UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Perfis de amido, atividade amilolítica e proteínas em quatro variedades de milho (*Zea mays*), convencionais e geneticamente modificadas, durante as duas primeiras fases da germinação

NICOLE RAMIREZ ROJAS

Dissertação apresentada para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Flavio Finardi Filho

SÃO PAULO

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Perfis de amido, atividade amilolítica e proteínas em quatro variedades de milho (*Zea mays*), convencionais e geneticamente modificadas, durante as duas primeiras fases da germinação

NICOLE RAMIREZ ROJAS

VERSÃO ORIGINAL

Dissertação apresentada para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Flavio Finardi Filho

SÃO PAULO
2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Ramirez Rojas, Nicole
R173p Perfis de amido, atividade amilolítica e proteínas em quatro variedades de milho (*Zea mays*), convencionais e geneticamente modificadas, durante as duas primeiras fases da germinação / Nicole Ramirez Rojas. -- São Paulo, 2016.
75p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Finardi Filho, Flávio

1. Milho 2. Amido 3. Germinação 4. Enzimas amilolíticas I. T. II. Finardi Filho, Flávio, orientador.

641.3315 CDD

NICOLE RAMIREZ ROJAS

Perfis de amido, atividade amilolítica e proteínas em quatro variedades de milho (*Zea mays*), convencionais e geneticamente modificadas, durante as duas primeiras fases da germinação

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Flavio Finardi Filho
(Orientador-Presidente)

_____

1ºExaminador

_____

2ºExaminador

_____

3ºExaminador

São Paulo,_____de_____de 2016

DEDICO

Meu amado Deus, pelo dom da vida, a oportunidade de crescer em sabedoria e pela graça de alcançar mais uma vitória.

.

À minha familia que eu tanto amo, Osman, Rocio, Romer e Omar

Sem vocês nada faria sentido.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha existência. Obrigada, por mais essa etapa profissional e pessoal concluída.

Aos meus amados pais, Osman e Rocio, pelo apoio incondicional.

Ao Professor Flavio Finardi Filho, que me aceitou e possibilitou a realização de um sonho. Muito obrigada pelos conselhos, orientação, confiança, paciência, amizade e pelo exemplo profissional. O Senhor para mim é um profissional mais que completo e admirável. Quero lhe agradecer por tudo que me ajudo a concretizar.

Á Priscila, pela amizade, carinho, apoio e incentivo, pela grande ajuda profissional ao longo do curso, e pelos momentos agradáveis. Como esquecer os conselhos pessoais, com toda certeza foram muito uteis e vou levá-los para sempre, nunca terminarei de agradecer tudo o que você fez por mim.

Ao meu noivo Alex, pelo amor, carinho, amizade, apoio, incentivo e paciência ao longo deste período.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP-FCF) pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

Á CAPES pela bolsa de estudo concedida durante o curso.

Á empresa Syngenta, pela concessão das sementes.

Ao Professor Dr. Francisco André O. Tanaka pelo auxílio nas análises de microscopia de varredura.

Ao Professor Dr. Eduardo Purgatto por suas valiosas sugestões para melhoria desta pesquisa.

Aos funcionários de laboratório, Laila, Rosa, Tatiana, Aline, Lucia, obrigada pelo auxílio e incentivo na condução da fase experimental.

Aos secretários Edimilson, Roberta, Cleonice y Monica, obrigada pela competência e por sempre terem sido muito carinhosos e prestativos.

A Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do Mestrado junto ao curso de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO 18
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA 20
2.1 Milhos convencionais e GM 20
2.2 ESTRUTURA E USOS DO AMIDO 22
2.3 Enzimas Amilolíticas 26
2.3.1 Alfa amilases 27
2.3.2 beta-amilase 28
2.4 Degradação e mobilização de reservas das sementes 28
2.5 avaliação do potencial fisiológico de sementes 29
2.6 Germinação 30
3. OBJETIVOS 33
3.1 Objetivo geral 33
3.2 Objetivos específicos 33
4. MATERIAL E MÉTODOS 34
4.1 Sementes 34
4.2 Composição centesimal 34
4.2.1 Umidade 35
4.2.2 Cinzas 35
4.2.3 Lipídios 35
4.2.4 Proteínas 35
4.2.5 Carboidratos totais 35
4.3 Analises de micronutrientes 37
4.3.1 Ácidos Graxos 37
4.3.2 Minerais 38
4.4 Avaliação da qualidade das sementes 38
4.4.1 Porcentagem de Germinação 38
4.4.2 Testes de Vigor 38
4.5 Metodologia de coleta e processamento das amostras 38
4.6 Extração e ensaio de amilases totais 39
4.7 Determinação de atividade enzimática 39
4.8 Atividade de α-amilase e β-amilase. 40
4.9 Determinação de amido total 40
4.10 Isolamento de amido 40
4.11 Microscopia eletrônica de varredura 41
4.12 Extração de proteínas 41
4.13 Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) 42
4.14 Analise Estatística 42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 43
5.1 Composição Centesimal 43
5.2 Avaliação de potencial fisiológico das sementes 45

5.3 Atividade Amilolítica 47
5.4 α-Amilase 50
5.5 Beta amilase 52
5.6 Teores de amido 54
5.7 Amidos morfologia dos grânulos 56
5.8 Eletroforese SDS-PAGE 64
6. CONCLUSÕES 66
7. REFERÊNCIAS 67

Perfis de amido, atividade amilolítica e proteínas em quatro variedades de milho (*Zea mays*), convencionais e geneticamente modificadas, durante as duas primeiras fases da germinação.

RESUMO

A germinação do milho (*Zea mays* L.) é usada no processamento de alimentos pela ativação de enzimas endógenas em benefício das propriedades sensoriais, nutricionais e funcionais. Dados sobre alterações composicionais em sementes germinadas são escassas, sobretudo em sementes geneticamente modificadas. Neste estudo foram avaliadas quatro variedades de milho, duas geneticamente modificadas (G1 e G3) e suas genitoras convencionais (C1 e C3), durante as duas primeiras fases da germinação, enfocando a composição química, o desenvolvimento de atividades amilolíticas, as mudanças na concentração e morfologia do amido, e o perfil das proteínas remanescentes durante um período de 72h. As sementes germinaram rapidamente ocorrendo a primeira protrusão radicular às 12 h após a embebição, ao atingirem um teor de umidade de aproximadamente 20%. A atividade de □-amilase alterou-se após 24 h, seguida por acentuada elevação até o tempo 72h. A atividade □-amilásica foi detectada desde o início dos ensaios de germinação, caracterizada por incremento constante até 48h entre as sementes convencionais e até 72h entre as sementes modificadas. Os níveis de atividade amilolítica total permaneceram elevados no decorrer da germinação, com maior intensidade nas variedades GM, porém com os perfis das hidrólises semelhantes. A redução dos teores de amido foi observada após as 12h e 24h, indicando o início da mobilização de reservas de carboidratos. As alterações morfológicas no grânulo de amido nas diferentes etapas da germinação foram acompanhadas por microscopia eletrônica de varredura, com resultados semelhantes nas quatro variedades investigadas. Diferenças significativas foram observadas apenas nas composições químicas e nos perfis proteicos entre os dois grupos de sementes de milho (C1-G1 e C3-G3), indicando variação normal entre as variedades convencionais genitoras, sem comprometer a segurança dos milhos GM, nem tampouco o emprego em processos fermentativos. Ao contrário, as sementes de milho GM apresentaram mobilização mais rápida do amido nas primeiras duas fases da germinação.

Palavras chaves: Milho, Germinação, Amido, Enzimas Amilolíticas**,** Proteínas.

Starch, amylolytic activity and protein profiles from four maize (*Zea mays*) varieties, conventional and genetically modified, on the two initial germination steps

ABSTRACT

The maize (*Zea mays* L.) germination activates endogenous enzymes that is useful on food processing to develop sensorial, nutritional, and functional properties. Data about germinated seeds are scarce, especially in genetically modified seeds. In this study we evaluated four maize varieties, two genetically modified (G1 and G3) and their conventional parents (C1 and C3) during the first two steps of germination, focusing on the chemical composition, changes in the starch concentration and morphology, the development of amylolytic activity and the profile of the proteins remaining during a period of 72h. The seeds germinate quickly occurring the first roots protrusion at 12 hours after imbibition, to reach a moisture content of approximately 20%. The activity of α-amylase changed after 24 h, followed by marked elevation until 72 hours. The activity of β-amylase was detected since the beginning of the tests of germination, characterized by the constant increase until 48 hours by the conventional seeds up to 72h by the modified seeds. The levels of total amylolytic activity stay high in the course of germination, with a greater intensity in the GM varieties, however with the similar hydrolysis profiles. The reduction of the levels of starch was observed after 12h and 24h, indicating the beginning of the mobilization of the carbohydrate reserves. The morphological changes in the starch granules at the different stages of germination were observed by scanning electron microscopy, with similar results in the four varieties investigated. Significant differences were observed only in chemical compositions and in profiles the protein between the two groups of the corn seeds (C1-G1, and C3-G3), indicating normal variation between conventional varieties, without compromising the safety of the GM maize, or their employment in fermentative processes. In contrast, GM maize seeds showed faster mobilization of starch in the first two stages of germination.

Keywords: Corn, Germination , starch , amylolytic enzymes , proteins**.**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Moléculas de glicoses (A) Monômero de glicose (B) ligação glicosídica de dois monômeros de glicose

Figura 2: Estrutura da amilose (A) e amilopectina (B) em um granulo de amido

Figura 3: Curso do tempo de eventos associados a germinação e o crescimento subsequente pós-germinação

Figura 4: Amostras de milho convencionais (C1 e C3), com seus respectivos geneticamente modificados (G1 e G3). A coloração vermelha dos milhos se deve ao corante para identificação de sementes pela empresa fornecedor

Figura 5: Valores da capacidade de germinação (%) de cultivares de milho a 25°C de temperatura durante quatro e sete dias. (porcentagem de sementes germinadas)

Figura 6: Curvas de atividade amilolítica total durante a germinação de sementes de milho.

Figura 7: Curvas de atividade de α-amilase durante a germinação de sementes de milho.

Figura 8: Curvas de atividade de β-amilase durante a germinação de sementes de milho.

Figura 9: Teor relativo de amido nas sementes durante a germinação. Todos os valores são calculados com base em peso fresco de grãos pré-geminados. Os valores (%) são a média ± DP de três repetições.

Figura 10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV), imagens dos grânulos de amido nativo.

Figura 11: Microscopia eletrônica de varredura (MEV), imagens dos grânulos de amido nativo das cultivares C1, G1, C3 e G3 no tempo 0.

Fiura 12: Microscopia eletrônica de varredura (MEV), imagens dos grânulos de amido nativo e hidrolisado das cultivares C1, G1, C3 e G3 no tempo 12.

Figura 13: Microscopia eletrônica de varredura (MEV), imagens dos grânulos de amido nativo e hidrolisado das cultivares C1, G1, C3 e G3 no tempo 24.

Figura 14: Microscopia eletrônica de varredura (MEV), imagens dos grânulos de amido nativo e hidrolisado das cultivares C1, G1, C3 e G3 no tempo 48.

Figura 15: Microscopia eletrônica de varredura (MEV), imagens dos grânulos de amido nativo e hidrolisado das cultivares C1, G1, C3 e G3 no tempo 72.

Figura 16: Géis de poliacrilamida 12,5% das variedades de milho convencionais genitoras e GM, com amostras tomadas no início da germinação (0h) e após 3 dias (72h), com 25 µg de proteínas por raia. PM = padrões de peso molecular de 20 a 220 kDa. a. C1; b. G1; c. C3; d. G3

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção mundial de grãos por área e produtividade entre 1950 e 2010

Tabela 2: Teores de amilose dos amidos de algumas fontes botânicas.

Tabela 3: Dimensões de grânulos de amido de diferentes fontes vegetais

Tabela 4: Características dos milhos convencionais e geneticamente modificados

Tabela 5: Análise de composição centesimal de sementes de milho transgênicas com seus respectivos genitores convencionais

Tabela 6: Análise das frações de sementes de milho transgênicas com seus respectivos genitores convencionais.

Tabela 7: Análise de minerais de sementes de milho transgênicas com seus respectivos genitores convencionais.

Tabela 8: Análise de Atividade Enzimática Total de sementes de milho transgênicas com seus respectivos genitores convencionais.

Tabela 9: Análise de atividade de α-amilase de sementes de milho GM com seus respectivos genitores convencionais

Tabela 10: Análise de atividade de β-amilase de sementes de milho GM com seus respectivos genitores convencionais

Tabela 11: Porcentagem (%) de amido de sementes de milho transgênicas com seus respectivos genitores convencionais.

LISTA DE ABREVIATURAS

C1 = semente de milho Maximus (convencional)

G1 = semente de milho Maximus TLTG Viptera (GM)

C3 = semente de milho Impacto (convencional)

G3 = semente de milho Impacto TL (GM)

AR = Amido Resistente

C = Convencional

GM = Geneticamente modificado

Hae = Horas após a embebiçã

1 INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays* L.) em função do seu alto potencial de produção, composição química e valor nutricional, constitui um dos mais importantes cereais consumidos no mundo (OLIVEIRA et al., 2011), seguido pelo trigo e arroz. A produção global estimada para a safra 2014/15 alcançou 988 milhões de toneladas contra 723 mi Ton e 475 mi Ton, para o trigo e o arroz respectivamente, de acordo com o United States Department of Agriculture World Agricultural Supply and Demand Estimates (USDA, 2014/2015).

Sob a ótica nutricional, o milho é o cereal com maior poder energético em função das frações proteica, lipídica e de carboidratos, contribuindo com cerca de 9%, 5% e 74%, respectivamente, em relação à massa de grão inteiro, ou seja, cerca de 380 Kcal/100g de milho.

A importância econômica do cereal é evidenciada por suas diversas formas de utilização, desde a alimentação animal e humana, até a industrial, em alimentos e em processos químicos. O emprego de amidos vem crescendo e se aperfeiçoando nos últimos anos, levando à busca de produtos com características específicas que atendam às exigências dessas indústrias. A produção de amidos modificados é uma alternativa que vem sendo desenvolvida há algum tempo com o objetivo de superar uma ou mais limitações dos amidos nativos. Paralelamente, setores de produção de combustível e bebidas fermentadas empregam o milho como o principal componente, fonte de carboidratos para a fermentação alcoólica (CEREDA, M., 2001).

Além de sua importância agronômica, o milho tem sido um organismo modelo para a pesquisa básica por quase um século, em temas de investigações biológicas de longo alcance como a domesticação de plantas, a herança quantitativa, a fisiologia do desenvolvimento, a heterose, a resistência a pragas e, recentemente, a evolução do genoma, a epigenética, e a genômica comparativa (KOK et al., 2008).

O vegetal também foi símbolo da implantação das novas técnicas de cultivo preconizadas pela Revolução Verde, na qual o uso de defensivos agrícolas e emprego de sementes híbridas permitiram o vertiginoso aumento na produtividade de lavouras a partir da segunda metade do séc. XX (KHUSH G., 1999). Mas novas etapas dessa revolução chegaram com o desenvolvimento das técnicas de recombinação genética e, desde 2007, a primeira variedade de milho geneticamente modificado (GM) está liberada para cultivo no Brasil, permitindo mais uma opção ao agricultor (CTNBio, 2013).

Hoje, são 26 variedades resistentes a insetos e tolerantes a herbicidas (CTNBio, 2016), com diversas modificações em genes combinados, permitem um leque grande de escolha segundo as necessidades de plantio.

Por exemplo, a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, é uma das mais importantes pragas da cultura no Brasil podendo assim ocasionar sérios prejuízos a produção (Cruz, 1995). Além disso a resistência a inseticidas já foi relatada para diversos produtos (Diez-Rodriguez & Omoto, 2001); Young & Mc Milian, 1979; Yu, 1991. 1992) e estudos tem apontado sérios problemas para o controle dessa praga, principalmente em regiões do Brasil onde se cultiva o milho em duas safras por ano. A incidência de pragas tem acarretado aumento no custo de produção, devido às aplicações mais frequentes de inseticidas e, em consequência, maior destruição de inimigos naturais e maior impacto no meio ambiente.

O emprego de sementes de milhos geneticamente modificados, que expressam a enzima EPSPS de *Bacillus thuringiensis* e a enzima Fosfomanose Isomerase (PMI), é considerada uma tática adicional para o controle de insetos praga, com eficácia igual ou melhor que os inseticidas convencionais, além de ser compatível com os princípios do manejo integrado de pragas (Fischhoff, 1996; Paoletti & Pimentel, 2000), pois estas sementes reduzem a pressão de seleção pelo uso excessivo de inseticidas e possibilita um controle mais ecológico das pragas da cultura do milho.

Apesar dos benefícios oferecidos pela biotecnología com a utilização de plantas geneticamente modificadas, ainda persistem dúvidas sobre a segurança e eficiência dos processos de transformação dos organismos vivos através de manipulações genéticas, sobretudo nos países membros da União Européia (EFSA, 2015 e 2016). É interesse dos pesquisadores da área e dos órgãos de regulamentação nos diversos países produtores e consumidores de responder aos questionamentos sobre a segurança à saúde e ao ambiente dos organismos geneticamente modificados (OGM).

