pasting and swelling properties of wheat flour and starch in relation to amylose content. **Carbohydrate Polymers** 71, 380-387 (2008).

BRANDEMARTE, E.A.; FRANCO, C.M.L.; LOPES-FILHO, J.F. Physicochemical properties of maize starch obtained from intermittent milling and dynamic steeping (IMDS) under various steeping conditions. **Cereal Chemistry** 81, 369-376 (2004).

CAI, Y.X.; WANG, W.; ZHU, Z.W.; ZHANG, Z.J.; YANG, J.C.; ZHU, Q.S. The physicochemical characteristics of amylopectin and their relationships to pasting properties of rice flour in different varieties. **Science Agriculture Sinica** 39, 1122-1129 (2006).

CAPOBIANGO, M. Extração das proteínas de fubá de milho e obtenção de hidrolisados protéicos com baixo teor de fenilalanina. Dissertação. Ciência de Alimentos. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. Brasil. (2006).

CEREDA, M.P., FRANCO, C.M.L., DAIUTO, E.R., DEMIATE, I.M., CARVALHO, L.J.C.B., LEONEL, M., VILPOUX, O.F., SARMENTO, S.B.S. Propriedades gerais do amido - culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas. Vol.1, Ed. Fundação Cargill, São Paulo. Brasil. (2002).

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento de safra brasileira 2010/2011: Grãos, Terceiro

levantamento, Dezembro de 2010. Brasília: Conab, Publicação mensal, 1-14. (2010).

CORREA, C; WEID, J.M.V.D. Variedades crioulas na lei de sementes. Avanços e impasses. **Agriculturas** 3, 11-14 (2006).

CONDE-PETIT, B.; NUESSELI, J.; HANDSCHIN, S.; ESCHER, F. Comparative characterization of aqueous starch dispersion by light microscopy, reometry and iodine binding behavior. **Starch/Stärke** 50, 184-192 (1998).

CHEN, M-H.; BERGMAN, C.J. Method for determining the amylose content, molecular weights, and weights-and molar-based distributions of degree of polymerarization of amylose and fine-structure of amylopectin. **Carbohydrate Polymers** 69, 562-578 (2007).

DAUTANT, F.J.; SIMANCAS, K.; SANDOVAL, A.J.; MULLER, A.J. Effect of temperature, moisture and lipid content on the rheological properties of rice flour. **Journal of Food Engineering** 78, 1159-1166 (2007).

DAIUTO, E.R. Desenvolvimento de grânulos de amido durante o crescimento secundário de raízes de mandioca dos cultivares Mico e Branca de Santa Catarina. Dissertação. Agronomia/Horticultura, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, São Paulo. Brasil. (2000).

DEMIATE, I.M; DUPUY, N.; HUVENNE, J.P.; CEREDA, M.P.; WOSIACKI, G. Relationship between baking behaviour of modified cassava starches and starch chemical structure determined by FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers** 42, 149-158 (2000).

DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS ESTADOS UNIDOS (USDA): World Agricultural Supply and Demand Estimates (WASDE): Produção mundial de grãos. Dezembro de 2010. Disponível em <http://www.apavi.com.br>, acessado em 03 de Janeiro de 2011.

DERICKE, V.; VANDEPOTTE, G.E.; VERMEYLEN, R.; DE MAN, W.; GODERIS, B.; KOCH, M.H.J.; DELCOR, J.A. Starch gelatinization and amylose-lipid interactions during rice parboiling investigated by temperature resolved wide angle X-ray scattering and differential scanning calorimetry. **Journal of Cereal Science** 42, 334-343 (2005).

DEWILLIGEN, A.H.A The rheology of starch. In J. A. Radley (Ed.), Examination and analysis of starch and starch products. Applied Science Publishers Ltd. London. (1976a).

DEWILLIGEN, A.H.A. The manufacture of potato starch. In J. A. Radley (Ed.), Starch production technology. Applied Science Publishers Ltd. London. (1976b).

DIRETORIA DE DESENVOLVIMENTO DE NEGÓCIOS. Gerencia de Estudos e Assessoria: Unidade de Estudos Econômicos e Pesquisas (DESENBÁHIA). Boletim anual do Mercado de grãos: Milho Safra 2009/10 e Expectativas para 2010/2011, 1-14. Maio de 2010

DOMALTOVA, L.; RUCKEBUSCH, C.; DUPUY, N.; HUVERNE, J.P.; LEGRAND, P. Identification of modified starches using infrared spectroscopy and artificial neural network processing. **Applied Spectroscopy** 52, 329-338 (1998).

DOWNEY, G. Food and food ingredient authentication by mid-infrared spectroscopy and chemometrics. **Trends in Analytical Chemistry** 17, 418-424 (1998).

DUPUY, N. WOJCIECHOWSKI, C.T, HUVERNE, J.P., LEGRAND, P. Mid-infrared spectroscopy and chemometrics in corn starch classification. **Journal of Molecular Structure** 440, 551-554 (1997).

ERIKSSON, L.; JOHANSSON, E.; KETTANEH-WOLD, N.; WOLD, S. Multi-and megavariate data analysis. Principles and applications, 2nd ed. Umetrics Academy. Sweden. (2001).

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAOSTAT-2010). For a world without hunger. Disponível em <http://faostat.fao.org>, acessado em 05 de Dezembro de 2010.

FILHO, D.F. A cultura do milho. FUNEP, Editora UNESP. Brasil.(1992).

FORREST, B.; COVE, L. Identification and quantification of hydroxypropylation of starch by FT-IR. **Stache/Starke** 44, 179-183 (1992).

FRANCELLI, A.L; NETO, D.D. Produção do milho. Livraria e Editora Agropecuária. São Paulo. Brasil. (2000).

FRANCO, C.M.L.; DAIUTO, E.R.; DEMIATE, I.M.; CARVALHO, L.J.C.B.; LEONEL, M.; CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F.; SARMENTO, S.B.S. Propriedades gerais do amido. Fundação Cargill, Campinas. Brasil. (2001).

FRENCH, D. Organization of starch granules. In WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N.; PASCHAL, E.F. Starch: Chemistry and technology. 2nd ed. Academic Press. London. (1998).

FREDRIKSSON, H.; SILVERIO, J.; ANDERSSON, R.; ELIASSON, A.C.; AMAN, P. The influence of amylose and amylopectin characteristics on gelatinization and retrogradation properties of different starches. **Carbohydrate Polymers** 35, 119-134 (1998).

FREITAS, R.A.; PAULA, R.C.; FEITOSA, J; P.A.; ROCHA, S.; SIERAKOWSKI, M.R. Amylose contents, rheological properties and gelatinization kinetics of yam (*Dioscorea alata*) and cassava (*Manihot utilissima*) starches. **Carbohydrate Polymers** 55, 3-8 (2004).

GALLIARD, D.T.; BOWLER, P. Morphology and composition of starch. In GALLIARD, DT. Starch: properties and potential. Chichester: Wiley. **Critical Reports on Applied Chemistry** 13, 55-78 (1987).

GARCIA, M.A.; MARTINO, M.N.; ZARITZKY, N.E. Comparison of amylose enrichment procedures for food applications. **Cereal Chemistry** 72, 552-558 (1995).

GENOVESE, D.B.; RAO, M.A. Role of starch granule characteristics (volume fraction, rigidity, and fractal dimension) on rheology of starch dispersions with and without amylose. **Cereal Chemistry** 80, 350-355 (2003).

GEORGET, D.M.R.; BARKER, S.A.; BELTON, P.S. A study on maize proteins as a potential new tablet excipient. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 69, 718-726 (2008).

GOMAND, S.V.; LAMBERTS, L.; VISSER, R.G.F.; DELCOR, J.A. Physicochemical properties of potato and cassava starches and their mutants in relation to their structural properties. **Food Hydrocolloids** 24, 424-433 (2010).

GOMES, A.M.M., SILVA, C.E.M., RICARDO, N.M.P.S. Effects of annealing on the physicochemical properties of fermented cassava starch (polvilho azedo). **Carbohydrate Polymers** 60, 1-6 (2005).

GRAY, J.A.; BEMILLER, J.A. Development and utilization of reflectance confocal laser scanning microscopy to locate reaction sites in modified starch granules. **Cereal Chemistry** 81, 278-286 (2004).

HAN, X.Z.; HAMAKER, B.R. Amylopectin fine structure and rice starch past breakdown. **Journal of Cereal Science** 34, 279-284 (2001).

HAN, X-Z.; CAMPANELLA, O.H.; MIX, N.C.; HAMAKER, B.R. Consequence of starch damage on rheological properties of maize starch pastes. **Cereal Chemistry** 79, 897-901 (2002).

HERMANSSON, A.M.; SVEGMARK, K. Development in the understanding of starch functionality. **Trends in Food Science Technology** 7, 345-353 (1996).

HAUMANN, B.F. Corn research looks at changing oil content. **Inform** 7, 576-583 (1996).

HIGGINS, J.A.; HIGBEE, D.R.; DONAHO, W.T.; BROWN, I.L.; BELL, M.L.; BESSESEN, D.H. Resistant starch consumption promotes lipid oxidation. **Nutritional Metabolism** 1, 8 (2004).

Hoch, G.J. The starch search. **Food processing (Chicago)**, May, 60-63 (1997).

HOJILLA-EVANGELISTA, M.P.; JOHNSON, L.A. Sequential extraction processing of high-oil corn. **Cereal Chemistry** 80, 679-683. (2003).

HORMDOK, R., NOOMHORM, A. Hydrothermal treatments of rice starch for improvement of rice noodle quality. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie** 40, 1723-1731 (2007).

HU, G.; BURTON, C.; YANG, C. Efficient measurement of amylose content in cereal grains. **Journal of Cereal Science** 51, 35-40 (2010).

ISHIGURO, K.; NODA, T.; KITAHARA, K. Retrogradation of sweetpotato starch. **Starch/Starke** 52, 13-17 (2000).

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

JANE, J.S. Starch properties, modifications and applications. **Pure Applied Chemistry** 32A, 751-757 (1995).

JANE, J.; CHEN, Y.Y.; LEE, L.F.; MCPHERSON, A.E.; WONG, K.S.; RADOSAVLJEVIC, M.; KASEMSUWUN, T. Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties. **Cereal Chemistry** 76, 629-637 (1999).

KAUR, L., SINGH, N., SODHI, N.S. Some properties of potatoes and their starches II. Morphological, thermal and rheological properties. **Food chemistry** 79, 183-192 (2002a).

KAUR, L., SINGH, N., SODHI, N.S., GUJRAL, H.S. Some properties of potatoes and their starches I. Cooking, textural and rheological properties of potatoes. **Food Chemistry** 79, 177-181 (2002b).

KIM, Y.S.; WIESENBORN, D.P.; ORR, P.H.; GRANT, L.A. Screening potato starch for novel properties using differential scanning calorimetry. **Journal of Food Science** 60, 1060-1065 (1995).

KIM, S.; WILLETT, J.L. Isolation of amylose from starch solutions by phase separation. **STARCH/STARKE** 56, 29-36 (2004).

KUHNEN, S. Metabolômica e bioprospecção de variedades crioulas e locais de milho. Tese. Recursos Genéticos Vegetais. Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. Brasil. (2007).

KUHNEN, S.; LEMOS, P.M.M.; CAMPESTRINI, L.H.; DIAS, P.F.; MARASCHIN, M. Antiangiogenic properties of carotenoids: A potential role of maize as functional food. **Journal of Functional Foods** 1, 284-290 (2009).

KUHNEN, S.; OGLIARI, J.B.; DIAS, P.F.; SANTOS, M.F.; FERREIRA, A.G.; BONHAM, C.C.; WOOD, K.V.; MARASCHIN, M. Metabolic fingerprint of Brazilian maize landraces silks (Stigmata/styles) using NMR spectroscopy and chemometric methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 58, 2194-2200 (2010).

KNUTSON, C.A. Annealing of maize starches at elevated temperatures. **Cereal Chemistry** 67, 376-384 (1990).

KRUEGER, B.R.; WALKER, C.E.; KNUTSON, C.A.; INGLETT, G.E. Differential scanning calorimetry of raw and annealed starch isolated from normal and mutant maize genotypes. **Cereal Chemistry** 64, 187-190 (1987).

LEACH, H.W., MCCOWEN, L.D., SCHOCH, T.J. Structure of the starch granule I. Swelling and solubility patterns of various starches. **Cereal Chemistry** 36, 534-544 (1959).

LEE, Y.E., OSMAN, E.M. Correlation of morphological changes of rice starch granules with rheological properties during heating in excess water. **Journal of Korean Agricultural and Chemical Society** 34, 379-385 (1991).

LEE, M.H.; BAEK, M.H.; CHA, D.S.; PARK, H.J.; LIM, S.T. Freeze-thaw stabilization of sweet potato starch gel by polysaccharide gums. **FOOD HYDROCOLLOIDS** 16, 345-352 (2002).

LEWIS, M.J. Propriedades físicas de los alimentos y de los sistemas de processado. **Acribia**. Zaragoza. (1993).

LIMA, G.A. Cultura do milho. Editora Lavras da Mangabeira. Ceará. Brasil. (1975).

LIN, P-Y.; CZUCHAJOWSKA, Z. Role of phosphorus in viscosity, gelatinization and retrogradation of starch. **Cereal Chemistry** 75, 705-709 (1998).

LIN, Y.P.; ABOUBACAR, A.; ZEHR, B.E.; HAMAKER, B.R. Corn dry-milled grit and flour fractions exhibit differences in amylopectin fine structure and gel texture. **Cereal Chemistry** 79, 354-358 (2002).

LOPEZ-MARTINEZ, L.X.; OLIART-ROS, G.; VALERIO-ALFARO, C.H.; LEE, K.L.; PARKIN, GARCIA, H.S. Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. **LWT Food Science and Technology** 42, 1187-1192 (2009).

MARCON, M.J.A., AVANCINI, S.R.P., AMANTE, E.R. Propriedades químicas e tecnológicas do amido de mandioca e do polvilho azedo. Editora da UFSC, Florianópolis, Brasil. (2007).

MATSUGUMA, L.S. Caracterização do amido de mandioca salsa (*Arracacia xanthorrhiza*) nativo e modificado por oxidação. Dissertação. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Brasil. (2006).

MEDCALF, M.J.; GILLES, K.A. Wheat starches. I. Comparison of physicochemical properties. **Cereal Chemistry** 42, 558-568 (1965).

MENEGUETTI, G.A.; GIRARDI, J.L.; REGINATTO, J.C. Milho crioulo: Tecnologia viável e sustentável. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável** 3, 12-17 (2002).

- MESTRES, C. Los estados físicos de Almidon. **In Conferencia International de Almidon**. Quito, 1-16. (1996).
- MIRANDA, G.V; SOUZA, L.V; DOS SANTOS, I.C; MENDES, F.F. Resgate de variedades crioulas de milho na região de Viçosa-MG. Resumos. **II Congresso Brasileiro de Agroecologia**. Vol.2, n.1, 1145-1148 (2007).
- MORRISON, W.R. (1988). Lipids in cereal starches: a review. *Journal of Cereal Science* 8, 1-15.
- Morrison, W.R. & Azudin, M.N. A relationship between the amylose and lipids contents of starches from diploid cereals. **Journal of Cereal Science** 2, 257-260 (1984).
- MUA, J.P., JACKSON, D.S. Fractionation of regular corn starch: A comparison of aqueous leaching and aqueous dispersion methods. **Cereal Chemistry** 72, 508-511 (1995).
- MULLER-ROBBER, B.; KOBMANN, J. Approaches to influence starch quantity and starch quality in transgenic plants. **PLANT CELL ENVIRONMENT** 17, 601-613 (1994).
- MUKERJEA, R.; ROBYT, J.F. Isolation, structure, and characterization of the putative soluble amyloses from potato, wheat, and rice starches. **Carbohydrate Research** 345, 449-451 (2010).
- NAVARRO, A.S.; MARTINO, M.N.; ZARITZKY, N.E. Modelling of reological behaviour in starch-lipid systems. **Lebensmittel-Wissenschaft-und-Technolog** 29, 632-639 (1996).
- NUNEZ-SANTIAGO, M.C.; BELLO-PEREZ, L.A.; TECANTE, A. Swelling-solubility characteristics, granule size distribution and rheological behaviour of banana (*Musa paradisiaca*) starch. **Carbohydrate Polymers** 56, 65-75 (2004).