Devido à carência de dados específicos sobre a fisiologia vegetal, características enzimáticas e de amido em estudos comparativos entre milhos convencionais e geneticamente modificados, há necessidade de novas linhas de pesquisa que abordem aspectos tecnológicos, como em setores da indústria de alimentos, na qual o milho entra em diversos produtos, tanto como ingrediente principal, quanto como coadjuvante. Milhos GM com dois ou mais genes modificados introduzidos já são maioria entre os eventos liberados pela CTNBio citados acima e ainda são objeto de muita especulação sobre sua segurança e seus efeitos tecnológicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 MILHOS CONVENCIONAIS E GM

A cultura do milho está entre as mais importantes do agronegócio brasileiro, cultivada em diversas regiões do pais, tendo atingido aumentos significativos de produtividade nos últimos anos, principalmente pelo desenvolvimento e adoção de novas tecnologias (CALDARELLI; BACCHI, 2012). Dentre estas, se destaca o tratamento de sementes, que possui grande importância em relação ao manejo de pragas e doenças que afetam o ciclo normal da cultura.

O Século XX foi marcado por grandes descobertas que tiveram profundo impacto no melhoramento genético de plantas. Há muitos anos as plantas cultivadas vem sendo modificadas por técnicas clássicas de melhoramento genético, seleção de variedades e desenvolvimento de híbridos, tudo associado ao uso de defensivos químicos, permitiu um aumento de três vezes a produção mundial de grãos entre 1950 e 2000, ou seja de cerca de 600 milhões de toneladas para 1,8 bilhão de toneladas, contra um incremento de apenas 13% na área plantada e um rendimento de 170% superior (Tabela 1). Atualmente este melhoramento é realizado através de engenharia genética, mas ainda não é possível afirmar que os novos dados mundiais até 2010, apresentados na mesma tabela, sejam resultado do emprego extensivo de plantas GM.

Tabela 1. Produção mundial de grãos por área e produtividade entre 1950 e 2010

Ano	Produção	Área	Produtividade
	Milhões Tons	Milhões Hectares	Tons por Hectare
1950	631	587	1,07
1960	824	639	1,29
1970	1.079	663	1,63
1980	1.429	722	1,98
1990	1.769	693	2,55
2000	1.846	663	2,79
2010	2.201	680	3,24

Adaptado de Earth Policy Institute - USDA http://www.earth-policy.org/data_center/C24

A *International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications* (ISAAA), listou 11 países, nos quais as áreas cultivadas com plantas transgênicas ultrapassaram um milhão de hectares. No topo da lista encontram-se os EUA, com 73,1 milhões de hectares, seguido pelo Brasil (42,2), Argentina (24,4), Índia (11,6), Canadá (11,6) e China (3,9). Paraguai, África do Sul, Paquistão, Uruguai e Bolívia são os demais países arrolados (ISAAA, 2015).

Plantas geneticamente modificadas que expressam genes com atividades inseticida ou resistência a herbicidas representam uma alternativa para o controle de insetos, além de

serem consistentes com a filosofia do manejo integrado de pragas (MIP). Na atualidade diversas culturas, tais como algodão, batata, papaia e canola, foram modificadas geneticamente para expressar as proteínas de *Bacillus thuringiensis*.

As primeiras sementes de milho GM liberadas para plantio no país continham uma única modificação com a incorporação de gene de resistência ao ataque de insetos lepdópteros, que mais afetam essas lavouras. A cultivar recebeu o nome de evento Bt11 em função do organismo doador, *Bacillus thuringiensis*, do gene *cry* que formam cristais de uma proteína tóxica para os insetos. Esse mecanismo de ação era conhecido e utilizado por aspersão em plantações desde muito tempo antes de ser incorporado aos vegetais.

A cultivar de milho com o evento Bt11 contém o gene *cry1Ab* e o gene *pat*, derivado do microrganismo do solo *Streptomyces viridochromogenes*, utilizado apenas como marcador de seleção durante o processo de transformação. Dentre as estratégias de facilitar o cultivo, o evento GA21 contém o gene *mepsps* que expressa a enzima EPSPS – 5-enolpiruvil chiquimato sintase. Essa enzima sintetizada nas plantas transformadas é altamente tolerante à presença de herbicidas contendo glifosato, pois permite uma rota metabólica alternativa que não bloqueia a síntese de aminoácidos aromáticos.

O advento de milhos geneticamente modificados trouxe de início incertezas quanto às características fundamentais do cereal para os diversos usos, porém as alterações foram pontuais não afetando as principais vias metabólicas da planta, nem tampouco a composição química das sementes e as propriedades funcionais de seus derivados. Desse modo, ficou comprovada a inocuidade da transformação através da análise composicional evidenciando haver Equivalência Substancial entre as novas variedades de plantas GM e seus homólogos convencionais.

O exame pormenorizado dessas avaliações tem demonstrado que podem ocorrer pequenas diferenças nas frações dos principais nutrientes, porém dentro dos limites de variabilidade para cada espécie, diferenças esta que já constam de tabelas de composição de alimentos, sendo portanto consideradas como valores normais, pois idênticas oscilações também ocorrem entre variedades convencionais (ILSI 2009). Num estudo que foi realizado em 12 habitats por um período de 10 anos com quatro culturas transgênicas (batata, milho, beterraba e colza) demonstrou-se que estas culturas não foram mais agressivas ou mais persistentes comparadas com as variedades convencionais (CRAWLEY ET AL, 2001).

Além das análises químicas dos principais componentes do milho, existem vários métodos disponíveis para a comparação qualitativa e quantitativa de proteínas das plantas, que permitem a comprovação mais apurada da inocuidade das transformações genéticas.

Entre as técnicas disponíveis para a avaliação da expressão proteica, a eletroforese bidimensional em gel (2D) combinada com espectrometria de massa (MS), é um dos métodos mais amplamente utilizados para poder identificar eventuais alterações que pudessem comprometer alguma via metabólica do milho (RUEBELT, ET. AL 2006).

No Brasil, a liberação comercial de cultivares de plantas geneticamente modificadas depende da aprovação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e do Conselho Nacional de Biossegurança (CNBs). Para tanto, a segurança e inocuidade alimentar devem ser garantidas através de estudos comparativos documentados nos processos de liberação comercial sendo a Equivalência Substancial considerada uma importante ferramenta para essa comprovação.

Em trabalhos anteriores em nosso laboratório foram comprovadas pequenas alterações nos perfis proteicos de variedades GM de soja em relação às genitoras convencionais (CASTRO, 2009; BAKES, 2011). A conclusão dos dois trabalhos aponta como principal fator de variabilidade, tanto na composição química como na expressão de proteínas, para as condições de cultivo, região geográfica e manejo da lavoura.

2.2 ESTRUTURA E USOS DO AMIDO

As plantas armazenam e mobilizam o amido em situações distintas dependendo das demandas fisiológicas e das características do tecido vegetal. Em folhas o armazenamento ocorre durante a luz do dia e é hidrolisado à noite para o fornecimento de energia da planta. As maiores reservas, no entanto, ocorrem em semente, raízes e tubérculos para posterior mobilização nas fases de germinação e crescimento do vegetal.

O amido é um carboidrato encontrado em abundância na natureza, que se apresenta na forma de grânulos, com formato e tamanho dependentes da sua fonte botânica. Devido às suas propriedades físico-químicas e funcionais exclusivas, este carboidrato desempenha importante papel em diversos setores industriais e na culinária doméstica. Na indústria alimentícia é utilizado como ingrediente de vários produtos e como veículo de aditivos. Entre outras funções, o amido de milho serve como espessante, agente de textura, de dispersão de demais ingredientes e de estabilizante de emulsões (FRANCO et al., 2001).

O amido pode sofrer modificações químicas ou enzimáticas intencionais para atender às diversas aplicações por meio de métodos de baixo custo, tornando-o ideal para diversos usos, tal como na indústria de alimentos para aplicação em congelados, molho de tomate, molho de salada, malte, entre outros (SATIN, 2006). É um polímero versátil e útil, não somente pelo baixo custo de extração e de ser uma matéria-prima natural e abundante, bem

como devido a suas propriedades físico-químicas, que podem ser alteradas via tratamento químico, físico e/ou enzimático (JOBLING, 2004).

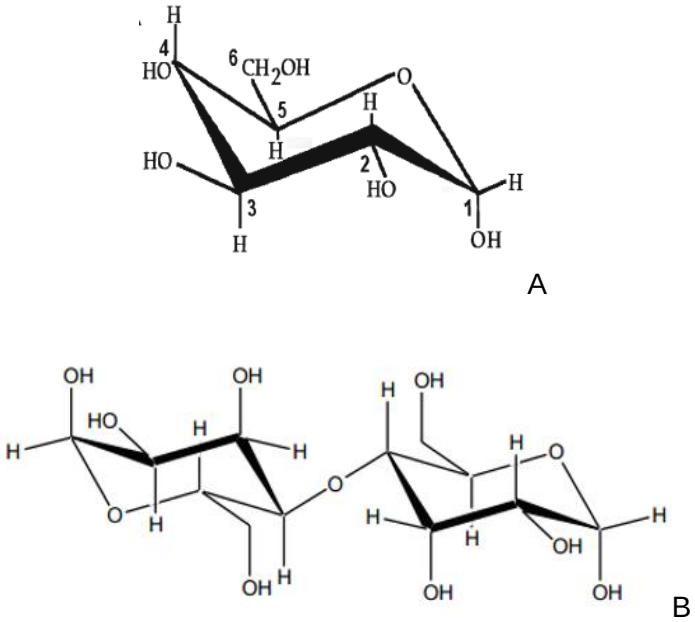


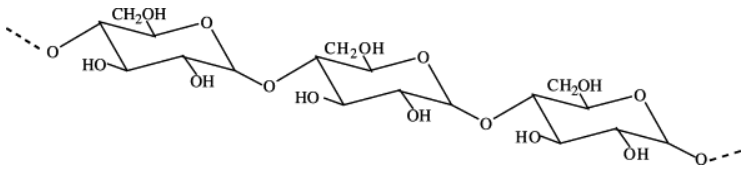
Figura 1. Moléculas de glicoses: (A) Monômero de glicose (B) ligação glicosídica de dois monômeros de glicose (adaptado de DONALD, 2004).

Sua estrutura é formada por biopolímeros de glicose que estão interligados através de uma molécula de oxigênio, são as chamadas ligações glicosídicas (Figura 1), facilmente quebradas em meios pouco ácidos. Nessa estrutura polimérica existe um grupo aldeído de caráter redutor no final da cadeia, mas por ser longa torna-se uma molécula francamente redutora (VAN DER MAAREL et al, 2002).

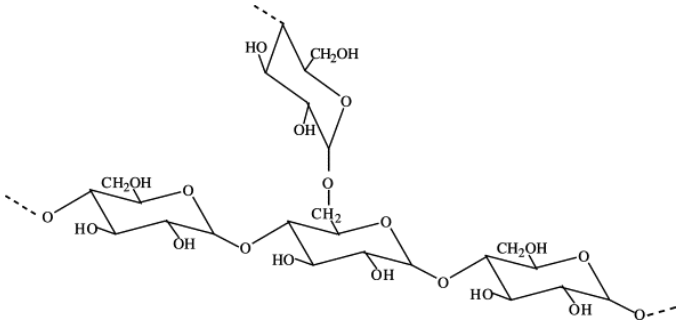
À medida que a planta sintetiza as moléculas dos polímeros, estes se depositam em camadas ao redor de um ponto central, para formar um grânulo homogéneo. Os grânulos são considerados partículas semi-cristalinas insolúveis em água. Além da amilose e amilopectina, outros componentes como proteínas e lipídeos podem ser encontrados na superfície granular. A presença de lipídeos faz com que haja uma diminuição na capacidade do amido se ligar com água e também diminui a solubilidade do grânulo (CEREDA, 2002).

Estruturalmente o amido é um polissacarídeo constituído essencialmente por resíduos de α-D-glicose e uma pequena parcela de lipídeos. Os dois maiores componentes do amido são amilose e amilopectina (Figura 2), que diferem no tamanho molecular e grau de ramificação. As proporções em que estas estruturas aparecem diferem em relação às fontes botânicas, variedades e grau de maturação da mesma espécie e/ou planta

(ELIASON, 2004; TESTER, 2004). A amilose é um polissacarídeo formado por unidades de glicoses ligadas entre si por ligações do tipo α-1,4, enquanto a amilopectina, além das ligações glicosídicas do tipo α-1,4, possui ramificações por meio de ligações α-1,6. A funcionalidade do amido, assim como a organização física da estrutura granular, é atribuída aos dois polímeros.



(A)



(B)

Figura 2 Estrutura da amilose (A) e amilopectina (B) em um granulo de amido. (adaptado de MURALIKRISHNA*, et al.,* 2005)

Em geral, os amidos apresentam de 25 a 30% de amilose, enquanto o teor de amilopectina varia entre 75% do amido total em sementes de cultivares de milho comum e 99% do amido em sementes de milho ceroso, também denominado waxy (MEDCALF, 1973; SISVAK & PREISS, 1994; ZAMSKI, 1995).

A razão entre amilose e amilopectina presente em uma estrutura amilásica pode variar com a fonte de amido, mas em geral, a proporção entre ambas é de 1:3 a 1:4. Este dado confirma a proporção em uma raiz de mandioca cujas cadeias de amilose correspondem a 15-30% do amido da raiz (HOOVER, 2001; SRIBURI e col., 1999). A hipótese mais aceita para a estrutura da amilopectina é o modelo de Clusters. Este propõe uma cadeia principal denominada C responsável por carregar o grupo redutor da molécula e inúmeras ramificações, cadeias dos tipos A e B. As cadeias do tipo A se ligam às cadeias B por ligações α-1,6, incluindo a cadeia C. A relação entre *essas* cadeias é chamada de grau de ramificação (HOOVER, 2001). A Tabela 1 mostra o teor de amilose de algumas fontes botânicas, verificadas por diversos autores relatados por Takizawa et al. (2004).

Tabela 2: Teores de amilose dos amidos de algumas fontes botânicas.

Fonte	Amilose(%)
Batata	25,4[1]
Batata-doce	19,1[1]
Mandioquinha-salsa	23,0[2]
Milho	24,5[3]
Milho ceroso	1,1[3]
Mandioca	18,1[1]

Fonte: Takizawa et al., 2004 – Hoover (2001); Leonel e Cereda (2002); Zheng e Sosulki (1998).

A amilose é uma cadeia estritamente linear formada por unidades de D-glicose unidas entre si por ligações glicosídicas (Figura 2) α-1,4 com grau de polimerização na faixa de 500 a 6000 unidades de glicose, apresentando poucas ligações α-1,6 nos pontos de ramificação (HOOVER, 2001; JACOBS e DELCOUR, 1998; TESTER 1997; FRENCH, 1973, 1984). Buléon et al. (1998) observaram que nos grânulos de amido existem algumas moléculas de amilose estritamente lineares e outras ramificadas. As ramificadas estão separadas por grandes distâncias permitindo às moléculas agirem como se fossem essencialmente lineares, não alterando significativamente o comportamento das cadeias.

O tamanho dos grânulos está relacionado a algumas propriedades físico-químicas e funcionais do amido, tais como a temperatura e a entalpia de gelatinização, as características de colagem, a susceptibilidade enzimática, a cristalinidade dos grânulos, o intumescimento e a solubilidade (PÉREZ et al., 2005). Existe uma correlação direta entre o teor de amilose com algumas características morfológicas. Quanto maior for o teor de amilose, maior o número de filamentos que se encontra nos grânulos de amido de milho. A forma dos grânulos de amido segundo a fonte botânica pode variar entre esférica, oval, poligonal, lenticular, alongados, reniforme, etc. e com diâmetro de submicrons a 100 μm (Tabela 3).

Tabela 3. Dimensões de grânulos de amido de diferentes fontes vegetais

Origem	Dimensões (µm)
Pequenos grânulos de trigo	2–3
Grandes grânulos de trigo	22–36
Amido de batata	15–75
Amido de cana-de-açúcar	até 100
Amido de milho	5–20
Amido de arroz	3–8
Amido de legumes	10–45

(Adatado de SERGE PEREZ & ERIC BERTOFT, 2010)

Como ingrediente alimentar funcional, o amido resistente (AR) tem demonstrado efeito equivalente ou superior à fibra convencional para a saúde humana. Ao contrário de alguns carboidratos e amidos digeríveis, o AR não é hidrolisado por enzimas no trato gastrointestinal superior, o que resulta na absorção de pouquíssima glicose. O amido resistente é uma fonte de fibra reconhecida recentemente pelos seus diversos efeitos benéficos a saúde. Como fonte de fibra funcional tem sido relacionado à redução da glicemia pós-prandial e respostas insulinêmicas, uma vez que possuem funções fisiológicas semelhantes aos da fibra dietética, sendo benéfico no tratamento de pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 2. (MONTEIRO et al., 2013)

2.3 ENZIMAS AMILOLÍTICAS

Enzimas são proteínas simples ou conjugadas que catalisam reações químicas, que de outra maneira, ocorreriam apenas em velocidades extremamente baixas. Com base no local de ação elas são consideradas de dois tipos: enzimas endógenas ou intracelulares e enzimas exógenas ou extracelulares (GUZMAN-MALDONADO e PAREDES-LOPEZ, 1995).

De acordo com LEADLAY (1993), as enzimas já eram utilizadas diariamente na indústria para acompanhar reações químicas fora da célula, muito antes de se entender a sua natureza e função. O uso do malte da cevada para conversão do amido em açúcares fermentescíveis e o uso similar de preparações fúngicas brutas em países orientais são exemplos de alguns usos antigos de enzimas.

Desde o início do século passado, o estudo da viabilidade de aplicação das enzimas em processos biotecnológicos tem tido um grande destaque mundial. Dentre estas, as

enzimas amiloliticas estão entre as mais importantes. O uso fundamental das amilases é na hidrólise do amido, principalmente na indústria de panificação, no emprego de cereais na produção de álcool e bebidas alcoólica, na produção de biocombustível, na fabricação de xaropes de glicose, via hidrólise enzimática, no preparo de gomas de dextrinas, usadas para acabamento de papéis e tecidos, dentre outros (GODFREY; WEST, 1996; EVANS; HIASMAN, 1997; LII, ET AL, 1996).

2.3.1 ALFA AMILASES

As α-amilases estão entre as primeiras enzimas conhecidas. Estas promovem a hidrólise do amido a açúcares redutores, sendo detectadas há mais de um século em grande variedade de materiais biológicos. Essas enzimas foram descritas em 1811 nos extratos de trigo; em 1831 na saliva; em 1833 no malte; em 1846 no sangue; e em 1881 produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* (HARGUER, 1982).

As enzimas α-amilase (EC 3.3.1.1; α-1,4 glicano, 4-glicano-hidroxilase) e β-amilase (EC 3.2.1.1, α-1,4, glicanomaltohidrolase) são muito utilizadas na produção de álcool e bebidas alcoólicas, principalmente as cervejarias, em indústrias têxteis e no processamento de farinhas. Normalmente, elas são obtidas de malte da cevada, embora qualquer cereal germinado às contenha, ou de microrganismos; suas temperaturas ótimas de ação variam entre 55°C e 75°C e os pHs ótimos situam-se entre 4,8 e 6,5, dependendo da sua origem (FORGATY & KELLY, 1979).

As enzimas amilolíticas são vantajosas devido à capacidade de catalisar reações contínuas sob condições moderadas, o que nem sempre é possível utilizando processos químicos, por apresentarem hidrólises não específicas e formação de produtos não desejados (GUPTA, R., ET AL, 2003). Entre as inúmeras aplicações das enzimas amilolíticas, vale destaque a hidrólise parcial ou total do amido para emprego em diversos fins. Na indústria de alimentos, o uso de enzimas amilolíticas permite a obtenção de amidos em diversos graus de hidrólise e consequente solubilização em temperaturas mais amenas, ou na produção de xaropes com elevado teor de glicose, na melhoria dos produtos de panificação e na indústria cervejeira como adjunto.

A mobilização do grânulo de amido envolve a conversão da matriz semicristalina insolúvel em açúcares solúveis, que podem ser substratos para o metabolismo intermediário. As amilases atuam nas ligações α-1,4 da amilose, formando dextrinas e unidades de glicose, após a sua ação enzimática (BECK & ZIEGLER, 1989). As β-amilases são exoenzimas que agem nas ligações α-1,4 glicosídicas, atuando apenas na penúltima

ligação da extremidade não redutora do substrato. Esta enzima vem sendo apontada, recentemente, como enzima chave na hidrólise do amido transitório (SMITH et al., 2005)

2.3.2 BETA-AMILASE

As β-amilases (α-1,4-D-glucan maltohidrolase, EC. 3.2.1.2.) hidrolizam ligações glicosidicas α-1,4 do amido a partir da extremidade não redutora do polissacarídeo, e liberam maltose e maltotriose com inversão do carbono anomérico, de α para β. Essa mudança conformacional é a razão pela qual a enzima recebe denominação de β-amilase (KOHNO ET AL., 1989).

As β-amilases foram identificas não apenas em plantas como batata-doce, cevada, milho, trigo, soja e lentilhas, mas também em culturas de bacterias. Todas são exoamilases que atacam as ligações glicosidicas, começando na extremidade não redutora, removendo unidades de maltose até toda a cadeia ser convertida em maltose, ou até que a enzima seja inativada pela ação de agente físico ou químico.

Em alguns vegetais, a β-amilase está sempre relacionada à degradação do amido de reserva, podendo representar uma proteína de reserva. Em alfafa, a β-amilase, age para fornecer nitrogênio aos aminoácidos necessários ao rebrotamento, sendo que na desfolha diminui a atividade da nitrogenase, assim como a absorção do nitrogênio do solo (GANA et al., 1998).

O pH ótimo para atividade de β-amilases se encontra, geralmente, entre 4 a 6, apresentando estabilidade na faixa de pH entre 4 e 9 a 20°C, durante um período de 24 horas. Em pHs mais ácidos, as β-amilases provenientes de grãos, como a soja e a ervilha, apresentam maior estabilidade, quando comparadas com enzimas provenientes de outras fontes, como o trigo e a cevada (MURALIKRISHNA & NIRMALA, 2005).

2.4 DEGRADAÇÃO E MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS DAS SEMENTES

A mobilização das reservas das sementes ocorre após o intumescimento, no entanto, a degradação dessas reservas se inicia nas primeiras horas de embebição das sementes não dormentes (NONOGAKI, 2010). Durante a degradação das reservas insolúveis de alto peso molecular, ocorre a conversão das formas solúveis, que são rapidamente transportadas aos tecidos em crescimento e utilizadas para diferentes propósitos, tais como a geração de energia e a produção de outros compostos orgânicos, como proteínas, ácido nucleicos, carboidratos e lipídeos, para a construção de novos tecidos e células (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1985). As modificações metabólicas que ocorrem nesses estágios são resultado da atividade de várias enzimas de hidrólise e de transferência (BEWLEY & BLACK, 1985).

Segundo Mayer & Poljakoff-Mayber (1985), as enzimas de degradação de reservas podem ou não estar presentes nas sementes quiescentes. As enzimas pré-existentes são detectadas em baixa atividade nessas sementes que, durante a embebição da semente, são ativadas e secretadas para as células onde ocorrerá a mobilização das reservas. Por outro lado, ainda durante a embebição, é induzida a síntese *de novo* a partir dos aminoácidos disponíveis de enzimas que não são detectadas nas sementes quiescentes (VARNER et al., 1965).

As substâncias de reserva de sementes são carboidratos, lipídeos, proteínas, ácidos nucléicos, compostos contendo fósforo (fitatos) e minerais (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1985). Considerando-se o principal composto armazenado, as sementes podem ser divididas entre aquelas ricas em carboidratos, as ricas em lipídios e as ricas em proteínas (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000). Em sementes de cereais, as principais substâncias de reserva são os carboidratos, chegando a até 70 % do total da semente, seguidos pelas proteínas que constituem 8 a 15% das sementes (ZAMSKI, 1995). As sementes de milho possuem em média 83% da matéria seca constituída por carboidratos, entre eles, amido, frutosanas e polissacarídeos da parede celular e monossacarídeos (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000; BUCKERIDGE et al., 2000). O amido é o principal carboidrato de reserva de cereais, constituindo aproximadamente 72% da semente de milho e 88% de seu endosperma (MEDCALF, 1973).

2.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES

O potencial fisiológico das sementes é avaliado rotineiramente pelo teste padrão de germinação. Os resultados desse teste apresentam alto grau de confiabilidade para analistas e para produtores de sementes, sob os aspectos de reprodutibilidade dos resultados e como parâmetro para a fiscalização do comércio. No entanto, o mesmo pode não ocorrer quando se trata da utilização de lotes para a semeadura em campo ou durante o armazenamento. À medida que as condições ambientais se desviam das mais adequadas para o estabelecimento das plântulas ou para o armazenamento das sementes, é provável que a percentagem de emergência de plântulas seja inferior à da germinação determinada em laboratório. Diante disso surgiram os testes de vigor, como forma de complementação as informações obtidas no teste de germinação (ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS – AOSA, 1983).

Varias foram as tentativas iniciais para a conceituação de vigor de sementes. Dentre elas, se destacam as estabelecidas pela Association of Official Seed Analysts - AOSA, 1979, e pela International Seed Testing Association - ISTA, em 1977, onde a ideia central de

ambas indica que o vigor compreende: um conjunto de características da semente que determinam o rápido desenvolvimento e o potencial para a emergência e de plântulas normais, sob ampla diversidade de condições de ambiente (MARCO FILHO, 2001); mais recentemente, foi acrescentada a expressão em lotes com "poder germinativo comercialmente aceitável" (TEKRONY, 2003), pois lotes com baixo poder germinativo são naturalmente pouco vigorosos. Assim, a estimativa do comportamento das sementes pode ser mais eficiente quando as informações sobre o vigor são obtidas pela combinação de testes que avaliam diferentes aspectos, pois é muito difícil que apenas um teste indique, com precisão, o potencial de desempenho das sementes expostas a várias situações (TEKRONY, 2003; MARCOS FILHO, 2005).

Testes que são realizados em laboratório apresentam vantagens importantes, devido a serem econômicos, rápidos, não requererem de muito material ou equipamentos especiais e de treinamento tecnológico adicional. Dentre esses testes de fácil execução, encontramos próprio teste de germinação e de vigor de acordo com a AOSA (1983). O teste de vigor, ou teste de primeira contagem de germinação, avalia indiretamente a velocidade de germinação; este processo baseia-se no principio de que lotes que apresentam maior velocidade de germinação são mais vigorosos (NAKAGAWA, 1999). Um levantamento realizado no Brasil, Vieira, Bittencourt e Panobianco (2003), constataram que algumas instituições oficiais com laboratórios utilizam este teste para avaliar o vigor de sementes de cenoura e de pepino. Com relação a milho, não foram encontradas na literatura dados sobre a utilização desse teste. Com o mesmo principio, o teste de vigor também é classificado como um teste fisiológico. Resultados satisfatórios com o uso desse teste foram obtidos para avaliação do vigor de sementes de milho (ANDREOLI et al 2002) .

Para sementes de outras espécies, existem algumas pesquisas que relatam a utilização do teste de emissão da raiz primária como um teste de vigor. Em sementes peliculizadas de tomate, a avaliação da precocidade de emissão da raiz primaria após 56, 72 e 96h, mostrou-se promissora para separação dos lotes quanto ao vigor (MARTINELLI-SENEME et al., 2004), porém MARTINS et al. (2006) utilizando a mesma espécie obtiveram resultados inconsistentes para esse teste. Mas para sementes de brócolis, o teste de emissão da raiz primária (56h após semeadura) foi o mais sensível na diferenciação do vigor dos lotes estudados, apresentando maior eficiência que a emergência de plântulas em substratos (MARTINS et al, 2002).

2.6 GERMINAÇÃO

O milho (*Zea mays*) é composto por um mono cotilédone e sua semente está dividida em camada protetora (casca), aleurona, endosperma e o embrião. Este último é composto

pelo cotilédone, o epicótilo, de onde se origina o broto, e a radícula. A energia para a germinação da semente vem da respiração e do açúcar do endosperma. Contudo, o embrião e o amido estão separados um do outro, ou seja, para que a semente germine deve haver ação de forças externas para ativar suas funções fisiológicas. Naturalmente, há uma pequena atividade biológica nas sementes, devido à presença das enzimas β-amilase que degrada o amido para produzir a maltose e fornecer energia para manter a atividade biológica nas células da semente.

A germinação começa pela absorção de água; ativando o ácido giberélico, um hormônio vegetal produzido no interior do embrião, transportado com a água pelo restante dos tecidos da semente, até chegar à camada de aleurona (BORZANI et al., 1986; SANTANA, 2003). As reservas predominantes no endosperma, amido, parede celular e proteínas de armazenamento são mobilizados pela ação de enzimas hidrolíticas que são ativadas ou sintetizadas na camada de aleurona e no escutelo, e daí são segregadas para o endosperma amiláceo no grão de milho (SHAEK, 2014). Enzimas hidrolíticas são ativadas para quebrar as reservas de amido de sementes também para serem utilizadas na nutrição ou no crescimento da planta.

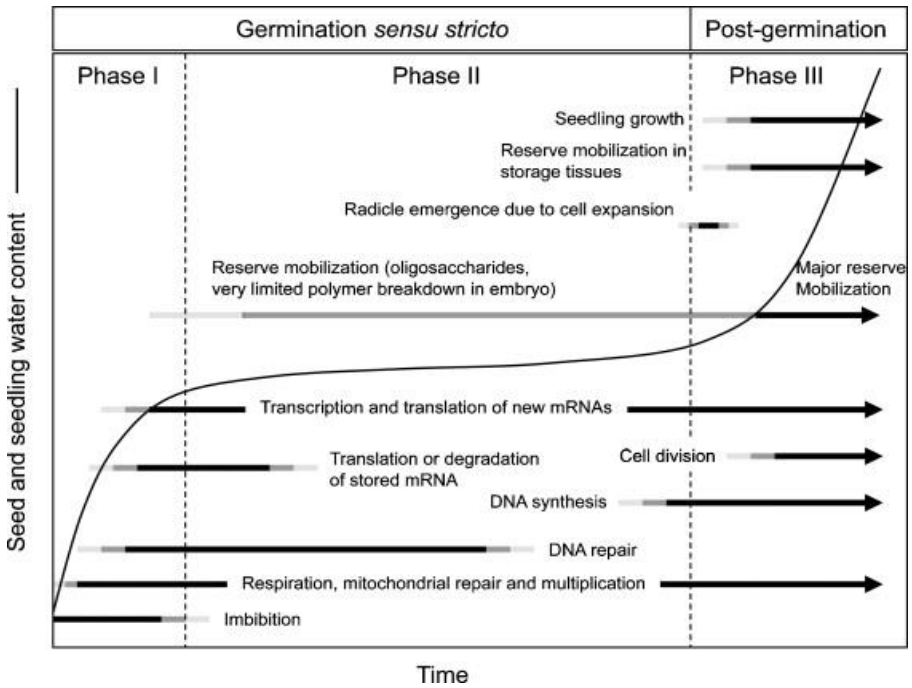


Figura 3. Curso do tempo de eventos associados a germinação e o crescimento subsequente pós germinação. O tempo para a ocorrência dos eventos varia de poucas horas a diversas semanas, dependendo da espécie da planta e das condições de germinação (NONOGAKI, 2010)

Durante a germinação do milho, são incorporados eventos que começam com a absorção de água pela semente seca, em três fases distintas: com uma rápida absorção

inicial (fase I), seguida por uma fase plana (fase II) e pelo aumento na absorção de água (fase III) (Figura 4). A fase II é o sinal visível que a germinação está completa com a emergência da radícula a partir do embrião. Já a fase III, com novo aumento na absorção de água, ocorre apenas após a conclusão da germinação, com os eixos embrionários alongados (NONOGAKI, 2010).

Enquanto a germinação termina com a protrusão da raiz, o crescimento do eixo embrionário é referido como o estabelecimento das plântulas. Em maltagem, é comum chamar todo o processo, incluindo o crescimento precoce como "germinação", e o termo é usado neste sentido ao longo deste trabalho.

O aumento das atividades enzimáticas durante a germinação não é apenas um pré-requisito para os processos fermentativos, também pode ter função em outras aplicações alimentares. As enzimas endógenas das sementes germinadas podem ser usadas, por exemplo para melhorar a qualidade tecnológica de trigo (MÄKINEN, 2012) e para aumentar a biodisponibilidade de minerais em alimentos à base de cereais.

Impulsionado por sua importância econômica, a mobilização dos composto de armazenamento de cevada e trigo foi bem estudada nas últimas décadas. Em contraste, o metabolismo relacionado a mobilização de reservas pouco conhecida no endosperma das sementes de milho. Em tais sementes, o endosperma é a fonte de carboidratos única para emergência dos eixos embrionários durante os estágios iniciais do desenvolvimento (FINCHER, 1989).

Neste trabalho, o desenvolvimento de atividades amilolíticas e alterações posteriores, no perfil de açúcar e teor de amido, foram estudados para mostrar a mobilização de reservas de amido de sementes de milho.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar e comparar as atividades de enzimas amilolíticas de cultivares de milhos convencionais e geneticamente modificados durante as duas primeiras fases da germinação, como também o amido inicial e hidrolisado durante esse período.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar e identificar as enzimas amilolíticas do milho presentes, bem como determinar suas atividades ao longo da germinação;
- Quantificar o amido remanescente durante as duas primeiras fases da germinação;
- Extrair proteínas e identificar alterações ocorridas no perfil eletroforético;
- Isolar o amido hidrolisado e observar a morfologia e a integridade dos grânulos remanescentes por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SEMENTES

Foram utilizadas sementes de milho das cultivares Impacto e Maximus convencionais, que são híbridos simples, e de seus respetivos transgênicos Impacto TL TG e Maximus TL TG VIP, peneira 20, doadas pela empresa Syngenta Seeds Ltda., localizada em Uberlândia/MG. A escolha desses cultivares se prendeu aos diferentes genes introduzidos nesses cultivares, como especificado a seguir.

O milho Impacto TLTG foi desenvolvido por cruzamento do evento BT11 contendo o *gene cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis*, que confere resistência a certos insetos lepidópteros e evento GA21 que expressa a enzima EPSPS. A cultivar Maximus TL TG VIP é um evento combinado, também denominado evento piramidado, resistente a insetos e tolerante a dois herbicidas obtido por cruzamento entre as linhas parentais BT11, MIR162 e GA21. A resistência a insetos da ordem lepidóptera e a tolerância ao herbicida glifosato e ao glufosinato de amônio (Tabela 4)

Os grãos produzidos por estes tipos de sementes se destinam à alimentação humana e animal, sem distinção de preferência ou restrição para qualquer uso industrial. Tais amostras são certificadas na origem para evitar a presença de sementes de outra procedência e foram tratadas com defensivos agrícolas e tingidas para distingui-las dos grãos normais (Figura 4). As identificações e características das amostras de milhos GM e suas convencionais genitoras estão descritas na Tabela 4. As amostras de sementes de milho foram armazenadas a 4 °C até a sua utilização.