NWOKOCHA, L.M.; AVIARA, N.A.; SENAN, C.; WILLIAMS, P.A. A comparative study of some properties of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) and cocoyam (*Colocasia esculenta*, Linn) starches. **Carbohydrate Polymers** 76, 362-367 (2009).

OLAYINKA, O.O., ADEBOWALE, K.O., OLU-OWOLABI, B.I. (2008). Effect of heat-moisture treatment on physicochemical properties of white sorghum starch. **Food Hydrocolloids** 22, 225-230.

OLIVEIRA, J.P.; CHAVES, L.J.; DUARTE, J.B.; BRASIL, E.D.; JUNIOR, L.T.F.; RIBEIRO, K.O. Teor de proteína no grão em populações de milho de alta qualidade protéica e seus cruzamentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 34, 45-51 (2004).

ORFORD, P.D.; RING, S.G.; CARROLL, V.; MORRIS, M.J. The effect of concentration and botanical source on the gelatinization and retrogradation of starch. **Journal of Science and Food Agriculture** 39, 169-177 (1987).

OKITA, T.W. Is there an alternative pathway for starch synthesis. **Plant Physiology** 100, 560-564 (1992).

PAN, Z.; ECKHOFF, S.R.; PAULSEN, M.R.; LITCHFIELD, J.B. Physical properties and dry-milling characteristics of six selected high-oil maize hybrids. **Cereal Chemistry** 73, 516-520 (1996).

PRASANNA, B.M.; VASAL, S.K.; KASSAHUN, B.; SINGH, N.N. Quality protein maize. **Current Science** 81, 1308-1319 (2001).

PREISS, J. Biosynthesis of starch and its regulation. In PREISS, J. The biochemistry of plants. London. V.14. (1988).

QMCWEB (2011). Lipídeos: As biomoléculas hidrofóbicas. Revista Eletrônica do Departamento de Química. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 10p. Disponível em <http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/lipidios/lipidios.html>. Acessado em 24-02-2011.

QUIMICA10 (2011). Metabolismo dos ácidos graxos e Triacilgliceróis. 6p. Disponível em www.quimica10.com.br, acessado em 24-02-2011.

RAPHAELIDES, S. & KARKALAS, J. Thermal dissociation of amylose-fatty acid complexes. **Carbohydrate Research** 172, 65-82 (1988).

RAPHAELIDES, S.N.; GEORGIADIS, N. Effect of fatty acids on the rheological behaviour of maize starch dispersions during heating. **Carbohydrate Polymers** 65, 81-92 (2006).

RATNAYAKE, W.S.; JACKSON, D.S. Gelatinization and solubility of corn starch during heating in excess water: New insights. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 54, 3712-3716 (2006).

RICKARD, J.E.; ASAOKA, M.; BLANSHARD, J.M.V. The physicochemical properties of cassava starch. **Tropical Science** 31, 189-207 (1991).

RIGON, J.P.G.; CHERUBIN, M.R.; CAPUANI, S.; BATTISTI, R.; MORAES, M.T.; WASTOWSKI, A.D.; DA ROSA, G.M. Desempenho produtivo de cultivares de Milho na região das Missões do Rio Grande do Sul, Safra 2009/2010. **XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo: Associação Brasileira de Milho e Sorgo**. CD-ROM, 1584-1591 (2010).

RUBENS, P., SNAUWAERT, J., HEREMANS, K. & STUTE, R. In situ observation of pressure-induced gelation of starches studied with FTIR in the diamond anvil cell. **Carbohydrate Polymers** 39, 231-235 (1999).

SANDHU, K.S.; SINGH, N.; MALHI, N.S. Physicochemical and thermal properties of starches separated from corn produced from crosses of two germ pools. **Food Chemistry** 89, 541-548 (2005).

SANDHU, K.S.; SINGH, N.; KAUR, M. Characteristics of different corn types and their fractions: Physico-chemical, thermal, morphological and rheological properties of starches. **Journal of Food Engineering** 64, 119-127 (2004).

SARMENTO, S.B.S. Caracterização da fécula de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) no período de colheita de cultivares de uso industrial. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo. Brasil. (1997).

SEABRA, M.L.J., ZAPATA, J.F.F., NOGUEIRA, C.M., DANTAS, M.A., ALMEIDA, R.B. Fécula de mandioca e farinha de aveia como substitutos de gordura na formulação de hambúrguer de carne ovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 22, 244-248 (2002).

SENÉ, M.; THÉVENOT, C.; PRIOUL, J.L. Simultaneous spectrophotometric determination of amylose and amylopectin in starch from maize kernel by multi-wavelength analysis. **Journal of Cereal Science** 26, 211-221 (1997).

SENE, M.; CAUSSE, M.; DEMERVAL, C.; THEVENOT, C.; PRIOUL, J.L. Quantitative trait loci affecting amylose, amylopectin and starch content in maize recombinant inbred lines. **Plant Physiology Biochemistry** 38, 459-472 (2000).

SINGH, N., SINGH, J., KAUR, L., SODHI, N.S., GILL, B.S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry** 81, 219-231 (2003).

SINGH, N.; INOUCHI, N.; NISHINARI, K. Structural, thermal and viscoelastic characteristics of starches separated from normal, sugary and waxy maize. **Food Hydrocolloids** 20, 923-935 (2006).

SINGH, N.; SINGH, S.; ISONO, N.; NODA, T.; SINGH, A.M. Diversity in amylopectin structure, thermal and pasting properties of starches from wheat varieties/lines. **International Journal of Biological Macromolecules** 45, 298-304 (2009).

SINGH, J.; SINGH, N. Studies on the morphological and rheological properties of granular cold water soluble corn and potato starches. **Food Hydrocolloids** 17, 63-72 (2003).

SONI, P.L.; SHARMA, H.W.; DOBHAL, N.P.; BISEN, S.S.; SRIVIVASTAVA, H.C.; GHARIA, M.M. The starches of *Discorea*

ballophyiia and Amorphophailus companulatus. **Starch/Starke** 37, 6-9 (1985).

SHI, Y.C.; SEIB, P.A. The structure of four waxy starches related to gelatinization and retrogradation. **Carbohydrate Research** 227, 131-145 (1992).

SHIRAI, M.A.; HAAS, A.; FERREIRA, G.F.; MATSUGUMA, L.S.; FRANCO, C.M.L.; DEMIATE, I.M. Características físico-químicas e utilização em alimentos de amidos modificados por tratamento oxidativo (obtention, physicochemical characterization and applications in foods of starches modified by oxidative treatment). **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 27, 239-247 (2007).

SHIVA, V. A biodiversidade tem diferentes propriedades que podem ser utilizadas para satisfazer as necessidades humanas. **In: CAMPOS, A.V. (2007). Milho crioulo: sementes de vida - Pesquisa, melhoramento e propriedade intelectual.** Editora da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Campus de Frederico Westphalen. Rio Grande do Sul. Brasil. (2001).

SCHMIDT, E.C. Efeitos da radiação ultravioleta-B sobre a morfofisiologia de *Kappaphycus alvarezii* (DOTY) DOTY EX P.SILVA (GIGARTINALES) variantes pigmentares verdes e vermelhas. Dissertação. Biologia Vegetal. Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina. Brasil. (2009).

SCHOCH, T.J. Fractionation of starch by selective precipitation with butanol. **Journal of American Chemistry Society** 64, 2957 (1942).

SCHOCH, T.J.; MAYWALD, E.C. Preparation and properties of various legume starches. **Cereal Chemistry** 45, 564-573 (1968).

SCHULZ, H.; BARANSKA, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy** 43, 13-25 (2007).

SRICHUWONG, S.; SUNARTI, T.C.; MISHIMA, T.; ISONO, N.; HISAMATSU, M. Starches from different botanical sources II:

Contribution of starch structure to swelling and pasting properties. **Carbohydrate Polymers** 62, 25-34 (2005).

TABOADA-GAYTAN, O.; POLLAK, L.M.; JOHNSON, L.A.; FOX, S.R.; MONTGOMERY, K.T. Variation among physical, compositional, and wet-milling characteristics of the F₁ adapted inbred lines. **Cereal Chemistry** 87, 175-181 (2010).

TESTER, R.F., & MORRISON, W.R. Swelling and gelatinization of cereal starches. Effects of amylopectin, amylase and lipids. **Cereal Chemistry** 67, 551-557 (1990a).

TESTER, R.F.; MORRISON, W.R. Swelling and gelatinization of cereal starches, II. Waxy rice starches. **Cereal Chemistry** 67, 558-563 (1990b).

VAN DER KAMP, J.W.; BOOT, M.J.; BAKHUIZEN, R.; PATER, B.S. Biotechnology as tool for modification of starch composition and starch granule size in cereal crops. **IN: VAN DOREN, H.A.; VAN SWAAIJ, A.C.P.M.** Starch 96 - The book. Carbohydrate Research Foundation, The Hague (1997).

VANDEPUTTE, G.E.; GEEROMS, J.; DELCOR, J.A. Rice starches: I. Structural aspects provide insight into swelling and pasting properties. **Journal of Cereal Science** 38, 43-52 (2003a).

VANDEPUTTE, G.E.; DERYCKE, R.; GEEROMS, J.; DELCOR, J.A. Rice starches III: Structural aspects provide insight into swelling and pasting properties. **Journal of Cereal Science** 38, 3-59 (2003b).

VANDEPUTTE, G.E.; VERMEYLEN, V.; GEEROMS, J.; DELCOR, J.A. Rice starches II: Structural aspects provide insight in amylopectin retrogradation properties and gel texture. **Journal of Cereal Science** 38, 61-68 (2003b).

VAN SOEST, J.J.G., TOURNOIS, H., WIT, DE D. & Vliegenthart, J.F.G. Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy. **Carbohydrate Research** 279, 201-214 (1995).

VILARINHO, A.A. Densidade e espaçamento como fatores de produtividade na cultura do milho. EMBRAPA. Brasília-DF. Brasil.(2005).

VOGT, G.A; CANCI, I.J; CANCI, A. Uso e Manejo de variedades locais de milho em Anchieta (SC). **Agriculturas** 4, 36-39 (2007).

WILLIAMS, P.C., KUZINA, F.D., HLYNKA, I. A rapid colorimetric procedure for estimating the amylose content of starches and flours. Board of Grain Commissioners, Grain Research Laboratory, Manitoba, Canada. (1970).

WINK, M. Plant secondary metabolites-a primary resource: Biochemistry of plant secondary metabolism and functions of plant secondary metabolism and their exploitation in biotechnology. Sheffield Academic Press, CRC press, USA. (1999).

WOOTTON, M.; BAMUNUARACHCHI, A. Water binding capacity of commercial produced native and modified starches. **Starch/Starke** 30, 306-309 (1978).

WHISTLER, R.L., BEMILLER, J.N., PASCHALL, E.F. Starch: Chemistry and technology. 2nd ed. New York and London: Academic Press. (1984).

WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N. Starch. **IN: WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N.** Carbohydrate chemistry for food scientists. AACC, Saint Paul. (1997).

WOTTON, M.; BAMUNUARACHCHI, A. Water binding capacity of commercial produced native and modified starches. **Starch/Starke** 33, 159-161 (1978).

WU, V.Y.; NORTON, R.A. Enrichment of protein, starch, fat, and sterol ferulates from corn fiber by fine grinding and air classification. **Industrial Crops and Products** 14, 135-138 (2001).

XIAO-PENG, H.; CHANG-LAN, Z.; LING-LONG, L.; FANG, W.; JUN-RU, F.; LING, J.; WEN-WEI, Z.; YI-BAI, L.; JIAN-MIN, W.

Difference of amylopectin structure among rice varieties differing in grain quality and its correlation with starch physicochemical properties. **Acta Agronomica Sinica** 36, 276-284 (2010).

YAMAZAKI, W.T. An alkaline water retention capacity test for the evaluation of cookie baking potentialities of soft winter wheat flours. **Cereal Chemistry** 30, 242-246 (1953).

ZAVAREZE, E.R., RODRIGUES, A.O., STORK, C.R., ASSIS, L.M., WALLY, A.P.S., DIAS, A.R. Swelling power and solubility of rice starch submitted at heat-moisture treatment. **Brazilian Journal of Food Technology** II, 31-35 (2009).

CAPÍTULO 2

Análise do perfil metabólico secundário (carotenóides, antocianinas e compostos fenólicos) de oito variedades crioulas de milho (*Zea mays* L.).

1 INTRODUÇÃO

A vida humana depende das plantas. Para além dos nutrientes básicos como proteínas, gorduras e carboidratos, as plantas são fontes de fármacos, cosméticos, ingredientes de alimentos, agroquímicos, aromatizantes, inseticidas e pigmentos, por exemplo. Tais compostos (e.g., ácidos fenólicos, antocianinas e carotenóides), usualmente de baixo peso molecular e supostamente não essenciais à sobrevivência das plantas, conferem vantagens ecológicas ao vegetal e são designados metabólitos secundários. De fato, uma forte relação entre o metabolismo secundário e a defesa das plantas é bem estabelecida. Os vegetais respondem ao ataque de patógenos, insetos, herbívoros e outros fatores bióticos e abióticos ativando uma cascata de mecanismos de defesa, incluindo a biossíntese de metabólitos secundários como fitoalexinas, respostas hipersensitivas e barreiras estruturais de defesa (i.e., deposição de lignina na parede celular), entre outras (VASCONSUELO; BOLAND, 2007).

Evidências têm se acumulado de que os metabólitos secundários desempenham funções vitais nos mecanismos de sinalização e defesa vegetal, sendo que a exploração biotecnológica destes compostos é de importância às indústrias agroalimentar, agroquímica, farmacêutica e de cosméticos, por exemplo (WINK, 1999).

Diversos trabalhos sobre a determinação de perfis metabólicos (metabolômica) com aplicação em nas áreas farmacêutica, alimentar e agroquímica, e.g., têm sido realizados nos últimos anos, buscando a descoberta de novos genes, a elucidação de rotas metabólicas, a obtenção de novos fármacos, a correlação com patofisiologias, a identificação de marcadores biológicos de toxicidade e a diferenciação de variedades selvagens daquelas modificadas geneticamente (WINK, 1999). Neste contexto, a geração de informações precisas sobre a composição química de variedades crioulas de milho é relevante, tanto

no que se refere à determinação do potencial destes genótipos como fonte de compostos de interesse à saúde humana, quanto em pesquisas epidemiológicas que relacionam a dieta humana com a prevenção ou a ocorrência de doenças. Cereais são matrizes complexas contendo compostos bioativos (e.g. carotenóides, antocianinas e compostos polifenólicos), alguns dos quais são largamente acreditados conferir propriedades protetoras à saúde humana (GRANADO et al., 2001).

De acordo com Oliveira et al. (2009), o efeito protetor daqueles compostos é atribuído a sua atividade antioxidante decorrente de suas habilidades na complexação com metais, seqüestro de radicais livres e decomposição de peróxidos. A expansão do conhecimento sobre o efeito desses compostos na saúde, combinado com a idéia de que produtos sintéticos podem ser prejudiciais à homeostase fisiológica, tem estimulado a investigação no campo dos antioxidantes naturais. Uma das opções mais efetivas é a exploração de compostos bioativos de plantas que podem ser usados nas indústrias farmacêutica, cosmética e agrícola (OLIVEIRA et al., 2009). Vantagens econômicas podem advir da exploração desses compostos por indústrias alimentares locais, assim como através da suplementação da dieta do pequeno agricultor ou de populações carentes com nutrientes de baixo custo e produzidos em sistemas de reduzido impacto ecológico, i.e., variedades crioulas de milho.