Vale mencionar que os ensaios preliminares deste trabalho foram realizados com dois pares milho, sendo que um deles deixou de ser produzido, razão pela qual as codificações de laboratório passaram a ser C1, G1 e C3, G3.

4.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

As amostras de milho foram analisadas no tempo zero em triplicata para as determinações de: umidade, cinzas, lipídeos, proteínas, carboidratos totais de acordo com o método descrito pela Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1995) e do Instituto Adolfo Lutz (2005a). Todas as amostras destinadas à composição química foram trituradas em moinho de facas até obter a granulometria de 0,500 µm.

4.2.1 UMIDADE

As medidas foram dessecadas em estufa a 105ºC, até a obtenção do peso constante da amostra. A umidade foi calculada por gravimetria através da diferença entre os pesos inicial e final das amostras (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005a).

4.2.2 CINZAS

As determinações de resíduo mineral seco foram realizadas pelo método gravimétrico, após calcinação em forno mufla a 540 ºC (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005b).

4.2.3 LIPÍDIOS

A extração lipídica do milho foi obtida por circulação continua de éter etílico em aparelho do tipo Soxhlet, durante o mínimo de 5 horas. (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005c)

4.2.4 PROTEÍNAS

A concentração proteica das amostras foi determinada indiretamente por análise de nitrogênio total pelo método de micro-Kjeldahl, empregando-se o fator 6,25 para estimar a quantidade bruta de proteínas (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1995).

4.2.5 CARBOIDRATOS TOTAIS

Os teores de carboidratos totais foram obtidos por diferença para atingir 100% a partir da somatória das demais frações analisadas: proteínas, extrato etéreo, resíduo mineral seco, e umidade (SNIFFEN et al., 1992).

Tabela 4 - Características dos milhos convencionais e geneticamente modificados

Nome comercial*	Eventos	Linhagem	Resistência	Textura do grão	Cor do grão	Ciclo	Altura Planta (m)	Região de adaptação	Código Empregado
Maximus	-	Convencional (híbrido simples)	-	Duro	Alaran-jado	Precoce	2,47	SUL, SE e CO	C1
Maximus TLTG Viptera	Bt 11 x MIR 162 x GA 21	-	Resistência a insetos e tolerância ao glifosato e glufosinato	Duro	Alaran-jado	Precoce	2,46	SUL, SE, CO e BA, MA, PI	G1
Impacto	-	Convencional (híbrido simples)	-	Duro	Alaran-jado	Precoce	2,46	SUL, SE e CO	C3
Impacto TL TG	Bt11 x GA21	-	Resistência a insetos e tolerância ao glifosato	Duro	Amarelo Alaran-jado	Precoce	2,46	SUL, SE e CO	G3

* Todas as amostras foram fornecidas pela Syngenta Seeds

Fonte - http://www.ctnbio.gov.br; http://extranet.agricultura.gov.br/

Figura 4 - Amostras de milho convencionais (C1 e C3), com seus respectivos geneticamente modificados (G1 e G3). A coloração vermelha dos milhos se deve ao corante para identificação de sementes pela empresa fornecedora.

4.3 ANALISES DE MICRONUTRIENTES

4.3.1 ÁCIDOS GRAXOS

Para a quantificação dos ácidos graxos, frações dos extratos etéreos das amostras foram inicialmente submetidas à hidrolise ácida, como descrito no método 996.06 (AOAC, 2002), com algumas modificações introduzidas pelo Laboratório de Lipídeos do FBA (BORGES et al., 2011). Em um tubo de ensaio, as amostras de milho moídas e previamente homogeneizadas, contendo 50-100 mg de lipídeos totais, foram adicionadas de 50 mg de ácido pirogálico e 1 mL do padrão interno ácido tridecanóico (C13:0, 5 mg/mL), 2 mL de etanol e 5 mL de ácido clorídrico 8,3 M. Este tubo foi aquecido a 70-80 ºC em banho com agitação horizontal por 40 min.

Após atingir temperatura ambiente, 12 mL de éteres etílico e de petróleo foram adicionados, e em seguida, os tubos foram centrifugados, sendo a fase superior transferida para um segundo tubo e, a seguir, evaporada em banho termostatizado (< 40 ºC) sob fluxo de gás N_2. A este resíduo, contendo a gordura extraída, foi adicionado 1 mL do reagente trifluoreto de boro (7 %, em metanol) e 0,5 mL de tolueno e o tubo foi aquecido a 100 ºC por 45 min.

Mais uma vez, após atingir a temperatura ambiente, foi adicionado 2,5 mL de água destilada, 1 mL de hexano e 0,5 g de sulfato de sódio anidro. A fase superior foi cuidadosamente coletada e transferida para o frasco do auto-injetor, acoplado ao cromatógrafo gasoso Shimadzu modelo Plus GC 2012 (Quioto, Japão), sendo utilizadas as seguintes condições cromatográficas: coluna cromatográfica de sílica fundida SP-2560 (biscianopropil polisiloxana) de 100 m e 0,25 mm de diâmetro interno; programação de temperatura da coluna: isotérmico a 140 ºC por 5 min e aquecimento a 4 ºC por minuto até 240 ºC, permanecendo nesta temperatura por 30 min; temperatura do vaporizador a 250 ºC e do detector a 260 ºC; gás de arraste: Hélio (1 ml/min.) e razão de divisão da amostra a 1/50.

A quantificação dos diferentes ácidos graxos foi realizada por comparação entre os tempos de retenção das amostras e do padrão de referência, ácido erúcico (Oleo de colza), comercializado como *rapeseed* 07756-1AMP Supelco Chemical Co. St. Luis (Missouri, Estados Unidos), e do padrão interno. Os resultados foram expressos em g/100g de óleo.

4.3.2 MINERAIS

As concentrações de Ca, Mg, Cu, Fe e Zn foram determinados por espectrofotometria de absorção atómica utilizando uma lâmpada oco cátodo a 422,7, 202,6, 324,8 283,4, e 213,9 nm, respectivamente, e fendas de 0,7, 1,3, 1,3, 0,2, e 1,3 nm, respectivamente, após digestão (HNO_3: H_2O_2, 5: 1; v / v) e a adição de 0,1% (p/v) de lantânio como La_2O_3 (só por análises de Ca e Mg). As soluções padrão de trabalho foram preparadas com $CaCl_2$, $MgCl_2$, $CuCl_2$, $FeCl_3$, e $ZnCl_2$ (Titrisol, Merck, Darmstadt, Alemanha) (LOBO et al, 2009).

4.4 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS SEMENTES

4.4.1 PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO

O teste de germinação foi conduzido com três repetições de 75 sementes para cada cultivar, as quatro variedades foram desinfetadas superficialmente antes da embebição, de acordo com o método de Santa-Catarina et al. (2001). As sementes foram lavadas com 250 ml de água destilada e depois imersa em 1% (v / v) de hipoclorito de sódio durante 10 min. Subsequentemente foram lavadas cinco vezes com água destilada e, em seguida, acondicionadas em sacos plásticos contendo uma camada de papel germitest, duas camadas de papel toalha e 12,5 ml de água destilada. As sementes foram incubadas em câmara B.O.D. (modelo P500) no escuro com temperatura de 25 ± 2 ºC durante 7 dias.

4.4.2 TESTES DE VIGOR

A porcentagem de vigor das diferentes amostras foi obtida após 4 dias seguindo as mesmas condições descritas no item 4.5.1.

4.5 METODOLOGIA DE COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

O experimento de germinação teve a sua realização em 5 etapas durante 3 dias, sendo as etapas os tempos 0h, 12h, 24h, 48h e 72h, ficou estabelecido um período de 72 h com emissão da raíz primaria, como tempo ideal para a germinação das sementes de milho empregadas neste trabalho. As sementes foram lavadas com 250 ml de água destilada e depois imersa em 1% (v / v) de hipoclorito de sódio durante 10 min. Subsequentemente foram lavadas cinco vezes com água destilada e, em seguida, acondicionadas em sacos plásticos contendo uma camada de papel germitest, duas camadas de papel toalha e 12,5 ml de água destilada. As sementes foram incubadas em câmara B.O.D. (modelo P500) no escuro com temperatura de 25 ± 2 ºC. (Fig. 1). Nas sementes germinadas colhidas, a raiz primaria, quando presente,

foram removidas restando apenas o pericarpo, camada de aleurona e endosperma que posteriormente foram triturados para obtenção da farinha e, após liofilizadas, foram armazenadas a -20 ºC até a realização das análises.

4.6 EXTRAÇÃO E ENSAIO DE AMILASES TOTAIS

Em 2 g de amostra de farinha liofilizada, em triplicata, foram adicionados 12 mL de tampão Fosfato Potássico 0,01 M, pH 6,4, contendo $CaCl_2$ 20 mM, e homogeneizado em triturador UltraTurrax durante 3 min. O homogenato foi centrifugado a 10.000*g*, a 4ºC durante 30 min, o sobrenadante foi dialisado durante 12 h contra o mesmo tampão a 4ºC. Após a diálise o extrato obtido foi armazenado em microtubos de 500 µl a -20 ºC para as análises posteriores de atividade enzimática e de proteínas solúveis. Esta solução final foi denominada de extrato enzimático.

4.7 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade amilásica foi avaliada nas quatro cultivares durante a germinação nos tempos 0, 12, 24, 48, 72 h, pela determinação de açucares redutores formados quando incubados com amido 1%, utilizando o reagente de DNS, ou acido 3´,5´-dinitrosalicílico (MILLER, 1959). A mistura de reação constituía de tampão de reação (Fosfato 0,01 M, pH 6,4, $CaCl_2$ 20 mM) e amido de batata 1% (p/v). Após a incubação desta mistura a 37ºC durante 5 min. Alíquotas foram retiradas e adicionas em tubos contendo DNS e aquecidos em banho fervente por 5 min. A leitura da absorbância foi realizada em 540 nm.

O teor de proteína dos extratos das análises foi determinado pelo método do ácido bicinconínico, segundo metodologia descrita por Smith et al. (1985). Foram aplicados às amostras 200 µL do reagente contendo ácido bicinconínico e $CuSO_4$ em micro placa em triplicata e submetida a banho-maria a 37°C, por 30 min. Em seguida, a placa foi retirada do banho-maria até que atingisse a temperatura ambiente. Posteriormente, foi feita a leitura da placa em espectrofotômetro utilizando um filtro de 560 nm. Uma curva padrão foi preparada utilizando solução de albumina sérica bovina (BSA) 0,1%. A quantidade de proteína dos extratos foi calculada utilizando a equação derivada da curva padrão. Os níveis relativos de proteína, nos extratos enzimáticos, foram determinados considerando a média das triplicatas.

Uma unidade da atividade da enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de açúcar redutor por minuto a partir do amido solúvel nas condições do ensaio e expressa em µmol de açúcares redutores produzidos pela degradação de amido, por mg/proteína/min.

4.8 ATIVIDADE DE α-AMILASE E β-AMILASE.

As atividades de α-amilase e β-amilase foram determinadas utilizando os métodos de CERALPHA® e BETAMYL® (Megazyme) respectivamente, conforme proposto por Bassinello et al. (2002).

A atividade especifica foi expressa em função da quantidade de p-nitrofenol liberada pela massa de proteína contida na amostra ao longo do tempo de reação. As determinações foram feitas em triplicata para todas as amostras e nos tempos 0, 12, 24, 48 e 72 h.

4.9 DETERMINAÇÃO DE AMIDO TOTAL

A concentração de amido nas amostras foi determinada usando o procedimento de TOTAL STARCH ASSAY (Megazyme). A 100 mg de amostra foram adicionados 5 ml de etanol 80% v/v e incubadas a 80°C durante 5 min. Após a incubação foi agitado vortex para total dispersão e outros 5 ml foram adicionados, centrifugados a 3000 rpm. Durante 10 min., o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 10 mL de etanol 80% v/v homogeneizado no vortex e centrifugado a 3000 rpm x 10 min e retirado o sobrenadante cuidadosamente. Ao precipitado formado foram adicionados 3 mL de enzima α-amilase e em seguida incubada num banho de água fervente durante 12 min. Passados os 12 min as amostras foram colocadas em um banho de água a 50 °C, adicionados 0,1 ml de amiloglucosidase, agitadas em vortex e depois deixadas incubando a 50 °C durante 30 min. O conteúdo foi ajustado a 10 mL seguido por centrifugação (Kubota Eppendorf 5804 R) a 3000 rpm por 10 min. A alíquota 0,1 mL foi transferida para tubos em triplicata e adicionou-se 3 ml de Reagente GOD-POD seguido de uma incubação a 50 °C durante 20 min.

A absorbância para cada amostra e a D-glicose controle foram lidas a 510 nm contra o branco de reagente. A percentagem de amido em base seca foi calculada pela seguinte equação:

$$\%\, Amido\ peso\ seco = Amido\ \%\ w/w\ \mathbf{x} \frac{100}{100 - \text{conteudo de umidade (\% w/w)}}$$

4.10 ISOLAMENTO DE AMIDO

O amido foi extraído a partir das amostras germinadas, sendo retirados eixos embrionários e casca, trituradas em moino até a obtenção da farinha. Após a adição de água destilada equivalente a 5 vezes o peso da farinha, a amostra foi homogenizada em vortex durante aproximadamente três minutos. Seguiu-se a filtração

em algodão e centrifugação a 10.000 x g, por 30 minutos, a 4 “C; o resíduo foi lavado com água destilada e novamente centrifugado. Os processos de lavagem e centrifugação foram repetidos, por no mínimo dez vezes, até a eliminação dos pigmentos e obtenção de um amido branco e limpo.

O resíduo foi colocado à temperatura de 40ºC. Após a secagem o amido foi triturado e peneirado para obtenção de um pó fino.

4.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As alterações estruturais durante a germinação no milho foram observadas nas quatro cultivares nos tempos 0, 12, 24, 48 e 72 h por microscopia eletrônica de varredura. As amostras de amido obtidas do processo de isolamento foram pinceladas sobre o porta-amostras (“stub”) contendo uma fita dupla face de carbono e metalizadas com ouro no equipamento Sputter Balzers SCD 050, após a metalização foram observadas ao microscópio eletrônico de varredura ZEISS DSM 940A

4.12 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para cada uma das variedades e cultivares nos tempos 0 e 72 h pesaram-se 200 mg do material e adicionaram-se 5 mL de tampão de extração (0,5 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,7 M sacarose, 5 mM EDTA, 0,1 M KCl, 10 mM tiouréia, 2% β-mercaptoetanol; 2% PMSF) e 5 mL de tampão de fenol saturado, pH 8,0. A solução foi homogeneizada por 30 min em banho com gelo e centrifugada (Eppendorf, modelo 5804 R) a 12.000 x g por 15 min a 4 °C. A fase fenólica foi recuperada em tubos Nalgene®, sobre a qual foram adicionados 5 volumes de 0,1 M acetato de amônio diluído em metanol e o homogenato mantido a -20 °C por 16 h para total precipitação das proteínas. Posteriormente, os homogenatos foram novamente centrifugados a 12.000 x g por 15 min a 4 °C. Os pellets foram lavados três vezes com 5 mL de acetona 80% e três vezes com 5 mL de etanol 75%.

O resíduo obtido foi mantido à temperatura ambiente por 1 h para secagem e, posteriormente, com N_2 para total evaporação do etanol e secagem dos pellets. Finalmente, as amostras protéicas foram ressuspendidas em 200 μL de solução de lise (7 M uréia, 2 M tiouréia, 4% CHAPS, 40 mM DTT e 2% IPGphor® - GE pH 3-10), seguida por sonicação em gelo por 30 min. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 12.000 x g por 30 min a 4 °C e o sobrenadante transferido para um novo microtubo.

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (1976) em espectrofotômetro (Micronal, modelo B582) a 595 nm em microplacas. O

cálculo foi realizado através da interpolação dos valores de absorbância obtidos com a curva padrão de albumina sérica bovina (BSA). As amostras foram armazenadas a -20 °C até o momento da utilização.

4.13 ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL (SDS-PAGE)

Para a realização da análise de eletroforese unidimensional amostras de proteína extraídas de cada uma das variedades de milho nos tempos 0 e 72 h foram diluídas em tampão Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10% Glicerol, 2% SDS; 5% 2-mercaptoetanol; 0,02% Bromofenol) (LAEMMLI, 1970). Posteriormente, a solução foi aquecida a 100 °C por 5 min e centrifugada a 7.000 x g por 15 min a 20 °C. Devido ao baixo peso molecular das proteínas a serem observadas, foram polimerizados géis de resolução em 1,5M Tris-HCl (pH 8,8) com de 12,5% acrilamida e 40% bisacrilamida; 10% SDS; 10% persulfato de amônio e 0,1 % Temed) e géis de empacotamento a 4,0 % (0,5M Tris-HCl (pH 6,8); 40% Acrilamida/Bisacrilamida; 10% SDS; 10% APS e 0,1% Temed). Alíquotas dos homogenatos contendo 25 μg de proteína total foram carregadas em cada poço dos géis. Os géis foram corridos no sistema Protean II xi Cell da Bio-Rad a 120V por 2 h, utilizando tampão de corrida ou tampão glicina (25 mM Tris-HCl; 192 mM Glicina; 0,5% SDS, pH 8,3). O padrão de peso molecular utilizado foi Pre-stained Kaleidoscope Molecular Weight Standards (Bio-Rad, 161-0375), num volume de 7 μl/poço, permitindo a identificação de fragmentos proteicos de peso molecular de 10 a 250 kDa. Após a corrida, os géis foram corados em solução de Coomassie blue (17% sulfato de amônia; 2% ácido fosfórico; 30% metanol; 0,04% Coomassie blue G-250) por 12 h. Posteriormente, os géis foram descorados em solução descorante (1% ácido acético) por 3 h e lavados em água destilada. As imagens foram digitalizadas em scanner ImageScaner III, LabScan 6.0 (GE Healthcare).

4.14 ANALISE ESTATÍSTICA

Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 4x5, onde os fatores foram: cultivar e tempo de germinação. Os dados foram obtidos de três repetições por tratamento. A análise de variância (ANOVA) foi usada para determinar diferenças significativas entre os tratamentos. Quando as diferenças foram detectadas, ao nível de 5%, foi realizado o teste de Tukey para comparação de médias entre os tratamentos. O programa Statistical Analysis System©, (versão 9.0, SAS Institute Inc, Cary, NC) foi usado para esta finalidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Para a avaliação da inocuidade de sementes de milho obtidas por transformação genética com seus respectivos genitores convencionais, sobretudo aquelas que são empregadas na alimentação humana e animal, é de grande importância a análise da composição química. Através dessa analise é possível identificar a Equivalência Substancial, um indicador da similaridade entre a semente convencional e a geneticamente modificada. Esta comparação deve ser realizada preferencialmente entre a planta geneticamente modificada e seu respectivo genitor ou parental mais próximo (FAO, 1996).

A Tabela 5 apresenta os resultados das determinações de composição centesimal dos milhos convencionais e geneticamente modificados, para a comparação dos parâmetros nutricionais, que são indispensáveis para a avaliação da Equivalência Substancial. Pode-se observar que as diferenças existentes entre cada amostra e entre os grupos de milhos são em casos específicos estatisticamente significativas (p>0,005), porém todos se encontram dentro dos parâmetros de variabilidade que são esperadas para a espécie conforme os valores de referência.

TABELA 5: Análise de composição centesimal de sementes de milho transgênicas com seus respectivos genitores convencionais.

Análise	C1	G1	C3	G3	Pr>F	*Referência
Umidade	11,58 ± 0,3[a]	10,99 ± 0,34[a]	8,29 ± 0,28[b]	8,59 ± 0,10[b]	<0.0001	7,5 - 38,2
Nutrientes g/100 g						
Proteínas	7,50 ± 0,2[a]	7,78 ± 0,1[a]	7,8 ± 0,1[a]	7,66 ± 0,2[a]	<0.0933	6,2 - 12,0
Lipídios	4,93 ± 0,3[c]	6,20 ± 0,2[b]	5,39 ± 0,1[ab]	5,69 ± 0,2[a]	<0.0001	1,98- 6,0
Cinzas	1,16 ± 0,1[a]	1,28 ± 0,1[a]	1,23 ± 0,1[a]	1,29 ± 0,1[a]	<0.0966	0,67 - 1,751
Carboidratos [1]	75,05 ± 0,3[b]	74,60 ± 0,4[b]	77,27 ± 0,4[a]	76,76 ± 0,1[a]	<0.0001	50,60 - 78,3

[1] NÍVEIS DE CARBOIDRATOS FOI ESTIMADO PELA FÓRMULA: % CARBOIDRATOS = 100 - (% PROTEÍNA + % LIPÍDEOS + % CINZAS + % UMIDADE)
VALORES DA MÉDIA ± DESVIO PADRÃO.
[A-B] DIFERENTES LETRAS NA LINHA SÃO ESTATISTICAMENTE DIFERENTES (P < 0,05)
**FONTE REFERÊNCIA: INTERNATIONAL LIFE SCIENCES INSTITUTE – ILSI (HTTPS://WWW.CROPCOMPOSITION.ORG)*

Destaca-se o elevado teor de umidade das cultivares C1 e G1, apresentando valores de umidade entre 11,58% e 10,99% respetivamente, com diferenças significativas comparadas com as cultivares C3 e G3, porém dentro dos valores de referência. Este fator é considerado importante na prevenção e deterioração dos grãos armazenados que mesmo com pequenas variações fora da referência no teor de umidade são consideradas comercialmente intoleráveis. Outro ponto relevante é a fração proteica que, em base seca, se mantém estável entre as amostras

convencionais e as modificadas, evidenciando que as alterações introduzidas não afetam significativamente a expressão proteica como um todo.

TABELA 6: Análise das frações de sementes de milho transgênicas com seus respectivos genitores convencionais.

Análise	C1	G1	C3	G3	Pr>F	*Referência
Ácidos Graxos g/100g						
C 16:0 palmíitico	0,66 ± 0,0[a]	0,81 ± 0,04[a]	0,84 ± 0,06[b]	0,79 ± 0,04[c]	0.0007	0,26 – 0,42
C 16:1 (n-7) palmitoléico	ND	ND	ND	ND	<0,0001	0,003 - 0,006
C 18:0 esteárico	0,08 ± 0,0[c]	0,12 ± 0,0[a]	0,18 ± 0,0[ab]	0,18 ± 0,0[cb]	<0,0001	0,032 - 0,074
C 18:1 (n-9) oléico	1,50 ± 0,1[c]	2,09 ± 0,0[a]	1,67 ± 0,2[d]	1,64 ± 0,07[b]	<0,0001	0,498 - 1,087
C 18:2 (n-6) linoléico	2,35 ± 0,1[a]	2,75 ± 0,0[a]	2,42 ± 0,3[a]	2,34 ± 0,1[a]	<0.0162	0,910 - 1,763
C 20:0 araquidônico	0,03 ± 0,0[b]	0,03 ± 0,0[a]	0,05 ± 0,0[b]	0,04 ± 0,0[b]	<0,0001	0,008 - 0,014
C 20:1 elaídico	0,02 ± 0,0[a]	0,02 ± 0,0[a]	0,01 ± 0,0[a]	0,01 ± 0,0[a]	<0,0001	0,005 - 0,009
C 18:3 (n-3) linolênico	0,05 ± 0,0[a]	0,07 ± 0,0[a]	0,09 ± 0,0[a]	0,08 ± 0,0[a]	<0.0055	0,017 – 0,042
C 22:0 behênico	0,01 ± 0,0[a]	0,02 ± 0,0[a]	0,02 ± 0,0[a]	0,02 ± 0,0[a]	<0,0001	0,003 - 0,006
C 24:0 lignocérico	0,02 ± 0,0[a]	0,02 ± 0,0[a]	0,02 ± 0,0[a]	0,02 ± 0,0[a]	<0.0337	ND
Saturados	0,80 ± 0,0[a]	1,00 ± 0,0[a]	1,11 ± 0,1[a]	1,05 ± 0,0[a]	<0,0001	0,302 – 0,509
Monoinsaturados	1,51 ± 0,1[b]	2,11 ± 0,0[a]	1,69 ± 0,2[ab]	1,66 ± 0,1[a]	<0,0001	0,506 – 1,102
Polinsaturados	2,40 ± 0,1[c]	2,81 ± 0,0[a]	2,51 ± 0,3[b]	2,42 ± 0,1[b]	<0.0144	0,927 – 1,805

[a-c] DIFERENTES LETRAS NA LINHA SÃO ESTATISTICAMENTE DIFERENTES (P < 0,05)
**Fonte referência: International Life Sciences Institute – ILSI (https://www.cropcomposition.org*

A composição de ácidos graxos das frações lipídicas das sementes de milho estudadas mostra diferenças relativas aos valores de referência tomados da literatura científica. Em sementes oleaginosas é bem conhecida a flutuação devida a fatores climáticos e de localização de plantio, aqui também apresentada entre as amostras de milho, do mesmo modo como relatado entre amostras de soja GM e convencionais analisadas anteriormente em nosso laboratório (BEZUTI, 2004), não implicando na concentração total de lipídeos nas sementes.

TABELA 7 – Análise de minerais de sementes de milho transgênicas com seus respectivos genitores convencionais.

Minerais µg/g	C1	G1	C3	G3	Pr>F	*Referência
Cálcio	43 ± 0,0[a]	38,3 ± 1,1[a]	33,3 ± 5,1[a]	36,3 ± 2,08[a]	0.0007	11,8 – 1010
Magnésio	940 ± 43,6[a]	983,3 ± 43,6[a]	953,3 ± 11,5[a]	1336 ± 20,8[a]	<0,0001	594 - 1940
Ferro	17,5 ± 0,5[a]	19 ± 0,4[a]	12,3 ± 0,6[a]	15,3 ± 0,6[a]	<0,0001	9,51 – 20,56
Zinco	19 ± 0,0[a]	31,3 ± 0,6[a]	30,5 ± 4,5[a]	19,6 ± 1,1[a]	<0,0001	6,5 – 42,6

[a-c] DIFERENTES LETRAS NA LINHA SÃO ESTATISTICAMENTE DIFERENTES (P < 0,05)
**Fonte referência: International Life Sciences Institute – ILSI (https://www.cropcomposition.org)*

5.2 AVALIAÇÃO DE POTENCIAL FISIOLÓGICO DAS SEMENTES

Os resultados do teste de germinação, são apresentados na Figura 5, na qual são apresentadas as quatro cultivares sobre as mesmas condições de temperatura e substrato, que variam de 92 a 96% entre si. Deste modo pode-se afirmar que a viabilidade das sementes não foi afetada pelas diferentes modificações genéticas impostas. As cultivares G1 e G3 possuem percentagens de germinação similares (94% e 95%), estas diferenças podem estar relacionadas diretamente com as condições de temperatura e umidade, sendo que as cultivares C1 e C2 apresentam percentagens idênticas de 93%. No entanto não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre as cultivares (p>0,005).

Analisando-se os resultados obtidos nos testes de germinação, na primeira contagem de germinação, verifica-se que as cultivares C1, G1 e C3, apresentaram desempenho mais baixo em relação a cultivar G3, segundo Alves et al. (2002), diferenças de porcentagem entre cultivares podem estar influenciados pela a presença de minerais não intencionais no substrato, estes poderiam diminuir a velocidade de germinação devido a ação inibitória sobre algumas enzimas encarregadas da degradação da parede celular. No presente caso, porém foram tomados os cuidados de uso água desmineralizada no intumescimento das sementes, levando a crer que a germinação precoce da amostra G3 seja um traço próprio da variedade.

Foi visto, por outro lado, que nas sementes de milho com alta porcentagem de germinação podem apresentar baixo vigor, este tipo de comportamento foi observado nas quatro cultivares devido a presença de sementes com menor comprimento da radícula no quarto dia. No entanto, isso demonstra que o vigor não implica diretamente na porcentagem de germinação. O efeito sobre o vigor nas sementes também pode estar associado à embebição mais rápida das sementes injuriadas, devido à rápida

distribuição da água nos espaços entre o pericarpo e a camada de aleurona. Em consequência, haveria maior rapidez no início da metabolização das reservas rumo à germinação em relação aos tratamentos com menor percentual de sementes com injurias mecânicas no pericarpo.

Os teores de umidade não influenciaram nos resultados de testes que avaliam a velocidade de germinação ou de emergência de plântulas. Sabe-se que as sementes com maior teor de umidade, dentro de limites, podem apresentar germinação mais rápida, o mesmo ocorrendo com o desenvolvimento inicial das plântulas como observamos na cultivar G1 e G3. Avaliando o potencial fisiológico de sementes de milho doce em função do teor de água na colheita e da temperatura de secagem, Guiscem, Nakagawa e Zucareli (2002) verificaram que dentre os testes conduzidos, o teste de primeira contagem de germinação foi um dos mais eficientes.

O baixo vigor durante a germinação das sementes é manifestada pela redução na taxa e no perfil uniforme da germinação, reduzindo a tolerância ao estresse ambiental, com emergência inferior e menor desenvolvimento da plântula. Este parâmetro é importante para distinguir a perda de vigor que precede a perda da capacidade de germinação O resultado do teste de germinação conduzido nas sementes, foi portanto, adequado para representar a capacidade produtiva e viabilidade nas sementes de milho.

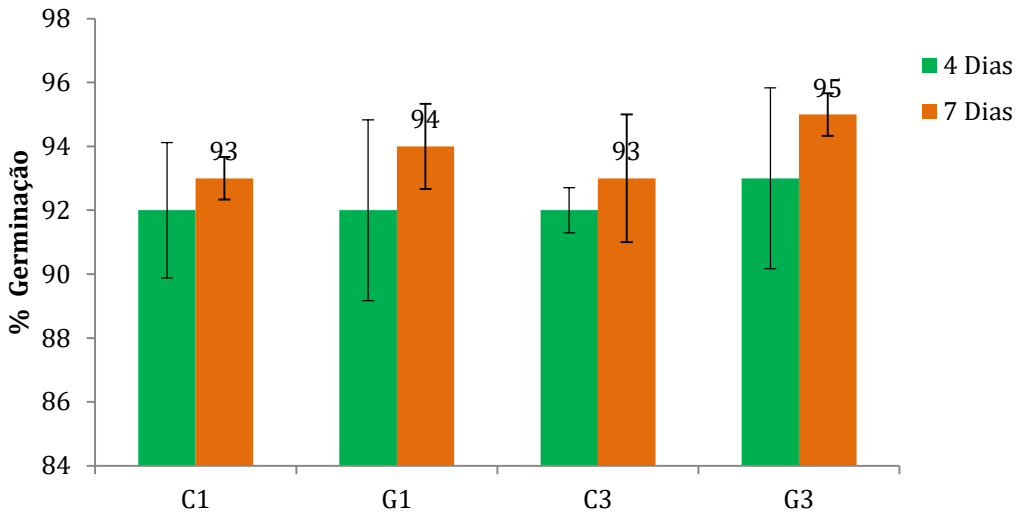


Figura. 5 - Valores da capacidade de germinação (%) de cultivares de milho a 25°C de temperatura durante quatro e sete dias. (porcentagem de sementes germinadas)

Os resultados apresentados, não destacaram a superioridade de alguma das cultivares nos testes de germinação e vigor; porém, quando se avaliou a porcentagem de germinação das plântulas, a cultivar G3 foi indicada como a maior porcentagem de

germinação. A observação referente ao comportamento da cultivar G3 foi confirmada no teste de primeira contagem de germinação que avalia, indiretamente, a velocidade de germinação. Segundo Nakagawa (1999), a primeira contagem de germinação frequentemente é mais sensível para identificar diferenças de vigor entre lotes do que a velocidade de germinação.

5.3 ATIVIDADE AMILOLÍTICA

Durante o processo germinativo das sementes de milho sob temperatura controlada de 25°C foi constatado um aumento da atividade amilolitica nas primeiras horas de germinação até atingir 12 horas após embebição (Hae) (Figura 6). Esse aumento da atividade foi constatado em todas as cultivares ($p>0,005$). Segundo Georg-Kramer et al. 2000, em trabalhos realizados na cevada, pode haver a inativação de um inibidor cujo principal propósito é regular a atividade da α-amilase para evitar uma germinação prematura, porém esta hipótese não está confirmada.

Na Figura 6 pode-se observar que a atividade amilolítica aumentou durante a germinação em proporções semelhantes para todos os ensaios. O aumento foi lento inicialmente, elevando-se exponencialmente a partir de 48h, após as sementes serem postas a germinar. A taxa de atividade enzimática baixa nas sementes é quase que exclusivamente devido à presença das β-amilases, já com isto, percebe-se que esta mobilização de enzimas, a princípio, é lenta, acelerando posteriormente até alcançar seu valor máximo no quarto dia, quando a concentração de produtos gerados pelas enzimas faz com que parte destas sejam inibidas e sua atividade se reduza a um valor constante (DANTAS, 2002 & SANTANA, 2003).

A germinação teve efeitos diferentes conforme a cada cultivar. Pode-se observar que até completar 24 Hae, ocorreu o primeiro grande aumento de atividade das enzimas, seguido de um aumento moderado até 48 Hae para todas as cultivares. A atividade das amilases totais, que são a α-amilase, β-amilase, enzimas desramificadoras e α-glucosidase, têm direta relação com este tipo de ritmo de crescimento mais acelerado, principalmente a atividade de α-amilase. Isso ocorre porque as amilases totais, além de serem sintetizadas, algumas dessas enzimas, são preexistentes nas sementes e são ativadas durante a germinação (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1985).

Após 72 h de germinação notou-se um aumento acentuado da atividade nas quatro cultivares. Segundo relatos de Kunze (1996), estudos realizados em cevada mostram que a maior parte da α-amilase é sintetizada no segundo e quarto dia de germinação e a quantidade desta enzima pode ser aumentada durante o prolongamento da germinação, quando são requeridos maltes muito ricos em enzimas

para converter grandes quantidades de amido nas cervejarias. Também de acordo com trabalhos efetuados por Georgkraemer et al. (2000) os níveis das amilases produzidas aparecem em ascensão durante a maltagem com atividades diferentes ao longo do processo, sendo importante determiná-los. Segundo vários autores, em sementes de cereais e leguminosas a atividade amilolítica aumenta até, aproximadamente, o décimo dia após o início da embebição, sendo que o maior aumento ocorre por volta do segundo e o quarto dia.