Estudos epidemiológicos sugerem uma relação inversa entre o consumo de alimentos ricos em metabólitos secundários e a incidência de doenças crônicas e degenerativas incluindo as doenças cardiovasculares, desordens do trato urinário e vários tipos de câncer (POZO-INSFRAN et al., 2007). Diversos estudos relatam a ocorrência e a diversidade de estruturas químicas destes compostos em genótipos de milho. No entanto, são escassos os estudos relacionados aos genótipos de milhos crioulos. Assume-se que a análise destes metabólitos em VMC é relevante, podendo gerar perspectivas de uso e ampliar as possibilidades de preservação destes genótipos ricos em diversidade química e biológica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- a) Determinar o perfil metabólico secundário de oito variedades crioulas de milho (*Zea mays* L.), com ênfase em compostos carotenóidicos, antociânicos e (poli) fenólicos.

2.2 Objetivos específicos

- a) Extrair e quantificar os compostos carotenóidicos, antociânicos e fenólicos em amostras de grãos, folhas e flores femininas de genótipos de milhos crioulos;
- b) Determinar o perfil cromatográfico de carotenóides de grãos das variedades crioulas em estudo;
- c) Analisar o efeito do cozimento sobre o rendimento de extração de carotenóides de farinhas de milho crioulo

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Metabólitos secundários

Em habitats naturais, as plantas estão rodeadas de uma enorme quantidade de potenciais inimigos. Por sua natureza sésil, as plantas não têm como evitar a ação de herbívoros e patógenos simplesmente por uma fuga, protegendo-se por outros mecanismos, i.e., sintetizando uma grande quantidade de compostos orgânicos que parecem não desempenhar uma função direta no crescimento e desenvolvimento. Tais substâncias são conhecidas como metabólitos secundários, produtos secundários ou naturais, não apresentando uma função reconhecida nos processos de respiração, transporte de solutos, síntese de proteínas, carboidratos e lipídios e na assimilação de nutrientes (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Metabólitos secundários diferem dos metabólitos primários por sua distribuição restrita no reino vegetal. Estes são encontrados particularmente em algumas espécies de plantas, ou em grupos específicos de espécies, enquanto os metabólitos primários ocorrem em todo reino vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2009). A Tabela 1 ilustra algumas diferenças entre os metabolismos primário e secundário.

Tabela 1* - Características diferenciais do metabolismo primário e secundário vegetal

Metabolismo primário

Genes com alta estringência, controlando
funções essenciais
Importante no crescimento e desenvolvimento
do indivíduo
Indispensável
Universal
Uniforme
Conservativo

Metabolismo secundário

Genes com alta plasticidade controlando
funções sob pressão de seleção causada por
mudanças contínuas do ambiente
Importante na interação do indivíduo com o
ambiente
Dispensável para o
crescimento e
desenvolvimento
Indispensável para a
sobrevivência no ambiente
Únicos
Diversos
Adaptativos

* Adaptado de Hartmann (2007).

Nos anos 50, os metabólitos secundários eram tidos como originários de erros metabólicos ou produtos de detoxificação (HARTMANN, 2007). Além disto, durante décadas (e.g., 1950 a 1980) os aspectos funcionais dos metabólitos secundários foram negligenciados pelos fitoquímicos e fisiologistas vegetais. Esta visão mudou com o aumento dos conhecimentos de bioquímica do metabolismo secundário. Apesar dos metabólitos secundários serem dispensáveis ao crescimento e desenvolvimento vegetal, seus componentes podem ser continuamente modificados e adaptados à demanda das mudanças contínuas da pressão de seleção ambiental, conforme descrito na Tabela 1 (HARTMANN, 2007).

De acordo com Verpoorte e Memelink (2002), o metabolismo secundário vegetal tem múltiplas funções durante o ciclo de vida da planta. Tais funções podem ser classificadas como mediadores na interação das plantas com o ambiente, tais como planta-inseto, planta-microorganismo e interação planta-planta. A produção de metabólitos secundários é parte do sistema de defesa da planta como, por exemplo, a produção constitutiva de compostos contra herbivoria, i.e. fitoanticipinas, e a produção induzida de fitoalexinas. O metabolismo secundário também desempenha papel na reprodução de plantas, atraindo polinizadores e modulando a fertilidade masculina. Além disto, metabólitos secundários determinam aspectos importantes na qualidade da alimentação humana (sabor, cor e aroma) e na ornamentação, uma vez que muitos pigmentos de tecidos vegetais (flores, frutos, folhas) pertencem àquela classe de compostos. Por fim, um número significativo de metabólitos secundários tem sido usado na produção de medicamentos, corantes, inseticidas, aromatizantes e fragrâncias, sendo também de interesse aos programas de melhoramento genético vegetal por métodos clássicos e via engenharia genética (VERPOORTE; MEMELINK, 2002).

Para Kutchan e Dixon (2005), os metabólitos secundários formam um grande reservatório de diversidade química natural, sendo que os múltiplos níveis com os quais a planta se comunica com outros organismos (e.g., competição ou sinergismo), decorrem, em alguma extensão, da variedade funcional encontrada nas distintas estruturas químicas dos metabólitos secundários. A demanda da dinâmica do ambiente confere uma plasticidade natural ao metabolismo secundário e conduz a uma evolução da diversidade genética (KUTCHAN; DIXON, 2005).

Durante a evolução das plantas, o pool adaptativo de metabólitos secundários aparentemente forneceu um reservatório de compostos, os quais atingiram funções primárias como fitohormônios e compostos de sinalização metabólica (Tabela 2). Recentemente, foi demonstrado que mesmo os flavonóides que são tidos como compostos que desempenham funções ecoquímicas, também apresentam funções primárias (i.e., reguladores de crescimento) (HARTMANN, 2007).

Do ponto de vista humano, os metabólitos secundários têm sido utilizados há séculos para múltiplos propósitos, e.g., drogas alucinógenas, estimulantes, antibióticos, anti-inflamatórios, pigmentos,

aromatizantes, fragrâncias e inseticidas. Nos últimos anos, o interesse no metabolismo secundário vegetal é crescente, sendo que muitas pesquisas têm sido conduzidas na área da nutrição humana, principalmente tomando-se em conta que o consumo destes metabólitos poderá ter impactos positivos na prevenção de doenças como o câncer, disfunções cardiovasculares e outras patofisiologias crônicas. Neste contexto, estimular o aumento dos conteúdos de compostos secundários nos tecidos vegetais das plantas, extraí-los, identificá-los e processá-los de forma adequada tem sido um desafio constante da biotecnologia vegetal, com recursos à engenharia metabólica (AHARONI; GALILI, 2010).

Tabela 2* -Metabólitos secundários com funções primária e secundária no metabolismo vegetal.

Metabolismo primário

Genes com alta estringência, controlando funções essenciais
 Importante no crescimento e desenvolvimento do indivíduo
 Indispensável
 Universal
 Uniforme
 Conservativo

Metabolismo secundário

Genes com alta plasticidade controlando funções sob pressão de seleção
 causada por mudanças contínuas do ambiente
 Importante na interação do indivíduo com o ambiente
 Dispensável para o crescimento e desenvolvimento
 Indispensável para a sobrevivência no ambiente
 Únicos
 Diversos
 Adaptativos

* Adaptado de Hartmann (2007).

A rede metabólica das plantas é bastante extensa e, para além da produção de metabólitos primários, os vegetais sintetizam uma vasta diversidade de metabólitos secundários, estimando-se em cerca de 200.000 o conjunto total de compostos conhecidos até o momento, com incrementos anuais da ordem de 4.500 novas estruturas químicas (AHARONI; GALILI, 2010). As principais classes de metabólitos

3.1.1 Terpenos

Os terpenos constituem a maior classe de metabólitos secundários, tendo como precursores o acetil-CoA ou intermediários da via glicolítica. Todos os terpenos são derivados da união de cinco elementos de carbono, constituintes da estrutura básica do isopreno (Figura 2), sendo geralmente insolúveis em água.

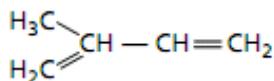


Figura 2-Estrutura básica dos terpenos (unidade isoprênica ou isopentano).

A rigor, o isopreno é um composto químico cuja ocorrência no meio celular, i.e. equivalência bioquímica, refere-se ao isopentenil pirofosfato (IPP). Os terpenóides são classificados em função do número de unidades de cinco carbonos (C5) que possuem, embora algumas vezes extensas modificações metabólicas possam dificultar a identificação dos resíduos originais isoprênicos. Desta forma, são designados como monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) e politerpenos (> C40). Sua biossíntese ocorre a partir de duas rotas (Figura 1), a via do ácido mevalônico e a via do metil-eritritol fosfato (MEP) (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Alguns terpenos têm função bem caracterizada no desenvolvimento vegetal, podendo ser considerados como metabólitos primários (Tabela 2). Por exemplo, as giberelinas, um importante grupo de hormônios vegetais, são diterpenos, enquanto os brassinosteróides, outra classe de hormônios vegetais, originam-se dos triterpenos. De forma similar, os esteróis são derivados triterpênicos e componentes essenciais das membranas celulares. Os carotenóides, de cores vermelha, amarela e alaranjada, são tetraterpenos que atuam como pigmentos acessórios na fotossíntese, protegendo o aparato fotossintético contra a fotoxidação. Por sua vez, o ácido abscísico é um hormônio sesquiterpenoídico produzido pela degradação de um precursor de carotenóide (TAIZ; ZEIGER, 2009). A Figura 3, mostra de forma resumida a síntese dos terpenos.

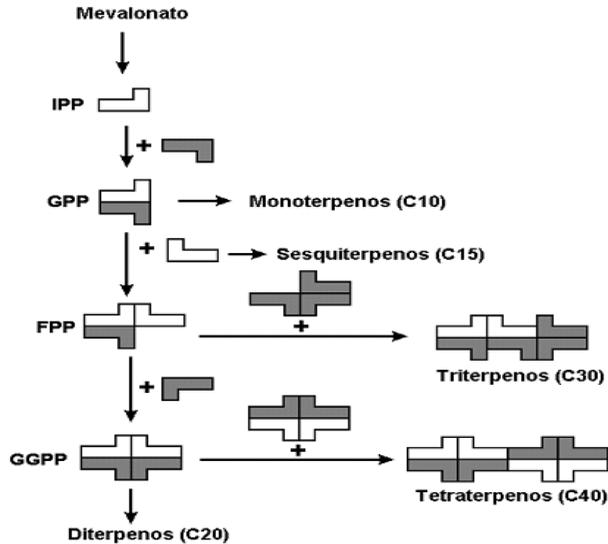


Figura 3- Biossíntese de terpenos. O isopreno, precursor comum dos compostos terpenoídicos é representado como uma unidade básica de isopentenil pirofosfato (IPP), a forma metabolicamente relevante. A condensação de duas unidades de IPP forma o geranyl pirofosfato (GPP), o qual é precursor dos monoterpênicos. A adição de mais uma unidade de IPP forma o farnesil pirofosfato (FPP), o qual origina os sesquiterpênicos. O alongamento da cadeia carbônica com a adição de mais uma unidade de IPP ao FPP origina o geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), precursor dos diterpênicos. A ligação de duas unidades de FPPs dá origem aos triterpênicos. De modo semelhante, são necessárias duas unidades de GGPP para a síntese de um tetraterpeno (PEREZ, 2010; TAIZ, ZEIGER 2009).

Diversos efeitos biológicos de compostos terpenoídicos são conhecidos como, por exemplo, os piretróides (ésteres de monoterpênicos), encontrados em folhas e flores de *Chrysanthemum* spp, apresentam potente atividade inseticida. Os óleos essenciais (misturas de monoterpênicos e sesquiterpênicos voláteis) conferem aroma característico e repelente de insetos às folhas de algumas espécies (e.g., hortelã, limão, orégano). Os limonóides (terpenos não voláteis -triterpênicos), pelo seu sabor amargo são inibidores de forrageio de insetos), enquanto as fitoecdisonas interrompem os processos de desenvolvimento do inseto (ecdise) e constituem defesa contra nematódeos parasitas. Os

cardenolídeos e as algumas saponinas (triterpenos) possuem sabor amargo e apresentam elevada toxicidade aos animais superiores, inibindo a herbivoria. Em humanos, os cardenolídeos apresentam efeitos drásticos sobre a musculatura cardíaca (diminuem a frequência de batimentos e fortalecem o tônus muscular), enquanto as saponinas possuem ação detergente e emulsificante, interferindo na absorção de compostos pelo sistema digestivo (TAIZ; ZEIGER, 2009).

No milho, os terpenóides têm sido relatados atuar na fotoproteção (carotenóides) tissular por serem potentes antioxidantes (BAI et al., 2010). Em humanos, este grupo tem sido relacionado ao metabolismo da vitamina A, pois carotenos são compostos precursores de vitamina A (i.e., β -caroteno) e às suas propriedades anti-angiogênicas (KUHNEN et al., 2009).

3.1.2 Carotenóides

Quimicamente, os carotenóides (Figura 4) são tetraterpenos de 40 átomos de carbono e classificam-se em carotenos (terpenos) ou xantofilas (terpenóides). São compostos hidrofóbicos, lipofílicos, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos como a acetona, o álcool e o clorofórmio. Os carotenos (e.g., β -caroteno e licopeno) são hidrocarbonetos poliênicos com variados graus de insaturação e as xantofilas (luteína e zeaxantina) são sintetizadas a partir dos carotenos, via reações de hidroxilação e epoxidação. Em decorrência da presença das duplas ligações em sua estrutura química, os carotenóides são sensíveis à luz, temperatura, acidez e a compostos oxidantes. (NELSON, COX, 2011; AMBRÓSIO et al., 2006).

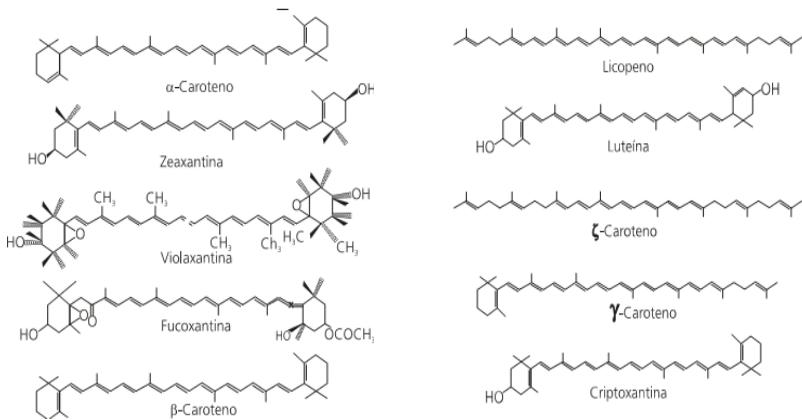


Figura 4- Detalhes da estrutura química de carotenos e carotenóides de importância biológica. (NELSON, COX, 2011; AMBRÓSIO et al., 2006; PALACE et al., 1999)

3.1.3 Biossíntese dos carotenóides

As etapas finais da via biossintética dos carotenóides, destacando a formação dos principais carotenóides, são apresentadas na Figura 5.

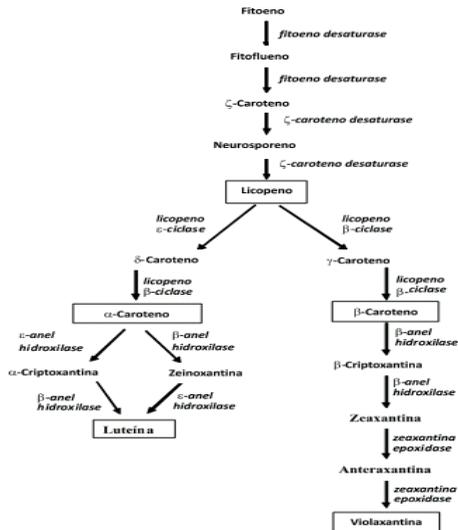


Figura 5- Vias biossintéticas de carotenóides a partir do precursor fitoeno. Os carotenóides de maior importância biológica em alimentos encontram-se destacados (RODRIGUES-AMAYA et al., 2008).