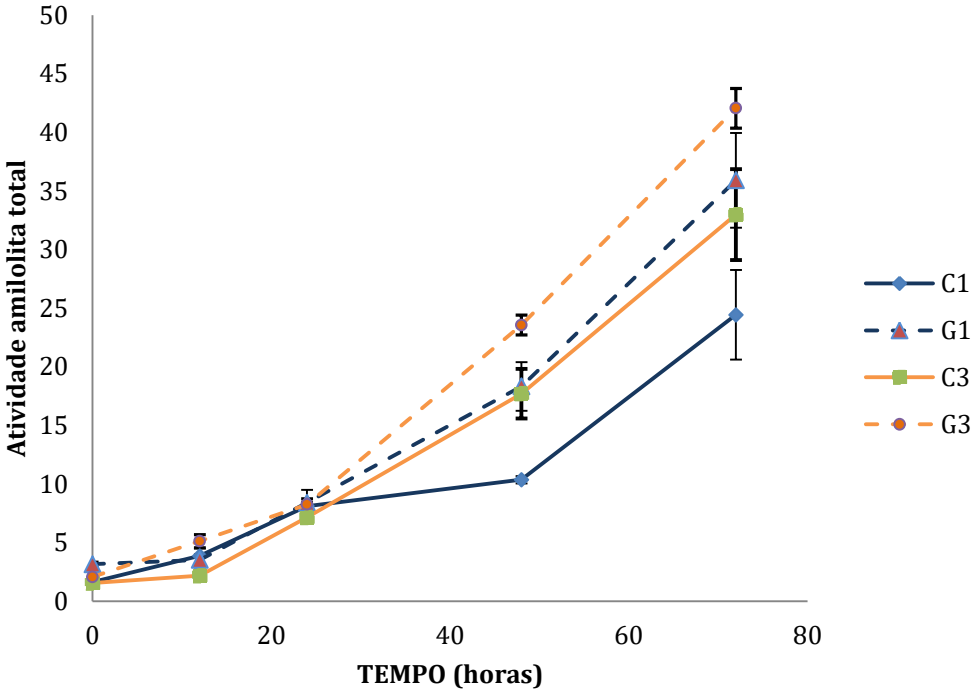


Figura. 6: Curva de atividade amilolítica total (U/mg) durante a germinação de sementes de milho.

Comparativamente ao que ocorre com a cevada, a produção de α e β-amilases vai depender de vários fatores como: variedade do cereal, condições climáticas, tamanho do núcleo embrionário, conteúdo de água mais elevado na produção de malte verde, temperatura de germinação e maceração. Fica evidente que quanto mais elevada à temperatura, mais rápido é o processo (SAIKA et al., 2005). Em função da importância desses fatores se faz necessário o estudo das condições com determinação de variáveis específicas de forma a aperfeiçoar as atividades enzimáticas.

Na Tabela 8 encontram-se os dados da atividade enzimática das sementes de milho durante a germinação em escala laboratorial. Foram realizados ensaios em triplicatas para um mesmo período com as sementes da mesma safra. Segundo SANTANA, 2003, é de se esperar, inicialmente, uma taxa de atividade enzimática

baixa nas sementes, quase exclusivamente pela ação de β-amilases, nas primeiras horas após a embebição, já que as sementes estão em estado de dormência.

Com isto, percebe-se que a expressão destas enzimas é lenta a principio acelerando posteriormente até alcançar seu valor máximo, no quarto dia, é quando a concentração de produtos gerados pelas enzimas faz com que parte destas sejam inibidas e suas atividade se reduza a um valor constante. É perceptível um comportamento da atividade enzimática semelhante ao de uma curva exponencial na etapa de aumento enzimático (Figura 6).

TABELA 8 - Análise de atividade enzimática de sementes de milho transgênicas com seus respectivos genitores convencionais.

Amostras	**Atividade Enzimática Total (U/mg)**				
	0	12	24	48	72
C1	$1.64±0,11^{Bd}$	$3.86±0,43^{ABcd}$	$8.10±0,21^{ABbc}$	$10.35±2,11^{Cb}$	$24.43±3,88^{Ba}$
G1	$3.15±0,50^{Ad}$	$3.52±0,55^{BCd}$	$8.39±0,50^{Ac}$	$18.32±0,85^{Bb}$	$35.90±1,70^{Aa}$
C3	$1,54 ±0,11^{Bd}$	$2,17±0,64^{Cd}$	$7,14 ±0,36^{Ac}$	$17,70± 0,31^{Bb}$	$32,97± 3,83^{ABa}$
G3	$2.05± 0,23^{Bd}$	$5.11±0,47^{Acd}$	$8.24±1,11^{Ac}$	$23.56±2,08^{Ab}$	$42.05±4,04^{Aa}$

[A-C] VALORES NA COLUMNA SEGUIDAS DE DIFERENTES LETRAS SUBSCRITAS DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE CADA CULTIVAR (P < 0,05).
[a-d] VALORES NA LINHAS SEGUIDAS DE DIFERENTES LETRAS SUBSCRITAS DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE CADA TEMPO (P < 0,05).

No geral, houve um aumento da atividade enzimática no tempo 72 Hae, observando-se diferenças significativas entre as cultivares (p > 0,005). As cultivares G1 e G3 apresentaram a maior atividade em todas as etapas da germinação. Nestas cultivares, os resultados indicam que a atividade enzimática em geral apresenta um suposto aumento, não estatisticamente significativo no caso das enzimas amilolíticas, e que é característico para cada espécie.

5.4 α-Amilase

A α-amilase é uma enzima importante na hidrólise do amido, sendo responsável por 90% da atividade amilolítica em sementes de milho (FRANCO et al., 2002). Desse modo, cultivares com maiores atividades dessa enzima, tem mais facilidade em disponibilizar carboidratos para o embrião, resultando em maior velocidade de germinação e vigor.

O conjunto de dados contendo os perfis de atividade da □-amilase e sua relação com a germinação, estão relacionados na Figura 7. Pode-se observar que nas 12 Hai na primeira etapa, até completar 24 horas, ocorreu o primeiro aumento da □-amilase, seguido de um aumento moderado até 48 horas (Figura 7). Completando 72 horas de germinação, notou-se um aumento acentuado desta enzima, que passou de 0,72 U/g (tempo zero) para 18,50 U/mg (tempo 72 horas), na cultivar G1, resultados que estão de acordo com relatos de Kunze (1996), nos quais afirma que a maior parte da □-amilase é sintetizada entre segundo e quarto dia de germinação e a quantidade desta enzima pode ser aumentada durante o prolongamento da germinação, quando são requeridos maltes muito ricos em enzimas para converter grandes quantidades de amido nas cervejarias.

Também de acordo com trabalhos efetuados por Georgkraemer et al. (2000) os níveis das amilases produzidas em alguns cereais como na cevada aparecem em ascensão durante a maltagem com atividades diferentes ao longo do processo, sendo importante determinar quando este momento ocorre durante a germinação, para garantir a máxima produção da enzima e assegurar a degradação do amido em açúcares mais simples utilizados no processo fermentativo bem como para se ter controle do tempo de germinação.

Provavelmente as oscilações na síntese da □-amilase estão relacionadas ao processo fisiológico na formação do grão, no desenvolvimento e início da germinação. Essa síntese está submetida ao controle hormonal das giberelinas na camada de aleurona (MAYA-AMPUDIA & BERNAL-LUGO, 2006; MURALIKRISHNA & NIRMALA, 2005). No caso das amostras aqui analisadas, tal mudança ocorreu durante as doze primeiras horas de germinação (Figura 7).

A quantificação da □-amilase nas sementes embebidas, avaliadas por meio do teste enzimático está representada na Figura 7. Maior atividade de □-amilase foi observada na cultivar G1 e menor atividade na cultivar C3, independente dos fatores associados a sua modificação no caso da G1. Não houve diferenças nos comportamentos das quatro cultivares testadas.

Segundo Rood e Larsen (1988) a expressão das enzimas □-amilases aumenta com o tempo de embebição e a maior expressão observada foi no tempo de 72 horas. Os autores não observaram consistência nos resultados, quanto a comparação foi realizada entre sementes pequenas e grandes.

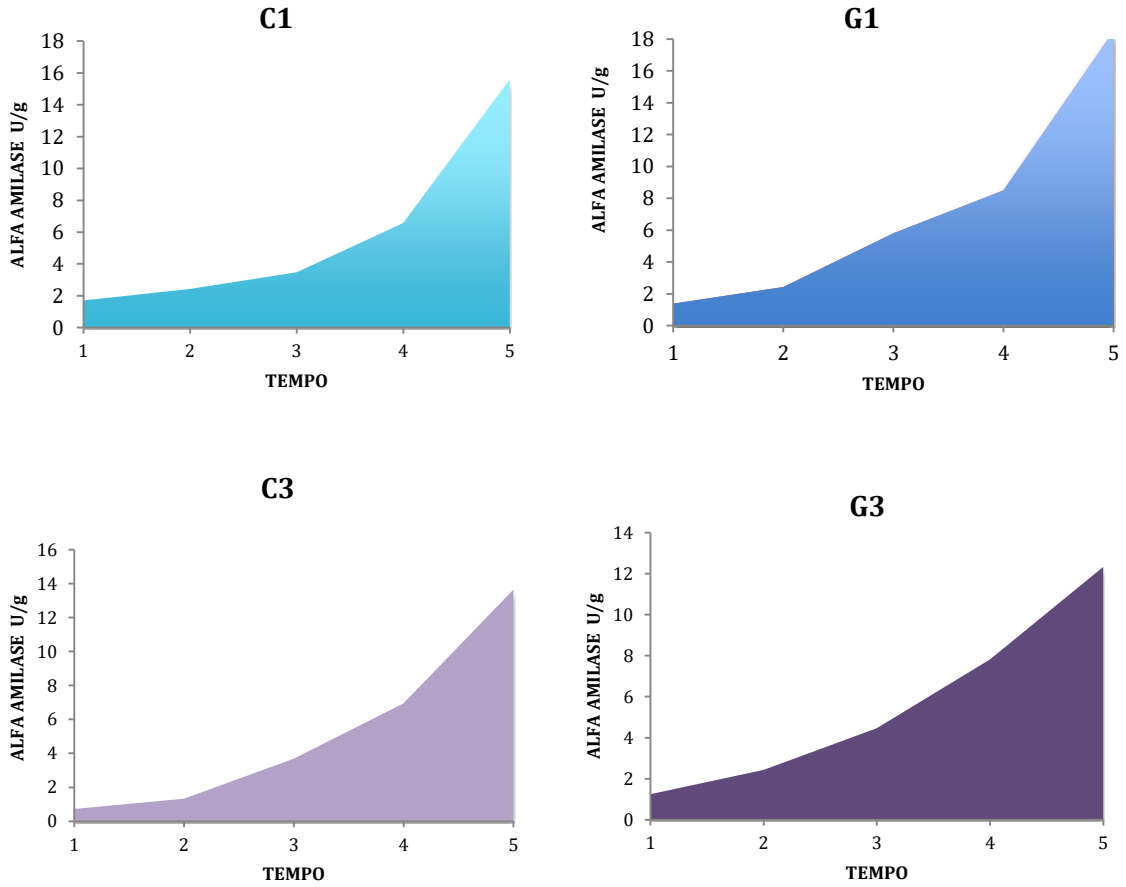


Figura 7 - Curvas de atividade de α amilase (U/g) durante a germinação de sementes de milho. Tempos 0 (1), 12 (2), 24 (3), 48 (4) e 72 h (5).

Tabela 9 - Análise de atividade de α-amilase (U/g) de sementes de milho GM com seus respectivos genitores convencionais.

Cultivar	ALFA AMILASE (U/g)				
	0	12	24	48	72
C1	1,72±0,40^{Ba}	2,43±0,54^{Aa}	3,48±1,48^{ABa}	6,58±1,48^{Ab}	15,59±1,77^{ABc}
G1	1,39±0,22^{ABa}	2,43±0,71^{Aa}	5,82±0,29^{Aa}	8,51±0,336^{Ab}	18,50±1,06^{Bc}
C3	0,72±0,01^{Aa}	1,34±0,09^{Aab}	3,68±01,11^{ABb}	6,95±1,41^{Ac}	13,64±1,01^{Ad}
G3	1,24±0,54^{ABa}	2,43±0,32^{Aa}	4,46±0,42^{ABb}	7,82±0,78^{Ac}	12,33±1,19^{Ad}

$^{A-C}$ VALORES NA COLUMNA SEGUIDAS DE DIFERENTES LETRAS SUBSCRITAS DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE CADA CULTIVAR (P < 0,05).
$^{a-d}$ VALORES NA LINHAS SEGUIDAS DE DIFERENTES LETRAS SUBSCRITAS DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE CADA TEMPO (P < 0,05).

As baixas concentrações de a-amilase no início da germinação estão relacionadas à necessidade de ativação pela embebição, podendo ser observadas as alterações de atividade a partir das 12 h. Segundo Lovegrove e Hooley (2000), Nakajima et al. (2006) e Xie et al. (2007) após a embebição, no embrião, ocorre a sintese de giberelina, que é secretada na camada de aleurona, onde se dá a ativação da sintese de □-amilase.

5.5 BETA AMILASE

Durante o processo de germinação das cultivares, foi verificado um incremento na atividade da enzima β-amilase (Figura 8). Pode-se observar que, a atividade da β-amilase teve um aumento gradual ao longo da germinação, o que, de acordo com a Figura 10, ocorreu concomitantemente ao decréscimo do teor de amido.

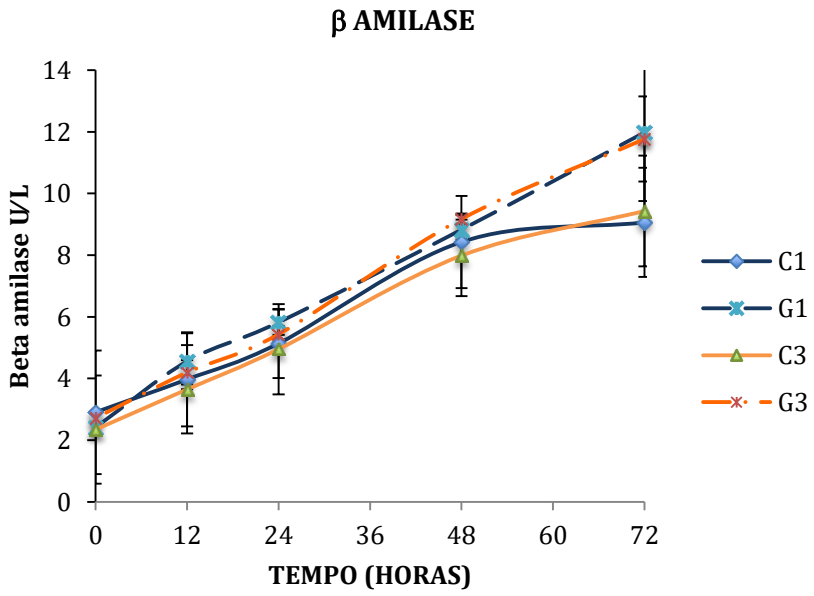


Figura 8: Curvas de atividade de β-amilase (U/L) durante a germinação de sementes de milho.

A atividade de β-amilase neste experimento passou de 2,34 U/L (tempo 0) para 11,98 U/L (tempo 72h), a otimização do tempo de germinação adequado para atingir o nível de atividade da β-amilase e encerrar a germinação é fundamental para atingir bons resultados na maltagem. Para Georg-Kramer et al. (2000) muitas empresas produtoras de malte vêm tentando reduzir o período de germinação no processo de maltagem, o que permitiria a redução de despesas e a maltagem de uma quantidade de grãos em menos tempo. O processo de maltagem induz a germinação e assegura o crescimento da semente com produção de β-amilase de relevante influência no poder diastático.

Tabela 10: Análise de atividade de β-amilase de sementes de milho GM com seus respectivos genitores convencionais.

Cultivar	B-AMILASE (U/L)				
	0	12	24	48	72
C1	2,91±1,42^{Aa}	3,97±1,08^{Aa}	5,13±0,79^{Aa}	8,42±1,1^{Ab}	9,06±1,52^{ABb}
G1	2,42±0,2^{Aa}	4,56±0,64^{Ab}	5,82±0,29^{Ab}	8,82±0,23^{Ac}	11,98±1,57^{Bd}
C3	2,34±1,24^{Aa}	3,64±1,01^{Aa}	4,95±1,03^{Aa}	7,98±0,93^{Ab}	9,43±1,27^{Ab}
G3	2,72±0,14^{Aa}	4,20±0,28^{Aab}	5,44±0,19^{Abc}	9,17±0,12^{Ac}	9,43±1,26^{Bc}

$^{A-C}$ VALORES NA COLUMNA SEGUIDAS DE DIFERENTES LETRAS SUBSCRITAS DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE CADA CULTIVAR (P < 0,05).
$^{a-d}$ VALORES NA LINHAS SEGUIDAS DE DIFERENTES LETRAS SUBSCRITAS DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE CADA TEMPO (P < 0,05).

Entre os tempos 12h e 72 h, a atividade da enzima foi sempre crescente (Figura 9) o que concorda com resultados obtidos por Ziegles (1999) e Evans et al. (1997), que relataram aumentos sensíveis na atividade de □-amilase ao longo da germinação. Foram observados aumentos marcantes nos tempos 12, 24 e 48 horas, estes resultados estão parcialmente de acordo com os de Kunze (1996), que descreveu um incremento da enzima entre o segundo e terceiro dia de germinação.

Estas atividades poderiam estar relacionadas a processos fisiológicos decorrentes da formação do grão e no inicio do desenvolvimento da germinação. Pesquisas realizadas por Evans et al, (1997) mostraram que a maior síntese da □-amilase ocorre durante o desenvolvimento do grão, no entanto as maiores atividades acontecem a partir do segundo dia de germinação e nos subsequentes. Os autores sugerem ainda que o aumento da atividade poderia estar diretamente relacionado à mudança da forma compacta, após a síntese, para forma livre que ocorre nessa enzima.

5.6 TEORES DE AMIDO

O amido é a principal fonte de carbono durante a germinação e estabelecimento de plântulas. No caso das amostras de milhos geneticamente modificadas, G1 e G3, a eventual alteração nos padrões de germinação do milho e mobilização do amido foi testada em H_2O destilada, tendo como controle seus respectivos genitores convencionais C1 e C3. Nestes ensaios, o amido da semente é a única fonte de carbono durante o período de 72 h.

O conteúdo inicial de amido no grão em % porcentagem de massa seca é dado na Tabela 11. As taxas de mobilização de amido durante a germinação e o estabelecimento das plântulas foram distintos entre as quatro cultivares (Figura 6), no entanto, o perfil de mobilização do amido seguiu o mesmo padrão.

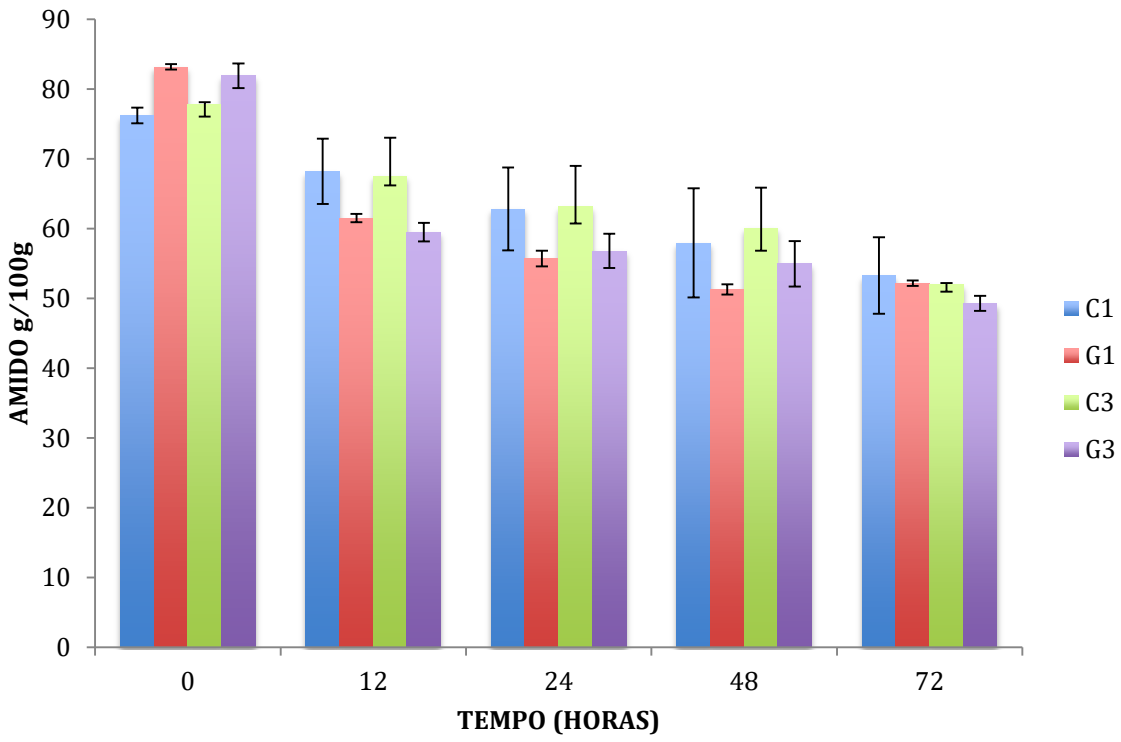


Figura 9 : Teor relativo de amido nas sementes durante a germinação. Todos os valores são calculados com base em peso fresco de grãos pré-geminados. Os valores (%) são a média ± DP de três repetições.

As cultivares C1 e C3 com seu respectivo transgênico, apresentaram um comportamento similar na diminuição dos teores de amido durante a germinação (Figura 10). Por outro lado, no tempo 12 Hai, a cultivar G1 e G3 mostraram uma redução mais acentuada (26% e 27%) respectivamente do teor de amido, quando comparadas com as cultivares C1 e C3, que expressou uma diminuição menos acentuada (11% e 13%) respectivamente, tomando a porcentagem de amido inicial de cada cultivar como 100%, no entanto estas diferenças não foram consideradas significativas ao nível de 5%.

No tempo 24 Hae pode-se observar que as cultivares G1 e G3 indicam uma diminuição no teor de amido de 33% e 30%, no entanto as cultivares C1 e C3 mostraram um comportamento similar mas com uma diminuição gradual ambas com 18%.

Tabela 11: Porcentagem (%) de amido de sementes de milho transgênicas com seus respectivos genitores convencionais.

Cultivar	% AMIDO				
	0 h	12 h	24 h	48 h	72 h
C1	76,21±1,11^{Ac}	68,18±4,68^{Abc}	62,80±5,94^{Aabc}	65,79±7,83^{Aab}	53,27±5,47^{Aa}
G1	83,16±0,40^{Bd}	61,50±0,58^{Ac}	55,71±1,13^{Ab}	51,28±0,72^{Aa}	52,18±0,38^{Aa}
C3	77,81±0,28^{Ac}	67,52±5,48^{Abc}	63,19±5,78^{Aab}	60,09±5,77^{Aab}	52,05±0,13^{Aa}
G3	81,88±1,76^{Bc}	59,50±1,34^{Ab}	56,80±2,45^{Ab}	54,94±3,26^{Ab}	49,29±1,09^{Aa}

$^{A-B}$ VALORES NA COLUNA SEGUIDAS DE DIFERENTES LETRAS DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE CADA CULTIVAR (P < 0,005).
$^{a-c}$ VALORES NAS LINHAS SEGUIDAS DE DIFERENTES LETRAS DIFEREM ESTATISTICAMENTE ENTRE CADA TEMPO (P < 0,005).

O teor de amido começou a diminuir acentuadamente às 48 Hae nas quatro cultivares estudadas. A cultivar G1 apresentou a maior redução no teor de amido quando comparada com as cultivares C1, C3 e G3, que mostraram uma redução mais lenta ao atingir esta etapa (p < 0,05). Esta queda foi equivalente ao aumento da atividade enzimática nas cultivares no mesmo período. Estudo prévio realizado com quinoa indica que este comportamento poderia estar relacionado com o início da mobilização do amido durante a germinação (HAGER, et. al, 2014).

No final do período germinativo avaliado neste estudo (72 h), a mobilização do amido em todas as cultivares mostrou uma redução persistente, por outro lado pode-se observar uma diminuição acentuada nas cultivares G1 e G3, finalizando esta etapa com o consumo do amido de 37% e 39% respectivamente.

5.7 AMIDOS MORFOLOGIA DOS GRÂNULOS

Os diferentes tamanhos e formas dos grânulos de amido podem ser atribuídas à origem biológica da planta, assim como a fisiologia da planta, a morfologia do grânulo de amido depende da bioquímica do cloroplasto ou amiloplasto (SING et al., 2003). Porém existem diversos fatores que podem influenciar as propriedades do grânulo de amido, entre as quais se encontram os fatores ambientais, como as práticas de cultivo aplicadas, temperatura e armazenamento (KAUR et al., 2009).

É de grande importância conhecer a composição macromolecular do amido, como também a organização física das macromoléculas dentro da estrutura do grânulo. Para avaliar os efeitos específicos da estrutura dos amidos sobre a dinâmica de germinação nas sementes de milho e morfologia interna de grãos foi realizada uma análise de microscopia eletrônica de varredura nos tempos 0h,12h, 24h, 48h, 72h da germinação. As micrografias das amostras (Figura 10), mostram a presença de grânulos com tamanhos diversos, o que indica que o processo de extração garantiu a integridade dos grânulos, bem com removeu resíduos celulares. É importante destacar a simplicidade do processo de extração dos amidos que apresentaram grânulos íntegros e livres de outros compostos indesejados.

O formato e tamanho dos grânulos podem influenciar as propriedades físico-químicas do amido. Alguns autores mencionam esta relação de tamanho do grânulo, à digestibilidade, a turbidez do amido em suspenção expressa pela porcentagem de transmitância, o conteúdo de amilose, o poder de intumescimento, a solubilidade e a capacidade de absorção de água (RILEY; WHEATLEY; ASEMOTA, 2006). No entanto, outros fatores, como o conteúdo de fósforo, amilose, a estrutura da amilopectina e a própria estrutura interna do grânulo, poderiam ser considerados como os principais responsáveis pela maioria dessas propriedades.

A seguir, a Figura 12 mostra a microscopia eletrônica de varredura, na qual pode ser observada a compactação dos grânulos de amido, permitindo também constatar tamanhos e formatos nos quais o amido vem empacotado dentro do endosperma ou amiloplastos. As amostras de amido dos milhos C3 e G3 no tempo 0 h (Figura 12) apresentaram alta proporção de grânulos com formato irregular e pequenas depressões ou poros. Estas características morfológicas podem estar relacionadas com a composição química dos amidos, pois os amidos de alto teor de amilopectina apresentam uma superfície rugosa e os de alto teor de amilose uma superfície mais lisa (PENFIELD & CAMPBELL, 1990).

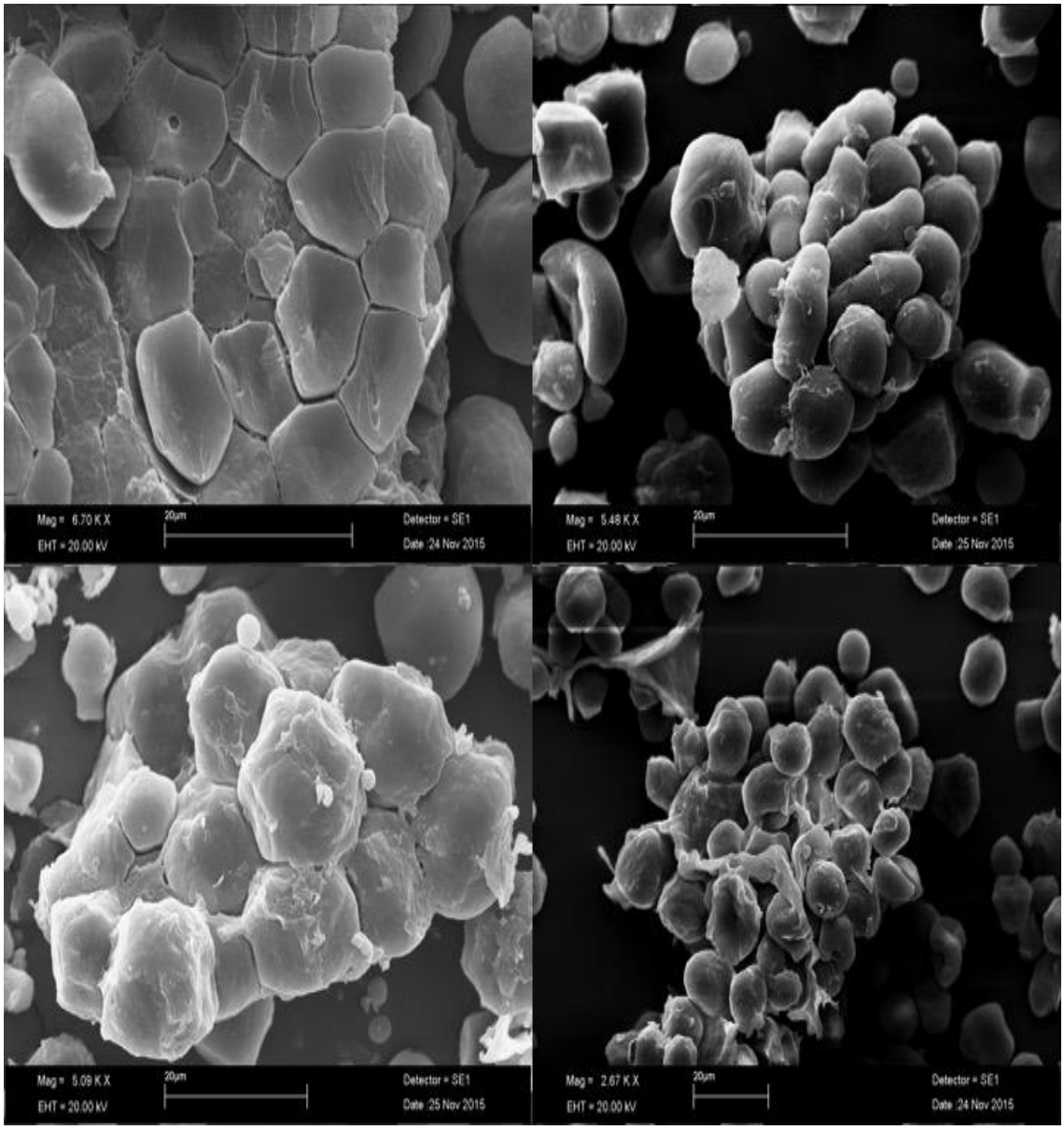


Figura 10: Microscopia eletrônica de varredura (MEV), imagens dos grânulos de amido nativo empacotados.

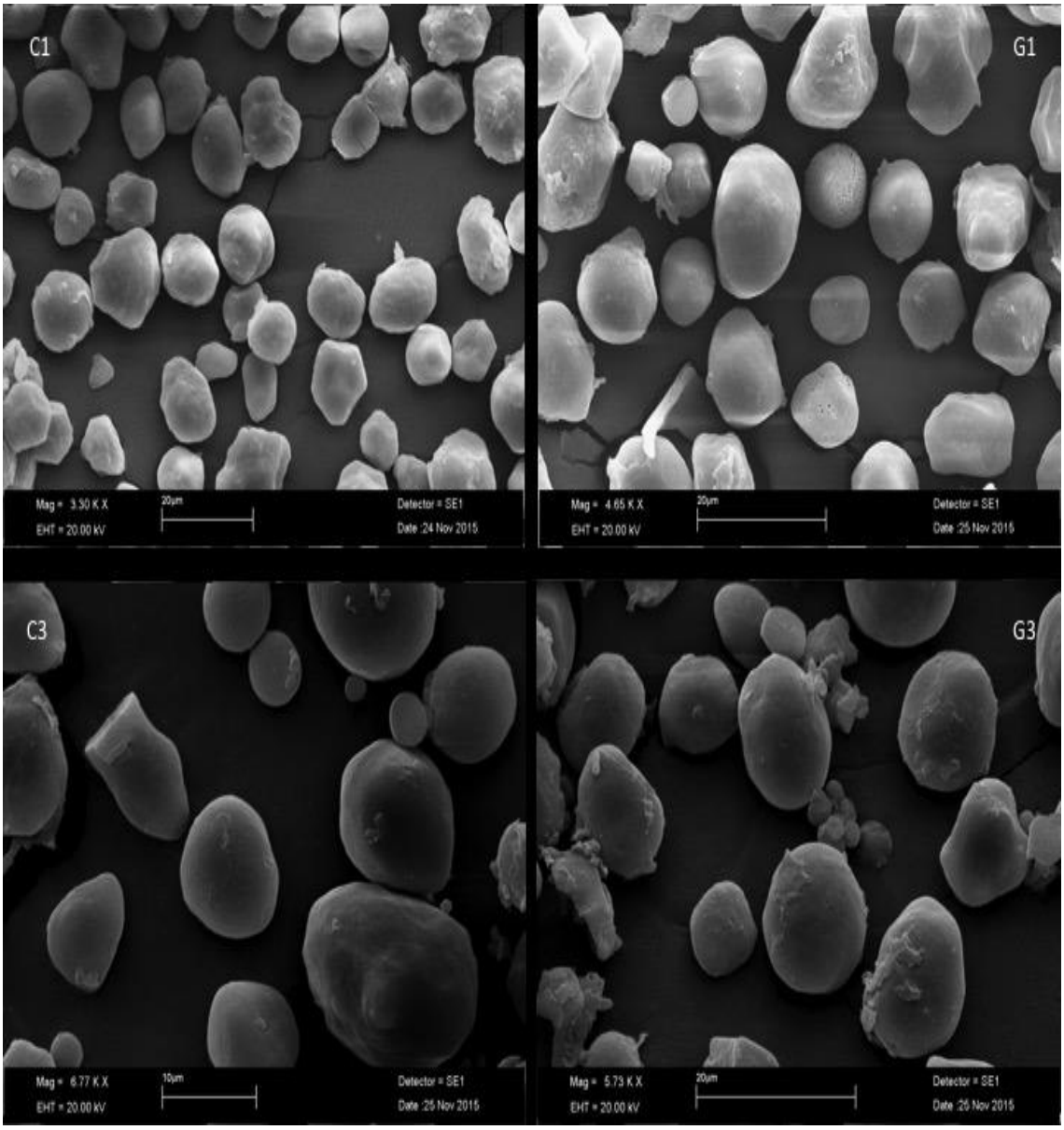


Figura 11: Microscopia eletrônica de varredura (MEV), imagens dos grânulos de amido nativo e hidrolisado das cultivares C1, G1, C3 e G3 no tempo 0.