Dos mais de 600 carotenóides conhecidos, aproximadamente 50 são precursores da vitamina A, apresentando como característica estrutural em comum pelo menos um anel de β -ionona não substituído, com cadeia lateral poliênica com um mínimo de 11 carbonos. Entre os carotenóides, o β -caroteno é o mais abundante em alimentos e com maior atividade pro-vitamina A (Figuras 6). Tanto os carotenóides precursores de vitamina A quanto os não precursores, como a luteína, a zeaxantina e o licopeno, apresentam ação protetora contra o câncer. Possíveis mecanismos que explicam tal atividade referem-se ao efeito de seqüestro de radicais livres, modulação do metabolismo do carcinoma, inibição da proliferação celular, aumento da diferenciação celular via retinóides e aumento da resposta imune (AMBRÓSIO et al., 2006). No entanto, destaca-se que os carotenóides não são sintetizados pelo organismo humano, de modo que sua ingestão via dieta constitui um pré-requisito à manutenção da homeostase fisiológica de diversos órgãos e tecidos (AMAN et al., 2005). Os carotenóides são absorvidos por difusão simples no intestino delgado e incorporados a lipoproteínas para o transporte. São armazenados principalmente no fígado e tecidos gordurosos; no entanto, luteína e zeaxantina acumulam-se de forma específica na mácula vítrea (GARCIA-CASAL, 2006).

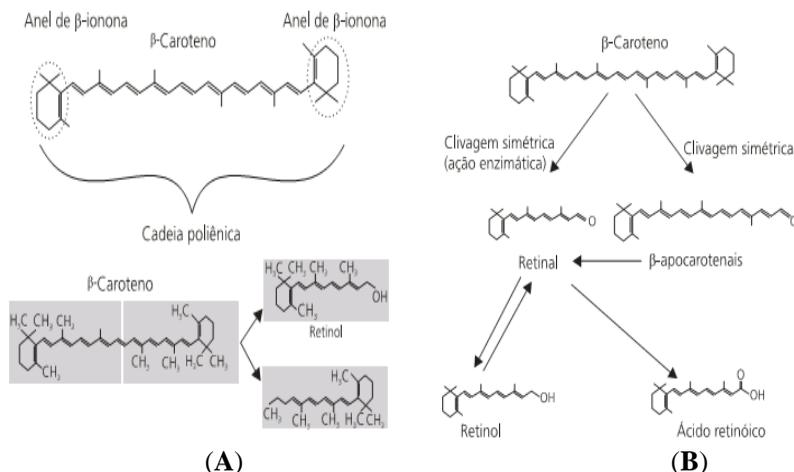


Figura 6. Detalhe da estrutura química do β -caroteno (A), com destaques à presença do anel β -ionona e a clivagem simétrica (B) daquele metabólito, originando o retinol (vitamina A) e o ácido retinóico (NELSON, COX, 2011; AMBRÓSIO et al., 2006).

3.1.4 Licopeno

Os isômeros *trans* e alguns isômeros *cis* deste carotenóide são encontrados no plasma sanguíneo. Além disto, este composto ocorre na tireóide, rins, fígado, coração, testículos, tecidos adiposos e pâncreas, porém não é convertido em retinol. Em experimentos *in vitro*, o licopeno mostrou ser mais efetivo no seqüestro de radicais livres que α -, β -caroteno, luteína, zeaxantina e β criptoxantina. Teores deste carotenóide no plasma foram inversamente relacionados ao risco de câncer da bexiga, pâncreas, trato digestivo e câncer cervical (NELSON, COX, 2011; SU et al., 2002).

3.1.5 α - e β -carotenos

O isômero β é predominantemente encontrado no corpo humano (tireóide, fígado, rins, coração, pâncreas, glândulas adrenais) em relação à forma α deste caroteno. Vários estudos apontam que o β -caroteno funciona como antioxidante, protegendo as LDL (*low density lipoproteins*) da oxidação (NELSON, COX, 2011; SU et al., 2002).

3.1.6 β -criptoxantina

Este metabólito possui atividade pró-vitamina A e capacidade de sequestro de radicais livres. Em humanos, maiores quantidades são encontradas no fígado comparativamente ao plasma (NELSON, COX, 2011; SU et al., 2002).

3.1.7 Luteína e zeaxantina

Estas xantofilas são encontradas na retina, plasma, ovários e tecidos adiposos humanos. Na retina, protegem as células foto-receptoras da ação de espécies reativas de O_2 geradas pela luz, prevenindo a degeneração macular. Luteína possui atividade quimiopreventiva, inibe a peroxidação lipídica *in vitro* mais efetivamente que carotenos e licopeno. Contudo, estas xantofilas não possuem atividade provitamina A e ambas apresentam efeito protetivo contra a peroxidação lipídica (NELSON, COX, 2011; SU et al., 2002).

3.2 Importância dos carotenóides

O milho constitui um alimento básico para milhões de pessoas no mundo, principalmente em países subdesenvolvidos, sendo uma importante fonte de proteínas, vitaminas e lipídeos (MENKIR et al., 2008). Este cereal é reconhecido como uma importante fonte de compostos que inibem o aparecimento de quadros de deficiência de vitamina A, a qual predispõe uma estimativa de 100 milhões de africanos ao alto risco de problemas visuais e cegueira (UNIÃO AFRICANA, 2005). Crianças, mulheres grávidas e aquelas que estão amamentando são as mais vulneráveis à deficiência de retinol. Estima-se que 33 milhões de crianças africanas, em idade pré-escolar, são deficientes em vitamina A, aumentando sua predisposição a doenças como anemias, diarreia, sarampo, malária e infecções respiratórias (UNIÃO AFRICANA, 2005). Cerca de 20% a 24% da mortalidade infantil proveniente das doenças acima citadas e 3% da mortalidade causada por infecções respiratórias são descritas como decorrentes da deficiência da vitamina A (MENKIR et al., 2008), justificando a realização de esforços para minimizar a deficiência daquele composto que poderá melhorar a saúde e o bem estar das pessoas, especialmente de populações menos favorecidas.

Nos últimos anos, esforços em diversos países têm sido feitos para aumentar os níveis de carotenóides em alimentos como forma de superar a deficiência de vitamina A em áreas com limitado acesso a produtos animais, vegetais e frutas. O milho contém três carotenóides precursores da vitamina A: α - e β -caroteno e β -criptoxantina, sendo também fonte de carotenóides não pró-vitamina A, i.e., luteína e zeaxantina os quais desempenham papel importante na saúde humana. O consumo elevado destas duas xantofilas está associado à redução dos riscos de ocorrência de patofisiologias oculares como a catarata e a degeneração macular, conforme anteriormente mencionado. Assim, como os carotenóides têm diferentes e importantes funções na saúde humana, assume-se que o incremento de seus conteúdos em alimentos de grande utilização pelos segmentos menos favorecidos da população mundial (milho, por exemplo) poderá ter impactos positivos, especialmente no controle da hipovitaminose A.

De outra forma, o interesse dos consumidores de maior poder aquisitivo em alimentos orgânicos tem aumentando consideravelmente nos últimos anos. Adicionalmente, o uso de ingredientes alimentares e a geração de

novos alimentos são de relevante interesse econômico em muitos países. Contudo, tal aspecto baseia-se em alguma extensão na busca e na determinação do potencial de espécies vegetais fontes de matérias-primas adequadas àquela demanda, implicando em diversos casos no acesso à biodiversidade de outrem. A geração de tecnologias a partir da biodiversidade, por sua vez, requer o conhecimento da composição e valor nutricional desta (MERTZ et al., 2009). Neste cenário, para as variedades crioulas de milho, suas qualidades sensoriais, seus reais valores nutricionais e potencialidades de uso ainda carecem de muito estudado.

Por fim, ainda que incrementos de conteúdo de carotenóides sejam alcançados em biomassas vegetais, é necessário considerar que o processamento de alimentos interfere na biodisponibilidade destes compostos. Geralmente o processamento dos alimentos aumenta a biodisponibilidade destes compostos (i.e., carotenóides), porque contribui á sua liberação da matriz alimentar (GARCIA-CASAL, 2006).

3.3 Fatores que influenciam o teor de carotenóides

Gobbo-Neto e Lopes (2007) relatam que variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como nas proporções relativas, de metabólitos secundários vegetais ocorrem em função da sazonalidade, ritmos circadianos, estágio de desenvolvimento vegetal, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, disponibilidade de nutrientes (macro e micronutrientes), altitude, poluição atmosférica e indução por estímulos mecânicos ou químicos de patógenos. Apesar da existência de um controle genético, a expressão fenotípica pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. Como exemplo, a exposição à radiação solar e a temperaturas elevadas resulta em incrementos da biossíntese de carotenóides. Além disso, frutos de uma mesma cultivar, quando produzidos em regiões quentes, apresentam teores de carotenóides expressivamente mais elevados em relação aqueles produzidos em regiões de clima temperado (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008). De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o meio circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais.

Os alimentos variam qualitativa e quantitativamente na sua composição em carotenóides. Em mesmo alimento, diferenças qualitativas e,

especialmente, quantitativas resultam de fatores como variedade, estado de maturação, solo, clima/localização geográfica da produção, estação do ano, parte da planta amostrada, condições de plantio, manuseio pós-colheita, processamento e condições de armazenamento (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008). O grau de maturação é outro fator que afeta decididamente a composição em carotenóides e, especificamente em *Z. mays*, o amadurecimento dos grãos é um processo fisiológico acompanhado por uma carotenogênese intensa, caracterizada pelo aumento do número e quantidade destes metabólitos. No entanto, estudos demonstrando a variação do perfil metabólico destes compostos para VMC são escassos.

Quanto às formas químicas dos carotenóides, sabe-se que a configuração preferencial destes metabólitos nas plantas é o isômero *all-trans*. Como são compostos altamente insaturados, os carotenóides são suscetíveis à isomerização e oxidação durante o processamento e armazenamento dos alimentos. A isomerização dos *trans*-carotenóides a *cis*-carotenóides causada, e.g., por aquecimento, acidez e exposição à luz diminui tanto a coloração quanto a eventual atividade pró-vitamina A destes compostos (NELSON, COX, 2011; AMBRÓSIO et al., 2006).

A quantidade de *cis* isômeros formada durante o aquecimento está relacionada à severidade e extensão do tratamento térmico. Entretanto, pesquisas sugerem que a absorção de carotenóides provenientes de vegetais crus é inferior à de vegetais cozidos. A absorção de licopeno em indivíduos humanos adultos é superior (95% de *cis* isômeros marcados) (YOU et al., 1996) em suco de tomate processado (aquecimento, 1 h), comparativamente ao suco não processado (temperatura ambiente), sendo que dentre os isômeros geométricos daquele composto (*all-trans*, *9-cis* e *15-cis*), os *cis* isômeros foram preferencialmente absorvidos (AMBRÓSIO et al., 2006). Assim, ainda que os tipos e teores de carotenóides da dieta da população possam ser otimizados por processos agrícolas que concorram para o enriquecimento da matéria-prima nestes metabólitos (Rodriguez-Amaya et al., 2008), esta abordagem deve ser complementada com técnicas apropriadas de manuseio em pós-colheita e processamento, com a finalidade de evitar sua degradação (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008).

3.4 Compostos fenólicos

As plantas produzem uma grande diversidade de produtos secundários que contêm um grupo fenol, i.e., um grupo hidroxila funcional ligado a um anel aromático (Figura 7). Tais substâncias são classificadas como compostos fenólicos e constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos conhecidos até o momento.

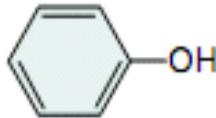


Figura 7- Estrutura química básica do fenól.

Os fenólicos vegetais são solúveis apenas em solventes orgânicos e alguns em soluções de ácidos carboxílicos, enquanto suas formas glicosiladas são solúveis em água. Os compostos fenólicos poliméricos por sua vez são usualmente insolúveis. Devido à sua significativa diversidade química, os compostos fenólicos apresentam uma variedade de funções nos vegetais. Muitos agem como compostos de defesa contra herbívoros e patógenos, enquanto outros atuam como atrativo de polinizadores ou dispersores de frutos, na proteção à radiação ultravioleta, no suporte mecânico, ou ainda reduzindo o crescimento de plantas competidoras adjacentes - alelopatia (TAIZ; ZEIGER, 2009).

3.4.1 Biossíntese dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são biossintetizados por diferentes rotas, razão pela qual constituem um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico. Duas rotas metabólicas básicas estão envolvidas na biossíntese destes metabólitos: as rotas do ácido chiquímico e do ácido malônico, conforme descrito na Figura 1. A rota do ácido chiquímico responde pela síntese da maioria dos compostos fenólicos vegetais, sendo a rota do ácido malônico menos significativa nas plantas superiores (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A rota do ácido chiquímico converte precursores de carboidratos derivados da glicólise e da rota da pentose-fosfato em aminoácidos aromáticos (HERRMANN; WEAVER, 1999). Um dos intermediários dessa rota é o ácido chiquímico, que dá o nome a essa seqüência de

reações. O conhecido herbicida de amplo espectro, glifosato (disponível comercialmente como Roundup®) mata os vegetais bloqueando uma etapa dessa rota metabólica. A rota do ácido chiquímico está presente em plantas, fungos e bactérias, mas não é encontrada em animais. Os compostos fenólicos mais abundantes em vegetais são derivados da fenilalanina, via eliminação de uma molécula de amônia catalisada enzimaticamente pela fenilalanina amônia liase (PAL), originando o ácido cinâmico (Figura 8). A PAL está situada em um ponto de ramificação entre os metabolismos primário e secundário, com função reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos. Fatores como baixos níveis de nutrientes, luz e infecção por fungos podem aumentar a atividade da PAL, estimulando a síntese de compostos fenólicos.

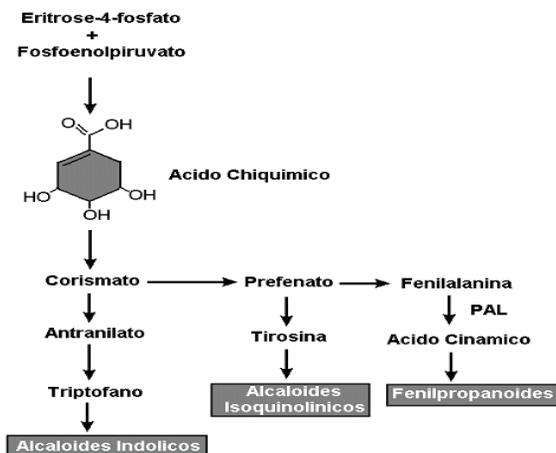


Figura 8. Via do ácido chiquímico para biossíntese de compostos fenólicos e alcalóides. Uma importante enzima regulatória nesta via é a fenilalanina amônia liase (PAL), a qual catalisa a desaminação da fenilalanina gerando o ácido cinâmico (PEREZ, 2010; TAIZ, ZEIGER, 2009).

3.4.2 Antocianinas

As antocianinas (do grego *anthos* = flor; *kyanos* = azul), pigmentos visíveis ao olho humano, são glicosídeos poli-hidroxi ou poli-metoxi derivados do 2-fenilbenzopirílio ou sais de flavilium (Figura 9C)

(KONG et al., 2003). As antocianinas são compostos flavonoídicos (Figuras 9A, e 9B), os quais constituem a maior classe de fenólicos vegetais. Os flavonóides são compostos fenólicos com dois anéis aromáticos ligados por unidade C₃ central (anel pirano) e podem ser classificados de acordo com o estado de oxidação do anel pirano. São eles: flavonas, flavonois, flavononas, flavononas glicosídicos, antocianinas, catequinas e chalconas (SCHULZ; BARANSKA, 2007).

As antocianinas constituem um grupo bastante comum de flavonóides pigmentados, responsáveis pela maioria das cores vermelha, rosa, roxa e azul dos tecidos vegetais. Por colorir flores e frutos, as antocianinas são de importância à atração de polinizadores e dispersores de semente. As antocianinas são glicosídeos que apresentam açúcares na posição C₃ (Figura 9B) e, na ausência destas oses (agliconas), são denominadas antocianidinas (Figura 9A). Os açúcares mais comuns ligados à aglicona são a xilose, arabinose, ramnose (pentoses), galatose e glucose (hexoses). A cor das antocianinas é influenciada por muitos fatores, incluindo o número de grupos hidroxila (Tabela 3) e metoxila no anel B da antocianidina (Figura 9A), a presença de ácidos aromáticos esterificados ao esqueleto principal e o pH do vacúolo onde tais compostos são armazenados (TAIZ; ZEIGER, 2009). As antocianidinas de maior frequência são a pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petuinidina e malvidina (Tabela 3), as quais têm em comum o esqueleto flavílico hidroxilado nas posições C₃, C₅ e C₇, diferindo, entretanto, no número e posição dos grupos hidroxilas no anel B (ESCRIBANO-BAILÓN et al., 2004).

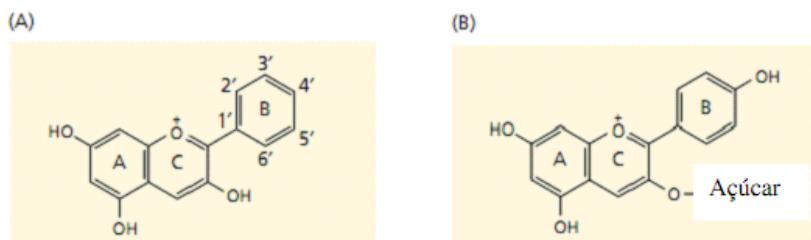


Figura 9. Detalhes da estrutura química das antocianidinas (**A** - **aglicona**) e antocianinas e (**B** - **derivado glicosilado**). A cor das antocianinas depende em parte, dos substituintes ligados aos carbonos do anel B (Tabela 3) (TAIZ; ZEIGER, 2009).

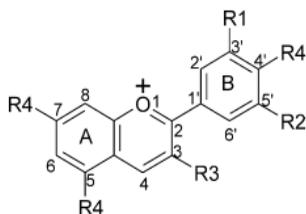


Figura 9C- Detalhe da estrutura química do cátion flavílium. R1 e R2 - H, OH, ou OCH₃; R3 - ose ou H; R4 - OH ou ose (KONG et al., 2003).

Tabela 3-Efeito dos substituintes do anel na cor das antocianidinas

Antocianidina	Substituintes	Cor
Pelargonidina	4'-OH	Vermelho alaranjado
Cianidina	3'-OH, 4'-OH	Vermelho violáceo
Delfinidina	3'-OH, 4'-OH, 5'-OH	Azul violáceo
Peonidina	3'-OCH ₃ , 4'-OH	Vermelho rosado
Petunidina	3'-OCH ₃ , 4'-OH, 5'-OCH ₃	Violeta

3.4.3 Funções das antocianinas em vegetais

Além dos efeitos de atração de polinizadores e dispersão de sementes, as antocianinas apresentam atividades fitoalexínica, antioxidante, antibacteriana, indutora de resistência das plantas ao ataque de insetos (KONG et al., 2003), proteção das células epidermais no pericarpo do grão de milho à radiação UV-B (280-320nm) (ABDEL-AAL; HUCL, 1999), osmoregulação, anti-herbivoria e fotoproteção (MANETAS, 2006; ESCRIBANO-BAILÓN et al., 2004).

3.4.4 Fatores que afetam a extração, o isolamento e a estabilidade das antocianinas

Para além de se encontrarem em flores, folhas, raízes e órgãos de reserva, as antocianinas encontram-se na forma (poli) hidroxilada ou metoxilada. A forma aglicona encontra-se unida a um ou mais açúcares, que por sua vez podem ser acilados por diversos ácidos orgânicos. A presença dos grupos hidroxilas, assim como de um ou mais açúcares, aumenta a solubilidade destes metabólitos em água, metanol e etanol. Quanto à estabilidade, as antocianinas sofrem reações quando da alteração de sua estrutura devido à deficiência eletrolítica do núcleo flavílico. Sua estabilidade aumenta com o número de grupos metoxilas e diminui com o aumento de grupos hidroxilas (ESCRIBANO-BAILÓN et al., 2004). Assim, a antocianidina mais estável é a malvidina, seguida de peonidina, petuinidina e cianidina. Em geral as antocianinas são mais estáveis ao pH baixo e a acilação e glicosilação aumentam sua estabilidade, sendo que os derivados diglicosídeos são mais estáveis que os monoglicosídeos (ESCRIBANO-BAILÓN et al., 2004).

A taxa de degradação de antocianinas é proporcional ao aumento da temperatura, da radiação luminosa e do pH, sendo mais pronunciada à medida que o meio tende à neutralidade, i.e., pH 4→7 (ESCRIBANO-BAILÓN et al., 2004).

A extração destes metabólitos tem sido comumente feita a frio (banho de gelo), com metanol ou etanol acidificados (ácido clorídrico, fórmico, acético, por exemplo), de modo a estabilizar o cátion flavílico, de cor vermelha, nas condições ácidas. No entanto, o meio de extração ácido poderá causar hidrólise parcial do grupo acil da antocianina acilada, especialmente quando estas estão aciladas com ácidos dicarboxílicos (i.e., ácido malônico). Em função disto, o uso de ácidos fracos é aconselhável (e.g., ácidos tartárico, acético) (ESCRIBANO-BAILÓN et al., 2004).

Para a análise do potencial de biomassas alimentares como fontes destes metabólitos secundários, geralmente a extração com etanol é preferida, em função de sua menor toxicidade, a despeito do menor rendimento em antocianinas observado, especialmente em relação ao uso de metanol. No entanto, Abdel-Aal e Hucl (1999), estudando o efeito de solventes (água, metanol e etanol) e do pH do meio de extração sobre o teor de antocianinas de milho, não detectaram diferenças significativas nos

valores de rendimento para os sistemas de solventes metanol e etanol acidificados. Por sua vez, Kuhnen (2007) relatou teores médios em equivalentes de cianidina-3-glicosídeo de 1,36 a 2,86 mg/g de flores femininas de variedades crioulas de milho usando como solvente metanol acidificado (MeOH-HCl 1%). Quando a extração com etanol é feita com aquecimento, artefatos podem ser produzidos por reações de esterificação com grupos carboxílicos livres (ex: grupos malonil conjugados nas antocianinas do milho). Além disto, caso o extrato contenha material lipídico, ou substâncias lipossolúveis (cera, clorofilas, e.g.), deverá ser tratado com solvente orgânico apolar (i.e., hexano), otimizando o rendimento de extração das antocianinas (ESCRIBANO-BAILÓN et al., 2004).

3.4.5 Importância econômica e na saúde dos compostos fenólicos e antocianinas

As antocianinas do milho roxo foram usadas pela civilização Inca na preparação de bebidas e na pigmentação de fibras têxteis. Ao longo da História, contudo, o foco de interesse sobre estes metabólitos foi direcionado aos seus efeitos sobre a saúde humana. Assim, dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipo-oxigenase *in vitro* (SOUSA et al., 2007). De fato, estudos demonstraram o efeito inibitório do crescimento de tumores de cólon uterino de antocianinas extraídas do milho roxo (GAMARA et al., 2009) e ao baixo risco de doenças crônicas, e.g., hipercolesterolemia e hiperglicemia (BELLIDO; BETA, 2009). De forma similar, Kim et al. (2007) reportaram que o grão integral do milho é uma boa fonte de compostos fenólicos antioxidantes em relação aos grãos refinados, principalmente derivados dos ácidos benzóico e cinâmico, sendo o ácido ferúlico o majoritário.

Em grãos de milho, os maiores teores destes compostos encontram-se no pericarpo (ABDEL-AAL et al., 2006), um aspecto anatômico favorável à sua extração, cuja produção mundial derivada daquela biomassa é estimada em 10.000 toneladas/ano, para um consumo médio de 215 mg/indivíduo, durante o verão, e de 180 mg/indivíduo, durante o inverno, nos EUA (ABDEL-AAL et al., 2006; HIEMORI et al., 2009). Neste contexto, as variedades de milho crioulo, por apresentarem diversidade de cores de folhas, flores e frutos, constituem-se em

promissores alimentos funcionais, justificando a análise da composição antociânica de seus tecidos.

Na indústria alimentícia, a oxidação lipídica é inibida por sequestradores de radicais livres e os compostos mais utilizados a esta finalidade são o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), *terc*-butil-hidroxiquinona (TBHQ), tri-hidroxibutilfenona (THBP) e o galato de propila (GP). Entretanto, estudos têm demonstrado a toxicidade destes antioxidantes. O GP, por exemplo, na presença de peróxido de hidrogênio, reage com íons ferrosos, formando espécies reativas de oxigênio, as quais são nocivas a componentes celulares. Em função dos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais que possam substituir com vantagens tecnológicas, econômicas e ambientais os compostos sintéticos em uso (SOUSA et al., 2007). Gamarra et al. (2009) relatam que a descoberta de antocianinas com grupamentos ácidos acilados, uma característica estrutural que aumenta a estabilidade destes metabólitos aos efeitos de temperatura e pH, intensificou sua procura em biomassas para uso alimentar. Neste contexto, uma vez mais se justifica a necessidade de análise destes metabólitos secundários em genótipos pouco estudados e explorados comercialmente como os milhos crioulos.

Por fim, Li et al. (2008) sugerem que a produção de alimentos ricos em antocianinas poderá afetar significativamente a atração e a seleção dos consumidores por produtos diferenciados. Estes autores descrevem ainda o uso industrial de antocianinas extraídas de variedades locais de milho como sequestradores de radical superóxido e sugerem que a seleção massal e o uso de técnicas de pedigree podem ser estratégias importantes ao desenvolvimento de variedades de milho local que expressem alto teor daqueles metabólitos secundários.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção de sementes e desenho experimental do ensaio

A obtenção de sementes crioulas assim como o desenho experimental do ensaio encontra-se descritos no capítulo um (1). Para este capítulo foram usadas para análise sementes de milho, folhas e flores femininas.

4.2 Preparo do material vegetal

Para este capítulo, o estudo teve como base amostras de grãos de milho, folhas secas e flores femininas. Após a debulha dos grãos de milho, estes foram peneirados, pesados e secos em estufa (65⁰C) até peso constante e armazenados em sacos de polietileno. Alíquotas desta biomassa foram trituradas em moinho laboratorial de facas (MB Braeski C.Q), conforme descrito no capítulo um (1) para a obtenção das farinhas. As amostras de folhas medianas (fase de enchimento do grão) adultas foram colhidas e processadas de forma similar ao descrito para as amostras de grãos. Por sua vez, as flores femininas foram coletadas imediatamente após a polinização, secas em estufa (30⁰C) a peso constante e armazenados em sacos de polietileno até posterior análise. A trituração das amostras desta biomassa foi feita em momentos imediatamente anteriores à sua análise, conforme descrito no *item 4.3.2* do capítulo para a obtenção das farinhas.

4.3 Extração e quantificação do teor de carotenóides totais em sementes, folhas e flores femininas

Ensaio foram conduzidos preliminarmente, objetivando testar a hipótese de que o tratamento hidrotérmico (cozimento) melhora o rendimento de extração de carotenóides de farinhas de grãos. Amostras de farinhas não submetidas ao tratamento hidrotérmico (*item 4.3.2*) foram utilizadas como referência de controle.

4.3.1 Extração com tratamento hidrotérmico

Amostras de farinha (1g) foram transferidas a um copo Becker (50 mL) contendo 5 mL de água destilada-deionizada fria. Cerca de 20 mL de água destilada-deionizada fervida foram adicionados, a suspensão foi agitada e aquecida a 100⁰C, durante 30 minutos, com agitação constante. Posteriormente, a massa gelatinizada foi arrefecida e a extração de

carotenóides foi feita a partir de 1g de massa fresca gelatinizada com umidade corrigida, com 10 mL de solução de haxano: acetona (1: 1 v/v) contendo 100 mg/l de BHT (hidroxitolueno butilado), incubando-se as amostras por 30 minutos no escuro, a temperatura ambiente. As amostras foram filtradas em suporte de celulose (0,45 μ m) sob vácuo, o extrato organosolvente coletado e lavado (3x) com água destilada (10 mL) para remoção de compostos hidrofílicos e concentrado sob fluxo em nitrogênio gasoso (AMAN et al., 2005). O resíduo concentrado foi dissolvido em hexano (3 mL), seguido da leitura da absorbância (450nm) em espectrofotômetro (*Gold Spectrum lab 53*). Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados foram expressos em (μ g/g) como media \pm desvio padrão.

4.3.2 Extração sem tratamento hidrotérmico

Amostras (1g) de farinha foram coletadas e processadas de forma similar ao descrito no item 4.3.1 para extração e determinação do conteúdo total de carotenóides, excluindo-se a etapa de tratamento hidrotérmico. De forma similar, as amostras de folhas e flores assim foram processadas para a obtenção dos extratos carotenóidicos de interesse. Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados foram expressos em (μ g/g de matéria seca) como media \pm desvio padrão.

A quantificação de carotenóides totais nos extratos organosolventes utilizou a fórmula de Lambert-Beer e o coeficiente de extinção molar da luteína (2348 M⁻¹cm⁻¹) (BRITTON, 1992).

$$\left[A = \varepsilon . l . c \right] \text{ (Equação 1)}$$

Onde: A -absorbância (450nm); ε - coeficiente de extinção molar; l - largura da cubeta (1 cm) e C - concentração.

4.3.3 Determinação do perfil de carotenóides de grãos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Alíquotas do extrato organosolvente (1 mL) foram coletadas e centrifugadas (3000 rpm/5min), recuperando-se 200 μ L do extrato. O perfil carotenóidico foi obtido via injeção das amostras (10 μ L) em cromatógrafo líquido (Shimadzu LC-10A), equipado com coluna C₁₈ de

fase reversa (Vydac 218TP54, 250 mm x 4,6 mm ϕ interno), termostata a 35°C e detector espectrofotométrico UV-visível, operando em 450nm. A eluição utilizou metanol: acetonitrila (90: 10 v/v) como fase móvel, em fluxo de 1mL/min. A identificação dos compostos de interesse (luteína, zeaxantina, α -, β -caroteno e β -criptoxantina) foi feita com base nos tempos de retenção determinados a partir de análises de padrões cromatográficos sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos carotenos e xantofilas baseou-se em curvas-padrão externas de β -caroteno ($y = 1019x$; $r^2 = 0,99$) e luteína ($y = 7044,96$; $r^2 = 0,99$), respectivamente, e considerou a intensidade dos picos de interesse para efeitos de cálculo. Os valores apresentados correspondem à média de 3 injeções/amostra (KUHNNEN, 2007), sendo expressos em ($\mu\text{g/g}$ de matéria seca).

4.4 Extração e quantificação de compostos fenólicos totais em sementes, folhas e flores femininas

Amostras de grãos, folhas e flores femininas trituradas (1g) foram adicionadas de 6 mL de metanol acidificado (MeOH-HCl 1%, v/v), seguida de incubação em banho de gelo (30 min). Cerca de 1 mL do extrato metanólico foi coletado, adicionado de 5 mL de metanol 95% (v/v) e agitado (Vortex). A 1 mL desta solução adicionaram-se 1 mL de etanol 95% (v/v), 5 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu, seguido de agitação (Vortex) e incubação por 5 minutos. Por fim, a solução foi adicionada de 1 mL de carbonato de sódio 5% (m/v) e incubada (1h, temperatura ambiente) para posterior leitura da absorbância (725nm - espectrofotômetro *Gold Spectrum Lab 53*, KUHNNEN, 2007). O conteúdo total de fenólicos foi expresso em equivalentes de ácido gálico, usando uma curva-padrão externa de ácido gálico ($y = 0,001x$, $r^2 = 0,99$). Todas as análises foram feitas em triplicata, sendo os valores expressos como média \pm desvio padrão ($\mu\text{g/g}$ de matéria seca).

4.5 Extração e quantificação do teor de antocianinas totais em sementes, folhas e flores femininas

O conteúdo total de antocianinas em sementes, folhas e flores femininas foi determinado como descrito por Abdel-Aal e Hucl, (1999). Amostras de biomassa (1g de matéria seca) foram transferidas para um copo Becker de 50 mL, seguido da adição de 24 mL de MeOH acidificado

(MeOH-HCl 1N, 85: 15 v/v), incubação (banho de gelo, 15 min) e centrifugação (3000 rpm/5min). O sobrenadante foi coletado e o volume ajustado para 50 mL com metanol acidificado. A absorbância do extrato (535nm – *Gold Spectrum lab 53*) foi lida e o conteúdo total de antocianinas foi calculado utilizando-se a equação 2 e o coeficiente de absorção molar de 25965 cm⁻¹M⁻¹.

$$\left[\text{CTA} (\mu\text{g} / \text{g}) = \left(\frac{\mathbf{A}}{\boldsymbol{\varepsilon}} \right) \cdot \left(\frac{\mathbf{v}}{1000} \right) \cdot \text{PM} \cdot \left(\frac{1}{\mathbf{PA}} \right) \cdot 10^6 \right] \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: **CTA** - conteúdo total de antocianinas; **A** - absorbância (535nm); **ε** - coeficiente de absorvidade molar; **v** - volume final do extrato; **PM** - peso molecular da cianidina-3- glicosídeo (449 g/mol); **PA** - peso da amostra.

Todas as análises foram feitas em triplicata, sendo os valores expressos como média ± desvio padrão e expressos em µg de equivalentes de cianidina-3-glicosídeo /100g de matéria seca.

4.6 Análises estatísticas

Os dados foram coletados, sumarizados e submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey (p<0.05) ou teste t quando conveniente. Para tal, os pacotes estatísticos Statistica (versão 6.0) e Prism GraphPad (versão 5.0), Mathtype (versão 6), foram utilizados. Todas as análises foram feitas em triplicata (n = 3).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Quantificação de carotenóides, antocianinas e compostos fenólicos totais em grãos, folhas e flores femininas de milhos crioulos e variedades híbridas.

5.1.1 Conteúdo total de carotenóides em grãos de milho crioulo com e sem tratamento hidrotérmico.

Os resultados de rendimento de extração de carotenóides dos grãos de milho crioulo (gerações F0, F1 e variedades comerciais) encontram-se sumarizados nas Figuras 10, 11 e 12. A análise da geração F0 revelou maiores teores daqueles metabólitos para a variedade RX, seguida das variedades MPA1 e PR (Figura 10a) na extração sem tratamento hidrotérmico com diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$, teste de Tukey). Na possibilidade de responder a hipótese previamente levantada de que o tratamento hidrotérmico poderia otimizar o rendimento de extração dos carotenóides, os resultados claramente mostraram uma diminuição no teor destes compostos, sugerindo a ocorrência de degradação destes com o aumento da temperatura (Figuras 10a e b).

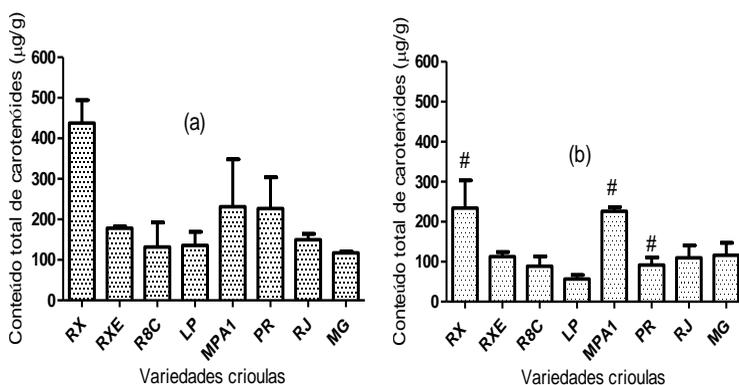


Figura 10-Teor de carotenóides totais em grãos de milho da geração F0. (a) Controle - sem tratamento hidrotérmico; (b) Com tratamento hidrotérmico. (# - indica diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$, teste de t) entre as variedades nos dois processos de extração. Os valores são expressos em µg/g de matéria de seca como média \pm desvio padrão de três repetições.

Os resultados encontrados corroboram com trabalhos prévios. Rodrigues-Amaya et al. (2008b) mencionam de que durante a extração e dosagem dos carotenóides, para além de outros fatores que podem concorrer para sua degradação, deve-se proteger de temperaturas elevadas as biomassas fontes. No entanto, são poucos os estudos sobre o efeito do cozimento da farinha do milho sobre o teor de carotenóides.

As Figuras 11a e 11b ilustram os resultados dos tratamentos hidrotérmico e controle sobre o rendimento de extração de carotenóides totais para as amostras de farinhas da geração F1.

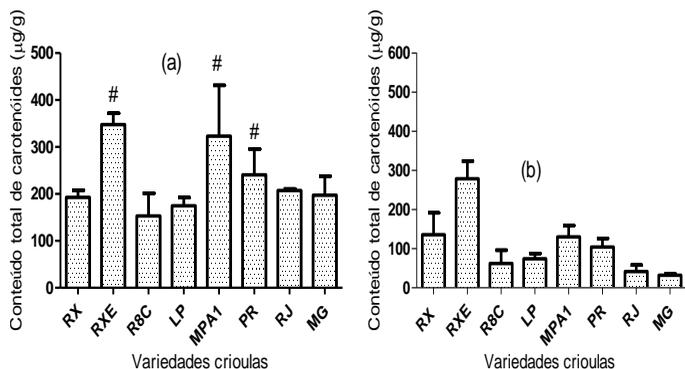


Figura 11-Teor de carotenóides totais em grãos de milho da geração F1. (a) Controle - sem tratamento hidrotérmico; (b) Com tratamento hidrotérmico. (# - indica diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$, teste de t) entre as variedades nos dois processos de extração. Os valores são expressos em $\mu\text{g/g}$ de matéria de seca como média \pm desvio padrão de três repetições.

Os resultados revelaram maior teor de carotenóides totais para a variedade RXE, seguida de MPA1 e PR (Figuras 11) sem tratamento hidrotérmico, diferindo estatisticamente em relação às demais variedades ($p < 0,05$) em estudo. O padrão de comportamento observado nas amostras da geração F0 foi similar, no que se refere ao efeito do tratamento hidrotérmico sobre o rendimento de extração de carotenóides totais das amostras dos genótipos da geração F1. Concentrações superiores foram detectadas nas biomassas não tratadas (controle), fato também observado nas amostras das variedades comerciais (Figura 12).

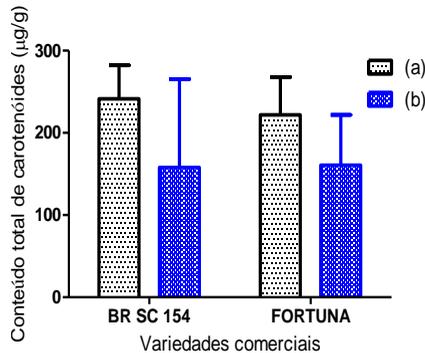


Figura 12-Teor de carotenóides totais em grãos de milho das variedades híbridas BR SC 154 e Fortuna. (a) Controle - sem tratamento hidrotérmico; (b) Com tratamento hidrotérmico. Os valores são expressos em $\mu\text{g/g}$ de matéria de seca como média \pm desvio padrão de três repetições.

Dentre as variedades híbridas comerciais (Figura 12), BR SC 154 destacou-se por seu maior teor de carotenóides na extração sem tratamento hidrotérmico, comparativamente à variedade Fortuna. No entanto, os teores são inferiores em relação ao observado para as variedades crioulas RX (F0), RXE e MPA1 (F1).

5.1.2 Concentração de carotenóides totais em folhas e flores femininas de variedades crioulas de milho

A análise de tecidos de folhas e flores femininas foi feita apenas para as amostras da geração F1. Para o extrato organossolvente foliar (Figura 13a), maiores teores destes metabólitos foram observados na variedade LP (837 $\mu\text{g/g}$), seguida dos genótipos MPA1, PR e R8C, ainda que não tenham sido detectadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$).

Para as amostras de flores femininas (Figura 13b), conteúdos superiores de carotenóides foram detectados para a variedade RX (734,48 $\mu\text{g/g}$), seguida dos genótipos PR, MPA1 e RJ, sem diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$). Os resultados revelaram o potencial superior das folhas e flores femininas como fontes destes pigmentos em comparação aos grãos das variedades crioulas de milhos (Figuras 13a e 13b).

Considerando-se que muitas vezes os tecidos foliares e florais são descartados, estes resultados demonstram que tais biomassas poderiam ser usadas para outros propósitos (i.e., indústrias farmacêutica e cosmética), gerando mais perspectivas de uso, valorização destas variedades crioulas assim como, servir de fonte de renda para os pequenos agricultores que cultivam essas variedades crioulas ricas em diversidade química.

Poucos são os estudos na literatura descrevendo a análise dos teores destes pigmentos em órgãos da mesma planta (e.g., grãos, folhas, e flores) e especialmente em genótipos crioulos. Resultados prévios (KUHNE, 2007; KUHNE et al., 2010) de conteúdos destes pigmentos em amostras de grãos e flores femininas revelam que tais partes (flores e sementes) da planta possuem quantidades apreciáveis de compostos do metabolismo secundário de interesse à saúde humana. Mais recentemente, Lemos (2010) descreveu que as folhas de variedades MG, PR, R8C, RX, LP e MPA, com destaque para R8C, são fontes ricas de carotenóides (i.e., 41 mg/g), assim como outros metabólitos secundários (antocianinas e fenólicos), comparativamente a outras espécies consideradas fontes clássicas daqueles metabólitos secundários (e.g., couve - 0,30 mg/g de β -caroteno; espinafre - 0,041 a 0,094 mg/g de β -caroteno e cenoura (0,182 mg/g de β -caroteno) (LEMOS, 2010). Por sua vez, Kuhne (2007) detectou concentrações de carotenóides em flores de milho crioulo de 41,45 μ g/g a 201,89 μ g/g e de 2,01 μ g/g a 19,63 μ g/g em sementes das variedades em estudo neste trabalho. Contudo, os dados observados para as VMC LP e RX apresentaram teores superiores aqueles reportados por Kuhne (2007) e Lemos (2010), revelando o efeito da sazonalidade, de manejo dos cultivos e das condições edafoclimáticas associado às safras. As análises estatísticas dos resultados deste estudo mostraram diferenças significativas entre as amostras de órgãos ($p < 0,05$) para a variável teor de carotenóides, claramente indicando uma distribuição não homogênea destes pigmentos no organismo vegetal.

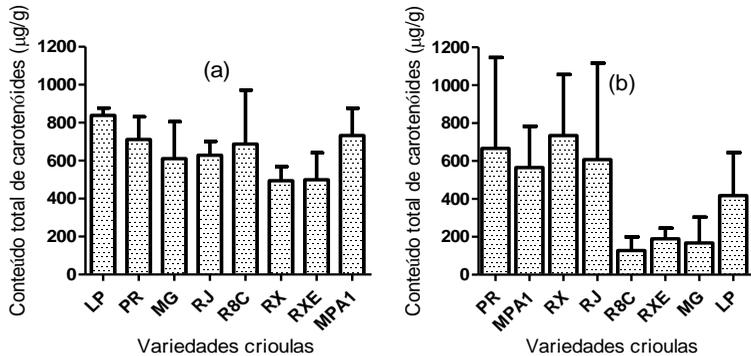


Figura 13-Teor de carotenóides totais em variedades crioulas de milho. (a) Folhas das variedades da geração F1; (b) Flores femininas das variedades da geração F1. Valores estão expressos em $\mu\text{g/g}$ de matéria de seca como (média \pm desvio padrão) de três repetições.

A composição de carotenóides em tecidos vegetais e alimentos derivados é afetada por fatores (a)bióticos e estes metabólitos não apresentam distribuição uniforme entre os diversos órgãos e tecidos de uma planta (frutos, sementes, folhas e flores, por exemplo) (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008a, 2008b). Além disto, discrepâncias intervarietais são bem descritas na literatura quanto à variável em estudo (SU et al., 2002), sugerindo que a variabilidade fenotípica do germoplasma em estudo concorre positivamente à seleção de materiais para o melhoramento de variedades de milho com altos teores de carotenóides em seus tecidos de interesse.

5.1.3 Separação, identificação e quantificação de carotenóides em sementes de milho por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A análise dos extratos de sementes de milho via CLAE revelou serem as xantofilas luteína e zeaxantina os carotenóides predominantes (Tabelas 4 e 5), sendo também detectadas pequenas quantidades de β -criptoxantina, α -caroteno, β -cis e β -trans-caroteno em algumas amostras (Tabelas 4 e 5). Os perfis de eluição cromatográfica revelaram ainda a existência de outros sinais, cuja identificação dos compostos não foi possível devido à inexistência de padrões comerciais à CLAE. As análises quantitativas

dos compostos majoritários (luteína e zeaxantina) mostraram amplitudes de concentração de 2,11 µg/g a 31,44 µg/g - luteína e de 0,82 a 21,18 µg/g - zeaxantina nas VMC da geração F0. Maiores teores de luteína foram detectados nos genótipos RXE (31,44 µg/g) e PR (26,02 µg/g), com diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$), enquanto para zeaxantina as concentrações foram observadas para a variedade PR (Tabela 4).

Tabela 4-Conteúdo de carotenóides (µg/g de matéria seca) em grãos de variedades crioulas de milho (F0), determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os valores correspondem à média \pm desvio padrão de 3 injeções por amostra. **nd** = não detectado. Letras diferentes entre linhas indicam diferenças estatísticas significativas a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Variedade	Luteína	Zeaxantina	β -criptoxantina	Carotenos			Total
				α	β -cis	β -trans	
RX-0	13,30 \pm 1,48 _c	4,15 \pm 5,25 _c	nd	Nd	nd	nd	17,45
RXE-0	31,44 \pm 1,32 _a	6,22 \pm 13,92 _a	nd	Nd	nd	nd	37,66
LP-0	5,77 \pm 0,36 _c	3,05 \pm 1,94 _c	nd	Nd	nd	nd	8,82
MG-0	10,82 \pm 0,39 _a	2,36 \pm 4,62 _c	nd	4,07 \pm 0,00	nd	nd	17,05
RJ-0	3,86 \pm 0,39 _c	0,82 \pm 1,67 _c	0,26 \pm 0,09 _c	Nd	nd	nd	4,94
RBC-0	2,11 \pm 1,13 _c	1,47 \pm 1,07 _c	nd	Nd	nd	nd	3,58
MPA1-0	15,66 \pm 13,59 _b	8,53 \pm 9,35 _b	3,47 \pm 4,30 _a	nd	nd	16,33 \pm 0,00 _a	43,99
PR-0	26,02 \pm 16,81 _b	21,18 \pm 14,46 _b	1,44 \pm 0,35 _b	nd	4,12 \pm 0,00	3,88 \pm 0,98 _b	56,64

Os valores de concentração de carotenóides de grãos da geração F1 das VMC e das variedades híbridas são mostrados na Tabela 5. De forma similar ao observado nas amostras da geração F0, luteína (4,70 a 34,97 µg/g) e zeaxantina (2,31 a 21,12 µg/g) foram os carotenóides majoritários na geração F1, com destaque para a variedade PR que se mostrou superior em conteúdo para ambos os compostos (34,97 - luteína e 21,12 µg/g - zeaxantina). Em sua maioria, os genótipos da geração F1 apresentaram teores médios de luteína e zeaxantina mais elevados, comparativamente à geração F0 e a detecção dos carotenos (α -, β -caroteno) foi mais evidente na F1. Além disto, as variedades híbridas evidenciaram discrepâncias proeminentes em seus conteúdos de luteína e zeaxantina, a saber: BR SC 154 (44,06 e 19,05 µg/g) e Fortuna (3,98 e 3,83 µg/g), respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5- Teor de carotenóides ($\mu\text{g/g}$ de matéria seca) em grãos de variedades crioulas e híbridas de milho, determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os valores correspondem à média \pm desvio padrão de 3 injeções por amostra. **nd** = não detectado. Letras diferentes entre linhas indicam diferenças estatísticas significativas a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Variedade	Carotenos						Total
	Luteína	Zeaxantina	β -criptoxantina	α	β -cis	β -trans	
RX-1	11,84 \pm 0,03 ₁	5,12 \pm 4,51 ₁	nd	7,01 \pm 0,39 ₁	1,11 \pm 0,00 ₂	nd	25,08
RXE-1	12,38 \pm 10,58 ₂	14,59 \pm 14,39 ₂	4,54 \pm 7,03 ₂	7,42 \pm 4,36 ₂	29,72 \pm 0,00 ₂	11,16 \pm 7,57 ₂	79,81
LP-1	20,55 \pm 0,64 ₃	9,86 \pm 9,41 ₃	2,81 \pm 8,20 ₃	10,00 \pm 0,20 ₃	nd	3,98 \pm 0,17 ₃	47,20
MG-1	4,70 \pm 0,13 ₄	2,31 \pm 2,19 ₄	0,31 \pm 1,99 ₄	24,89 \pm 0,32 ₄	23,73 \pm 0,00 ₄	nd	55,94
RJ-1	11,21 \pm 0,98 ₅	5,27 \pm 5,08 ₅	nd	8,93 \pm 0,96 ₅	nd	nd	25,41
R8C-1	30,43 \pm 2,85 ₆	13,15 \pm 11,74 ₆	2,42 \pm 12,74 ₆	16,39 \pm 3,18 ₆	nd	5,08 \pm 3,25 ₆	67,47
MPA1-1	32,52 \pm 2,16 ₇	12,37 \pm 11,92 ₇	2,61 \pm 13,63 ₇	14,14 \pm 2,57 ₇	nd	11,37 \pm 1,28 ₇	73,01
PR-1	34,97 \pm 1,86 ₈	21,12 \pm 19,99 ₈	2,87 \pm 14,69 ₈	3,78 \pm 0,84 ₈	11,08 \pm 0,76 ₈	10,56 \pm 1,32 ₈	84,38
BR SC 154	44,06 \pm 3,21 ₉	19,05 \pm 18,73 ₉	9,45 \pm 16,46 ₉	2,27 \pm 0,88 ₉	45,04 \pm 5,11 ₉	28,12 \pm 2,76 ₉	147,99
FORTUNA	3,98 \pm 0,08 ₀	3,83 \pm 3,56 ₀	nd	nd	5,28 \pm 0,92 ₀	1,06 \pm 0,00 ₀	14,15

Os resultados encontrados neste estudo corroboram com relatos prévios que descrevem teores de luteína e zeaxantina de 0,5 a 23 $\mu\text{g/g}$ em grãos de milho (MANGELS et al., 1993). Contudo, as VMC RXE-0, PR-0, MPA1-1, R8C-1 e PR-1 mostraram teores daquelas xantofilas ainda mais elevados, revelando seu potencial como fonte de xantofilas de importância à saúde e nutrição humana.

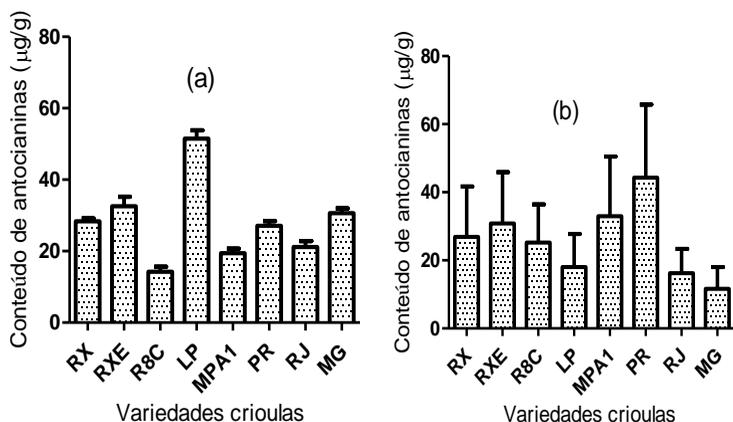
Kuhnen (2007) descreveu para farinhas de milhos crioulos catarinenses teores de luteína, zeaxantina e carotenóides totais de 0,06 a 3,69, 0,08 a 10,70 $\mu\text{g/g}$ e 2,01 a 19,63 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Portanto, os valores encontrados neste estudo são superiores aos observados anteriormente por Kuhnen (2007), fato que revela que para além deste material ser rico em diversidade química, fatores sazonais e de safra influenciam sobremaneira a síntese destes metabólitos secundários, uma vez que algumas variedades são coincidentes entre os estudos. Além disto, considerando-se apenas as diferenças edafoclimáticas entre as regiões de cultivo para a mesma geração, i.e. F1, as biomassas amostrais oriundas da região litorânea (Florianópolis, SC - Fazenda da Ressacada/CCA/UFSC) apresentaram maiores conteúdos destes compostos em relação às amostras de Anchieta, região extremo oeste de

SC. Tal fato é de importância quando se busca a otimização de sistemas de cultivo, visando atender a demandas crescentes de escala, como requerido por complexos agroindustriais.

Por outro lado, conteúdos inferiores de β -criptoxantina, α , e β -carotenos foram observados nos grãos das VMC comparativamente a luteína e zeaxantina. Dentre as variedades da geração F1 com maiores concentrações daqueles compostos RXE, MG e PR merecem destaque, enquanto para as variedades híbridas, BR SC 154 apresentou os maiores conteúdos de carotenóides totais ($\sim 148 \mu\text{g/g}$ de matéria seca) dentre todas as amostras analisadas (Tabela 5).

5.1.4 Conteúdo de antocianinas totais em grãos de milho de variedades crioulas (gerações F0 e F1) e comerciais

Os resultados da análise dos extratos de grãos das gerações F0 e F1 e das variedades híbridas encontram-se na Figura 14 (a, b, c). Na geração F0 (Figura 14a) maiores concentrações de antocianinas foram detectadas para a variedade LP ($51,49 \mu\text{g/g}$), seguida de RXE, MG e RX. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre RXE, MG e RX. Nas amostras da geração F1 (Figura 14b), a variedade PR ($44,29 \mu\text{g/g}$) apresentou teores superiores de antocianinas, seguida dos genótipos MPA1, RXE e RX, ainda que estes sejam estatisticamente semelhantes.



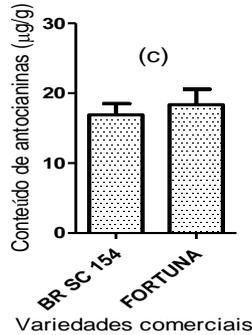


Figura 14-Antocianinas totais ($\mu\text{g/g}$) de grãos de variedades crioulas e híbridas de milho. (a) geração F0, (b) geração F1 e (c) variedades híbridas comerciais. Os valores são expressos em μg de equivalentes de cianidina-3-glicosídeo/g de matéria de seca e referem-se a media \pm desvio padrão de três repetições.

As variedades comerciais (Figura 14c) não diferiram entre si estatisticamente ($p < 0,05$) quanto ao conteúdo total de antocianinas, porém apresentaram teores inferiores daqueles metabólitos quando comparadas às variedades crioulas LP, RX, RXE, MG-(F0) e RX, RXE, MPA1 e PR-(F1).

Os genótipos crioulos evidenciaram uma grande amplitude de valores (14,22 $\mu\text{g/g}$ - R8C a 51,49 $\mu\text{g/g}$ - LP, F0 e 11,62 $\mu\text{g/g}$ - MG a 44,49 $\mu\text{g/g}$ - PR, F1) na concentração de compostos antocianínicos nos tecidos de grãos, sugerindo que as variedades, independentemente de serem cultivadas na mesma região e sob o mesmo sistema de manejo, têm dinâmicas distintas de regulação da síntese destes compostos. Os resultados observados são similares aos descritos por Li et al. (2008), analisando o teor de antocianinas em amostras de casca, sabugo, folhas de *Z. mays* encontraram valores de 1,25% a 13,18% (casca), 0,49% a 4,60% (sabugo) e de 0,12% a 0,93% (folhas) em equivalentes a cianidina-3-glicosídeo. De forma semelhante, Kuhnén (2007) descreveu em folhas de milho crioulo teores de 1,36 (PR) a 2,86 (RXE) mg de equivalentes de cianidina-3-glicosídeo/g e de 16,43 a 27,07 mg de equivalentes de cianidina-3-glicosídeo/g de flores femininas (KUHNEEN et al., 2010). Em seu conjunto, os resultados revelam que os compostos antocianínicos encontram-se distribuídos no organismo vegetal de forma

heterogênea em seus conteúdos e que em função dos valores detectados, as biomassas foliar e floral feminina de *Z. mays* são fontes potencial destes compostos bioativos de crescente interesse mercadológico.

As antocianinas têm alcançado reconhecimento como pigmentos naturais devido à segurança de uso na dieta humana como corantes de alimentos, bem como de suas propriedades biológicas. No entanto, a maior parte da literatura descreve estudos com genótipos de milho roxo como fonte destes pigmentos, enquanto os dados do presente estudo revelam que não apenas os fenótipos roxos das VMC são fontes potenciais destes compostos, uma vez que outras variedades (i.e., MPA1, MG, LP - grãos amarelos) também evidenciaram comportamento semelhante.

5.1.5 Teor de antocianinas totais em folhas e flores femininas de milhos crioulos

De forma similar ao observado para os teores de carotenóides, as amostras de tecidos foliar e de flores femininas apresentaram conteúdos superiores de antocianinas (Figura 15a e 15b) comparativamente aos grãos de milho. As variedades PR, seguida de RX, RXE, MPA1 (Figura 15a) revelaram os maiores valores de acúmulo destes metabólitos nos tecidos foliares, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$). Por sua vez, a análise dos extratos florais (Figura 15b) demonstrou que as variedades MG e R8C apresentaram os maiores teores de antocianinas, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais genótipos. Teores apreciáveis também foram detectados em amostras da variedade RXE.

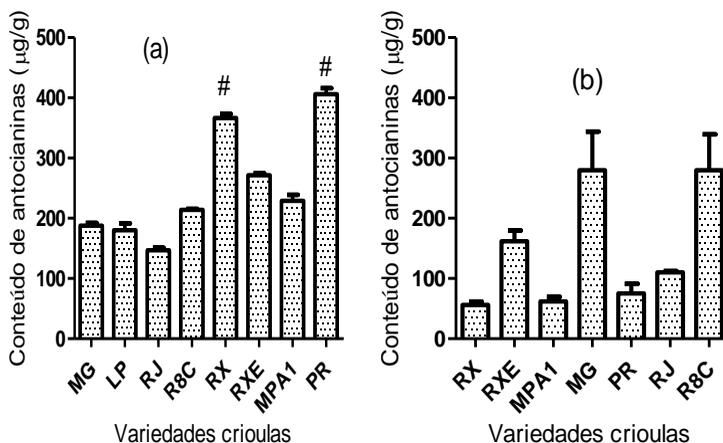


Figura 15-Antocianinas totais ($\mu\text{g/g}$) de \u00f3rg\u00e3os de variedades crioulas de milho. **(a)** Folhas da gera\u00e7\u00e3o F1; **(b)** Flores da gera\u00e7\u00e3o F1 (a variedade LP n\u00e3o foi analisada). Os valores s\u00e3o expressos em μg de equivalentes de cianidina-3-glicos\u00eddeo/g de mat\u00e9ria de seca e referem-se a media \pm desvio padr\u00e3o de tr\u00eas repeti\u00e7\u00f5es. (#-indica diferen\u00e7as significativas pelo teste t (5%) nas variedades em folhas e flores)

A grande varia\u00e7\u00e3o de conte\u00fados de antocianinas totais detectada nos tecidos em an\u00e1lise i.e., 146,75 $\mu\text{g/g}$ - RJ a 405,841 $\mu\text{g/g}$ - PR (tecido foliar) e de 56,11 $\mu\text{g/g}$ - R8C a 279,99 $\mu\text{g/g}$ - MG (flores femininas) assemelha-se ao observado nas amostras de gr\u00e3os, ampliando o potencial de uso de biomassa de VMC para al\u00e9m do convencional, i.e., gr\u00e3os. De fato, esta abordagem enquadra-se na defini\u00e7\u00e3o da explora\u00e7\u00e3o otimizada de biomassa de VMC como fonte de compostos bioativos de interesse, por exemplo, no desenvolvimento de produtos dedicados, i.e., nutrac\u00eauticos. Neste contexto, a identifica\u00e7\u00e3o da disponibilidade destes pigmentos em alimentos como o milho, i.e., variedades crioulas, \u00e9 de import\u00e2ncia para o entendimento do mecanismo de a\u00e7\u00e3o destes na dieta, em estudos de biodisponibilidade e na preven\u00e7\u00e3o de doen\u00e7as, por exemplo.

5.1.6 Conteúdo de compostos fenólicos totais em grãos de milho crioulo (gerações F0 e F1) e de variedades híbridas

As análises dos extratos de sementes mostraram uma grande variabilidade de conteúdo de compostos fenólicos e diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as duas gerações de milho; fato este também constatado para carotenóides e antocianinas. Nas amostras da geração F0 uma amplitude de valores de conteúdo de fenólicos totais de 91 $\mu\text{g/g}$ (PR) a 205 $\mu\text{g/g}$ (R8C) foi detectada, enquanto a geração F1 apresentou uma maior amplitude de valores, i.e., 19,33 $\mu\text{g/g}$ (LP) a 161,67 $\mu\text{g/g}$ (RXE). Conteúdos superiores daqueles metabólitos secundários foram observados para as variedades R8C, LP e RX na geração F0, conforme demonstrado na Figura 16a.

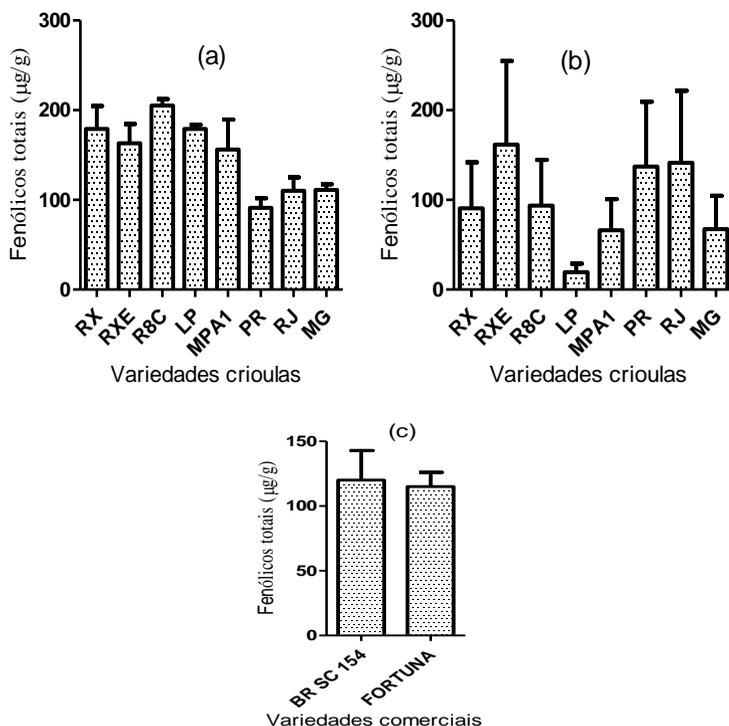


Figura 16-Compostos fenólicos totais em grãos de variedades crioulas e híbridas de milho. (a) geração F0, (b) geração F1, (c) variedades híbridas comerciais. Os valores são expressos em $\mu\text{g/g}$ de matéria de seca e referem-se a media \pm desvio padrão de três repetições.

Em relação às amostras da geração F1 (Figura 16b), maiores teores de compostos fenólicos totais foram detectados nos genótipos RXE, RJ e PR, com diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$, teste de Tukey). As variedades híbridas comerciais (Figura 16c), por sua vez, apresentaram valores semelhantes (115 $\mu\text{g/g}$ - Fortuna e 120 $\mu\text{g/g}$ - BR SC 154) de concentração dos metabólitos em estudo, um comportamento também observado nas análises dos conteúdos de carotenóides e antocianinas.

Os resultados demonstram que os grãos de algumas variedades crioulas de milho (e.g., LP, R8C, RXE, RJ, PR) acumulam compostos fenólicos em seus tecidos de forma superior aos genótipos híbridos. De fato, a ativação da síntese destes compostos nessas variedades constitui um dos mecanismos de defesa da planta e, não raro, as variedades crioulas expressam fenótipos de resistência a estresses (abióticos não observados nos genótipos híbridos). Tal fato poder ser explicado, em alguma extensão, pela maior amplitude da base genética das variedades crioulas em relação às híbridas. Assim, o uso de variedades crioulas em programas de melhoramento genético poderá contribuir à obtenção de novas variedades com fenótipos de resistência a determinado estresse ambiental e com maior valor nutricional, em função do reconhecido efeito antioxidante dos compostos fenólicos, por exemplo. Resultados similares em grãos de variedades crioulas de milho, 516,29 $\mu\text{g/g}$ a 1132,04 $\mu\text{g/g}$, foram reportados por Kuhnen (2007), fato que mais uma vez revela o grande potencial deste material crioulo como fonte de compostos antioxidantes.

5.1.7 Concentração de compostos fenólicos totais em folhas e flores femininas de milhos crioulos

Os resultados das análises quantitativas de compostos fenólicos totais dos extratos foliares e de flores femininas encontram-se sumarizados nas Figuras 17a e 17b. Em amostras de tecidos foliares (Figura 17a), o acúmulo de compostos fenólicos foi observado de maneira proeminente para o genótipo RX (655 $\mu\text{g/g}$), seguido de LP, MG, PR e RJ, ainda que diferenças estatísticas significativas não tenham sido detectadas para estas últimas quatro variedades de milho. De outra forma, a análise dos extratos das flores femininas revelou maiores concentrações de compostos fenólicos às variedades RJ, PR e RXE (846, 645 e 484 $\mu\text{g/g}$,

respectivamente) com diferenças estatísticas significativas ao nível de significância de 5% (teste de Tukey).

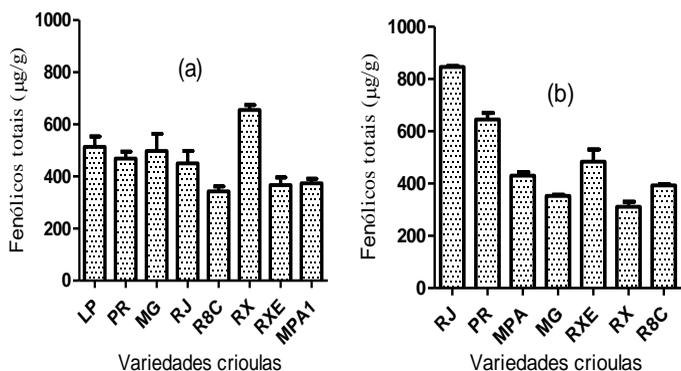


Figura 17-Compostos fenólicos totais ($\mu\text{g/g}$) de folhas (a) e flores femininas (b) de variedades crioulas de milho, geração F1. Os valores são expressos em $\mu\text{g/g}$ de matéria de seca e descrevem a média \pm desvio padrão de três repetições.

Os resultados obtidos revelam que as flores femininas das variedades crioulas de milho apresentaram, em média, maiores conteúdos de compostos fenólicos, comparativamente às amostras de grãos e folhas das mesmas variedades. Tal fato permite afirmar que as flores femininas dos genótipos em estudo, uma biomassa com nenhuma aplicação corrente, constituem fontes riquíssimas e preferenciais de compostos fenólicos e podem ser usadas, por exemplo, em estudos de atividades farmacológicas. Neste contexto, diversos relatos descrevem o efeito positivo de infusões de flores femininas de *Z. mays* no tratamento de disfunções genito-urinárias. A análise detalhada da composição química destas biomassas encontra relato recente na literatura (KUHNE et al., 2010) para algumas variedades crioulas de milho, e.g., 227,06 mg/100g (Rosado) a 679,86 mg/100g (LP) em flores femininas e 61,846 mg/100g (MPA1) a 88,155 mg/g (PR) em folhas (LEMONS, 2010). Contudo, assume-se que um maior detalhamento do efeito de fatores (a)bióticos, da sazonalidade e das gerações de cultivo, por exemplo, faz-se necessário, como forma de subsidiar as informações etnofarmacológicas e eventualmente estimular a expansão das áreas de cultivo de determinados genótipos crioulos.

Biomassas vegetais descartadas (i.e., subprodutos) em sistemas produtivos de alimentos, sucos, caldos, extratos (e.g.,) têm usualmente gerado problemas ambientais (OLIVEIRA et al., 2009; WANG et al., 2009). De forma similar, em pequenas propriedades rurais, as biomassas de folhas e flores do milho não constituem produto de interesse no sistema de produção de grãos e não são utilizadas em larga escala, excetuando-se a produção de silagem. Os resultados deste estudo claramente mostram que estas partes da planta são fontes ricas de metabólitos secundários e que poderão ter aplicação no desenvolvimento de novos produtos de interesse aos setores farmacêutico, de alimentos e de cosméticos, e.g. Assumindo-se como verdadeira a assertiva anterior, pode-se vislumbrar a ampliação das áreas de cultivo de genótipos crioulos de milho, incentivando a preservação deste germoplasma e ampliando as possibilidades de retornos econômicos aos pequenos produtores rurais.

6 CONCLUSÕES

A análise dos conteúdos totais de carotenóides, antocianinas e compostos fenólicos em grãos, folhas e flores femininas das variedades crioulas e híbridas de milho permitiu concluir que:

Teores superiores de carotenóides foram encontrados em amostras de tecido foliar da variedade crioula LP, de flores femininas da variedade RX e de sementes do genótipo RXE;

Variedades crioulas de milho são fontes ricas de carotenóides em relação às variedades híbridas;

O teor de carotenóides apresentou variações expressivas entre os genótipos e regiões de cultivo (Anchieta e Florianópolis, SC), revelando os efeitos ambientais e de manejo sobre o conteúdo daqueles metabólitos secundários nas biomassas estudadas

O teor médio de carotenóides foi superior na geração F1 comparativamente a F0 e variedades híbridas, revelando a necessidade de análises contínuas das biomassas ao longo das gerações de cultivo.

O tratamento hidrotérmico aplicado na extração de carotenóides de farinhas de grãos de milhos de variedades crioulas degradou estes compostos em alguma extensão

A análise dos extratos de sementes por CLAE revelou serem as xantofilas luteína e zeaxantina os compostos majoritários, com destaque para as VMC RXE-0, PR-0, PR-1, MG-1 e RXE-1.

O teor de carotenóides foi superior nas biomassas de grãos da geração F1, comparativamente ao observado para a geração F0, com destaque para as maiores concentrações de carotenos (α - e β -caroteno) nas amostras da geração F1, e.g., genótipos PR-1, MG-1 e RXE-1

A variedade híbridas BR SC 154 destacou-se por seu conteúdo total de carotenóides comparativamente a todas as amostras estudadas.

O teor de antocianinas totais foi maior em grãos de variedades crioulas, comparativamente aos genótipos híbridos analisados;

Maiores concentrações de antocianinas totais foram detectadas em amostras de tecido foliar, de flores femininas e de grãos das variedades crioulas PR, MG e R8C, respectivamente;

Conteúdos superiores de compostos fenólicos foram observados em amostras de flores femininas, folhas e grãos dos genótipos crioulos RJ, RX e R8C, respectivamente.

Variedades de milho crioulo exibiram quantidades apreciáveis de carotenóides, antocianinas e compostos fenólicos em órgãos de pouca ou nenhuma importância comercial, i.e., folhas e flores femininas, as quais constituem ótimo material de exploração de compostos do metabolismo secundário para fins farmacêuticos e na indústria cosmética, por exemplo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AAL, E-S.M., HUCL, P. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. **Cereal Chemistry** 76, 350-354 (1999).

ABDEL-AAL, E-S.; YOUNG, J.C.; RABLSKI, I. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple and red cereal grains. **Journal of Agriculture and Food Chemistry** 54, 4696-4704 (2006).

AFRICAN UNION. African Regional Nutritional Strategy. 2005-2015. Disponível em www.african-union.org, acessado em 04 de Janeiro de 2011. (2005).

AMBRÓSIO, C.L.B; CAMPOS, F.A.C.S; FARO, Z.P. Carotenóides como alternativa contra hipovitaminose A. **Revista de Nutrição** 19, 233-243 (2006).

AHARONI, A.; GALILI, G. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. **Current Opinion in Biotechnology** 22, 1-6 (2010).

AMAN, R.; BIEHL, J.; CARLE, R.; CONRAD, J.; BEIFUSS, U.; SCHIEBER, A. Isolation of carotenoids from plant materials and dietary supplements by high-speed counter current chromatography. **Journal of Chromatography A** 1074, 99-105 (2005).

BAI, H.; HAI, C.; XI, M.; LIANG, X.; LIU, R. Protective effect of maize silks (*Maydis stigma*) ethanol extract on radiation-induced oxidative stress in mice. **Plant Foods for Human Nutrition** 65, 271-276 (2010).

BINO, R.J, FIEHN, O, KOPKA, J., SAITO, K., DRAPER, J., NIKOLAU, B.J., MENDES, P., ROESSNER-TUNALI, U., BEALE, M.H., TRETHERWEY, R.N., LANGE, B.M., WURTLE, E.S., SUMNER, L.W. Potential of metabolomics as functional genomics tools. **Trends in Plant Science** 9, 418-425 (2004).

BRITTON, G. Natural food colorants. **Carotenoids** 5, 141-182. University of Liverpool. United Kingdom. (1992).

BELLIDO, G.G., BETA, T. Anthocyanin composition and oxygen radical scavenging capacity (ORAC) of milled and pearled purple, black and common barley. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 57, 1022-1028 (2009).

ESCRIBANO-BAILÓN, M.T.; SANTOS-BELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J.C. Anthocyanins in cereals. **Journal of Chromatography A** 1054, 129-141 (2004).

GARCIA-CASAL, M.N. Carotenoids increase iron absorption from cereal-based food in the human. **Nutrition Research** 26, 340-344 (2006).

GAMARRA, F.M.C; LEME, G.C; TAMBOURG, E.B; BITTENCOURT, E. Extração de corantes de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 28, 62-69 (2009).

GRANADO, F.; OLMEDILLA, B.; MARTINEZ, G.; BLANCO, I. A fast, reliable and low-cost saponification protocol for analysis of carotenoids in vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis** 14, 479-489 (2001).

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Medicinal plants: Factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova** 30, 374-381 (2007).

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry** 68, 2831-2846 (2007).

HERRMANN, K.M & WEAVER, L.M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology** 50, 473-503 (1999).

HIEMORI, M.; KOH, E.; MITCHELL, A.E. Influence of cooking on anthocyanins in black rice (*Oryza sativa* L. japonica var SBR). **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 57, 1908-1914 (2009).

KIM, M.J., HYUN, J.N., KIM, J.A., PARK, J.C., KIM, M.Y., KIM, J.G., LEE, S.J., CHUN, S.C., CHUNG, I.M. Relationship between

phenolic compounds, anthocyanin content and antioxidant activity in colored barley germoplasm. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 55, 4802-4809 (2007).

KONG, J.-M.; CHIA, L.-S.; GOH, N.-K.; CHIA, T.-F.; BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry** 64, 923-933 (2003).

KUHNEN, S. Metabolômica e bioprospecção de variedades crioulas e locais de milho. Tese de Doutorado em Recursos Genéticos e vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil. (2007).

KUHNEN, S.; LEMOS, P.M.M.; CAMPESTRINI, L.H.; DIAS, P.F.; MARASCHIN, M. Antiangiogenic properties of carotenoids: A potential role of maize as functional food. **Journal of Functional Foods** 1, 284-290 (2009).

KUHNEN, S.; OGLIARI, J.B.; DIAS, P.F.; SANTOS, M.F.; FERREIRA, A.G.; BONHAM, C.C.; WOOD, K.V.; MARASCHIN, M. Metabolic fingerprint of Brazilian maize landraces silks (Stigmata/styles) using NMR spectroscopy and chemometric methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 58, 2194-2200 (2010).

KUTCHAN, T.; DIXON, R.A. Physiology and metabolism. Secondary metabolism: nature's chemical reservoir under deconvolution. **Current Opinion in Biotechnology** 8, 227-229 (2005).

LEMOS, P.M.M. Determinação do metaboloma foliar parcial de variedades crioulas de milho (*Zea mays* L.) visando à caracterização dos extratos foliares contendo (poli) fenóis e carotenóides. Tese de Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Brasil. (2010).

LI, C.Y., KIM, H.W., WON, S.R., MIN, H.K., PARK, K.J., AHN, M.S., RHEE, H.I. Corn husk as a potential sources of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 56, 11413-11416 (2008).

MANETAS, Y. Why some leaves are anthocyanic and why most anthocyanic leaves are red? **Flora** 201, 163-177 (2006).

MENKIR, A.; LIU, W.; WHITE, W.S.; MAZIYA-DIXON, B.; ROCHEFORD, T. Carotenoid diversity in tropical-adapted yellow maize inbred lines. **Food Chemistry** 109, 521-529 (2008).

MENGELS, A.R.; HOLDEN, J.M.; BEECHER, G.R.; FORMAN, M.R.; LANZA, E. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytical data. **Journal of American Diet Association** 93, 284-296 (1993).

MERTZ, C.; GANCEL, A-L.; GUNATA, Z.; ALTER, P.; DHUIQUE-MAYER, C.; VAILLANT, F.; PEREZ, A.M.; RUALES, J. ; BRAT, P. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity of three tropical fruits. **Journal of Food Composition and Analysis** 22, 381-387 (2009).

NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. Artmed Editora S.A. Porto Alegre. Brasil. Cap.19, 744-745p. (2011).

OLIVEIRA, A.C., VALENTIM, L.B., SILVA, C.A., BECHARA, J.J.H., BARROS, M.P., MANO, C.M., GOULARD, M.O.F. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry** 115, 469-475 (2009).

PEREZ, L.E.P. Metabolismo secundário. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, pp1-26, disponível em www.daneprairie.com, acessado em 20 de Dezembro de 2010. (2010).

POZO-INSFRAN, D.D.; SALDIVAR, S.O.S.; BRENES, C.H.; TALCOTT, T. Polyphenolics and antioxidant capacity of white and blue corns processed into tortillas and chips. **Cereal Chemistry** 84, 162-168 (2007).

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B., KIMURA, M., GODOY, H.D., AMAYA-FARFAN, J. Updated brazilian databases on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. **Journal of Food Composition and Analysis** 21, 445-463 (2008a).

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B., KIMURA, M., GODOY, H.D., AMAYA-FARFAN, J. Fontes brasileiras de carotenóides. *Ministério do meio ambiente, CID Ambiental (2ª edição)*. Brasil, p 101. (2008b).

SOUSA, C.M.M.; SILVA, I.R.; VIERA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAUJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAUJO, P.B.M.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova** 30, 351-355 (2007).

SU, Q., ROWLEY, K.G., BALAZS, N.D.H. Carotenoids: separation methods applicable to biological methods. **Journal of Chromatography** 781, 393-418 (2002).

SCHULZ, H.; BARANSKA, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy** 43, 13-25 (2007).

TAIZ, L., ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal, 4ª Edição, traduzido por Santarém, E.R.; Astarita, L.V.; Dillenburg, L.R.; Rosa, L.M.G.; de Oliveira, P.L. Porto Alegre, Artimed Editora. (2009).

VASCONSUELO, A.; BOLAND, R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. **Plant Science** 172, 861-875 (2007).

VERPOORTE, R.; MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite production in plants. **Current Opinion in Biotechnology** 13, 181-187 (2002).

YOU, C.S.; PARKER, R.S.; GOODMAN, K.J.; SWANSON, J.E.; CORSO, T.N. Evidence of cis-trans isomerization of 9-cis- β -carotene during absorption in humans. **American Journal of Clinical Nutrition** 64, 177-183 (1996).

WINK, M. Plant secondary metabolites-a primary resource: Biochemistry of plant secondary metabolism and functions of plant secondary metabolism and their exploitation in biotechnology. Sheffield Academic Press, CRC press, USA. (1999).