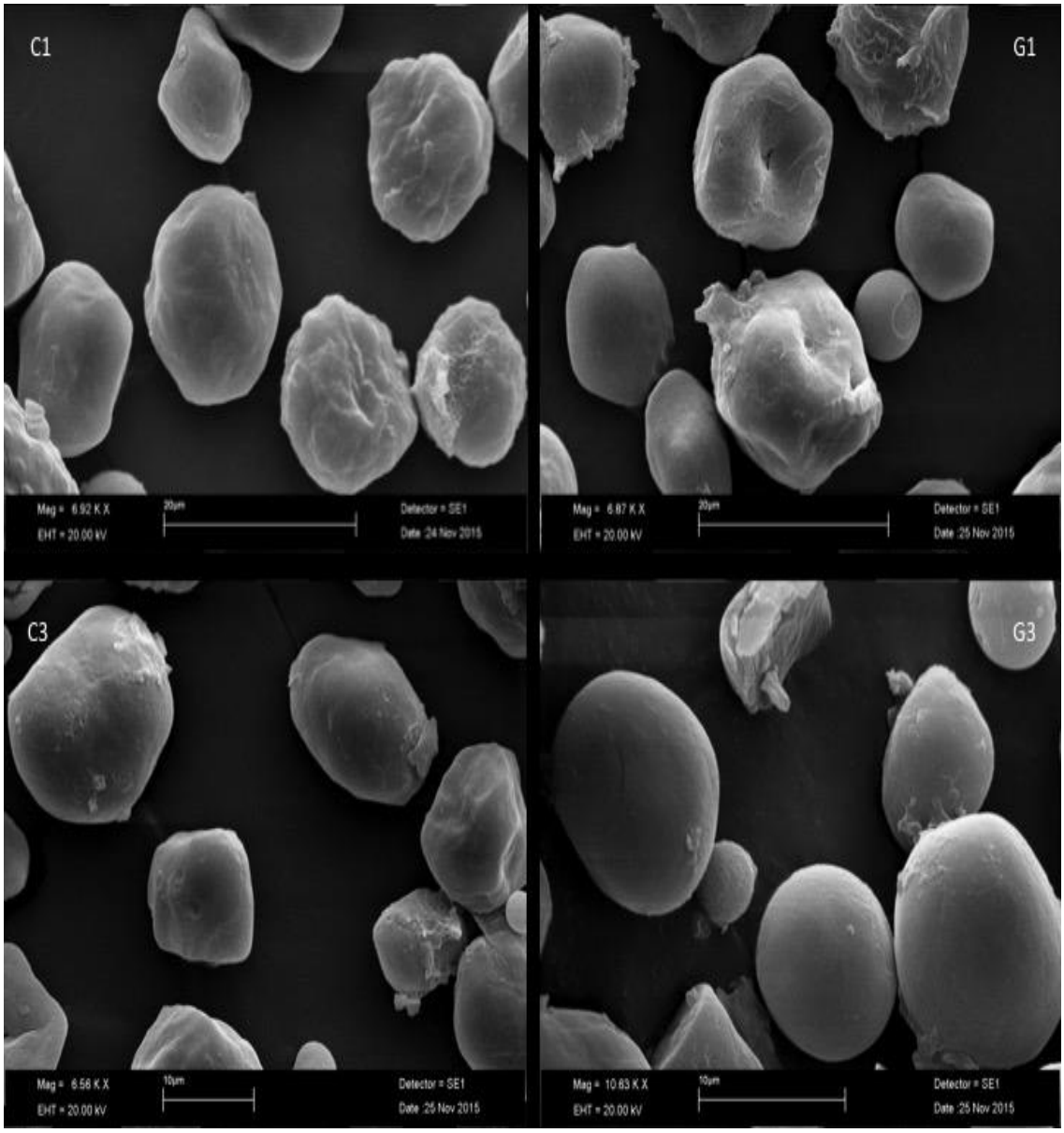


Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura (MEV), imagens dos grânulos de amido nativo e hidrolisado das cultivares C1, G1, C3 e G3 no tempo 12.

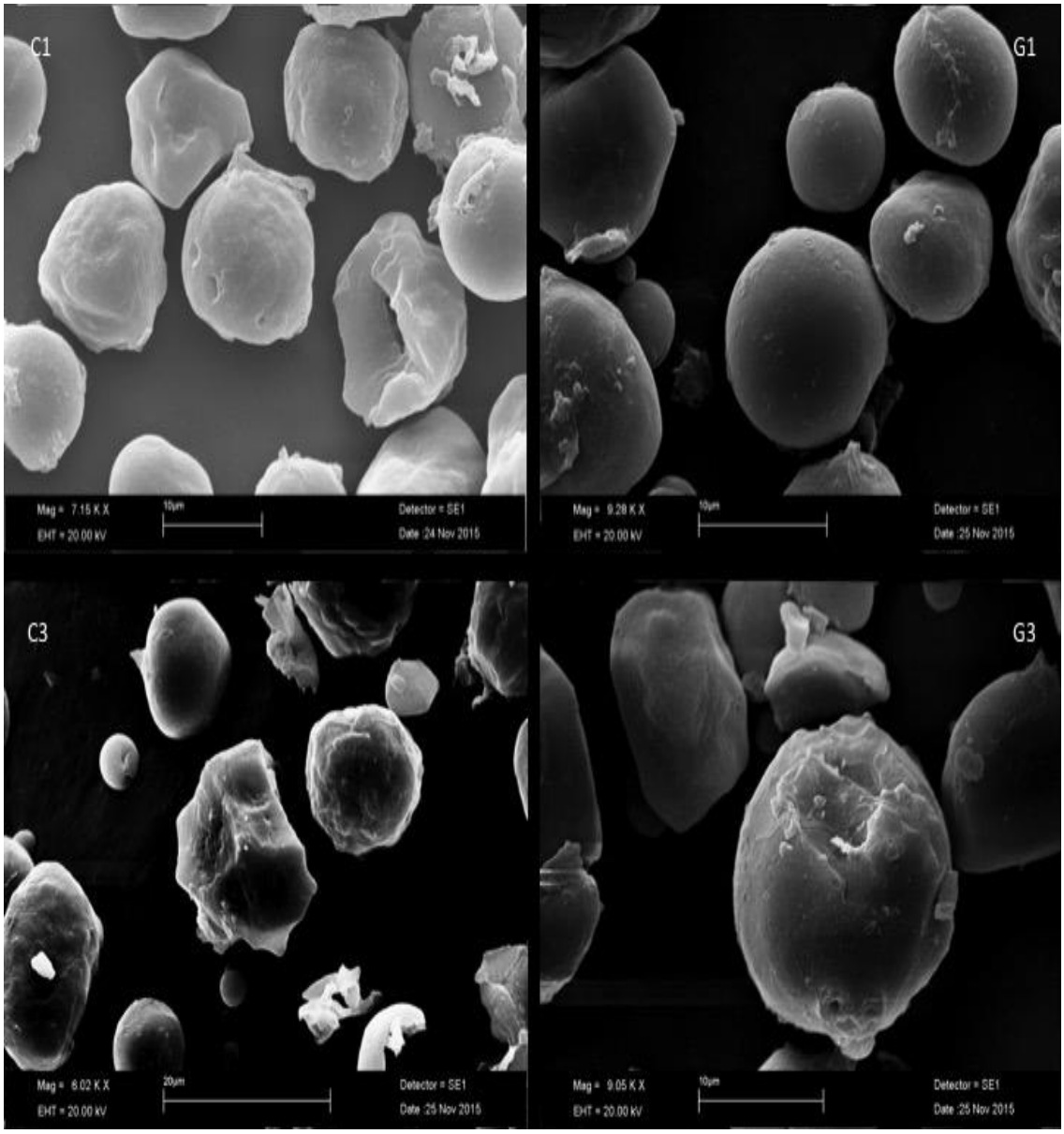


Figura 13: Microscopia eletrônica de varredura (MEV), imagens dos grânulos de amido nativo e hidrolisado das cultivares C1, G1, C3 e G3 no tempo 24.

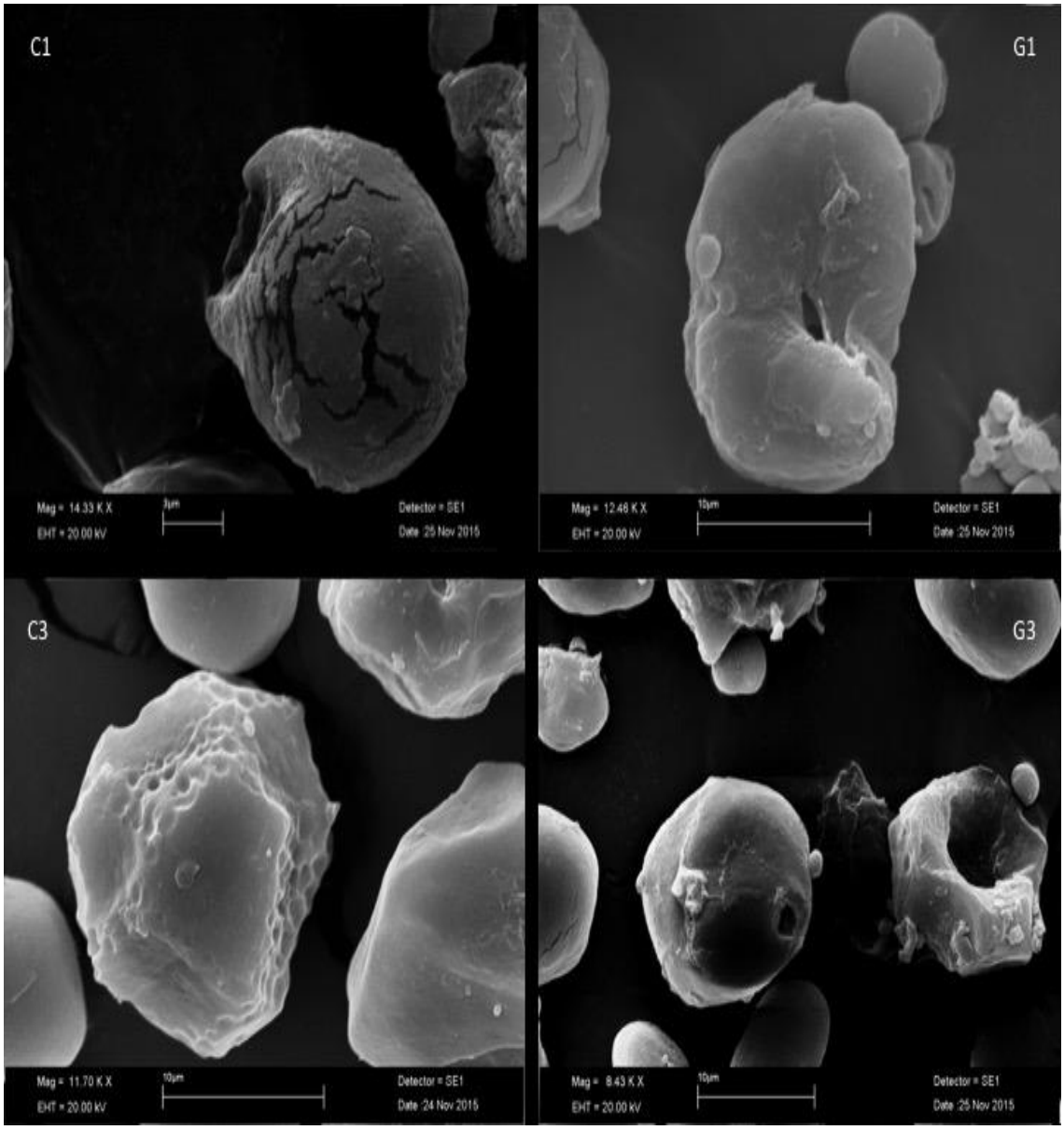


Figura 14: Microscopia eletrônica de varredura (MEV), imagens dos grânulos de amido nativo e hidrolisado das cultivares C1, G1, C3 e G3 no tempo 48.

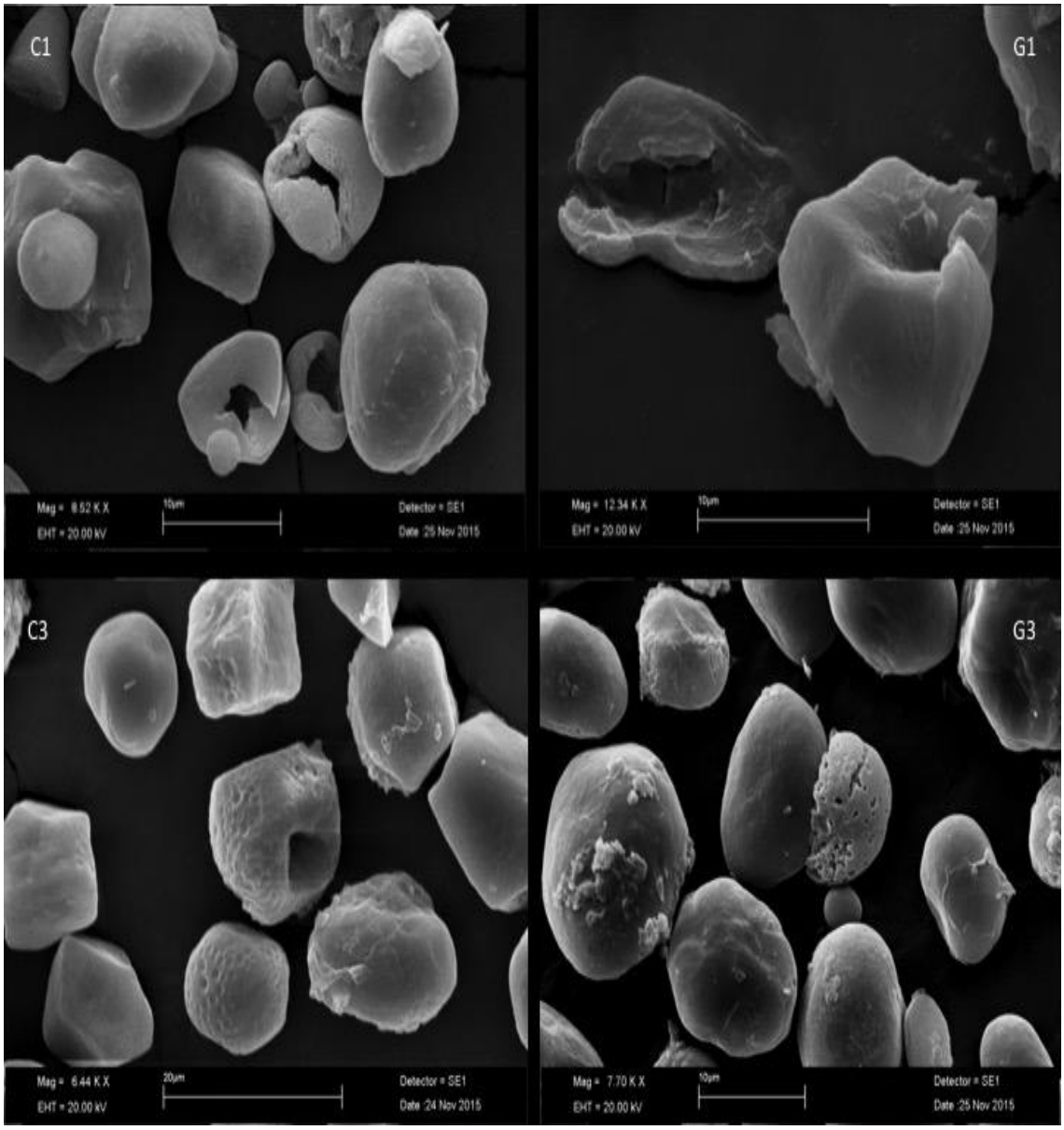


Figura 15: Microscopia eletrônica de varredura (MEV), imagens dos grânulos de amido nativo e hidrolisado das cultivares C1, G1, C3 e G3 no tempo 72.

Por sua vez, no tempo 72 h, (Figura 15) foram observados grânulos de amido com estruturas distintas quando comparados com 0 h (Figura 10). Pode-se observar a presença de orifícios internos formando cavernas, bem como grânulos fragmentados, produto da ação das enzimas amilolíticas. Segundo Smith et al. (2005), a α-amilase é considerada a responsável por atacar o grânulo de amido e iniciar a hidrólise no endosperma de cereais germinados. Uma característica comum de ataque enzimático por α e β amilase são mostrados por Zhang & Oates (1999), que observaram amidos de cereais com superfícies porosas como sendo mais susceptíveis à hidrólise enzimática.

5.8 ELETROFORESE SDS-PAGE

A extração de proteínas para uso no gel de eletroforese em condições dissociantes (SDS-PAGE) é uma etapa fundamental nos estudos proteômicos, pois sua eficiência depende da ruptura da estrutura celular por métodos mecânicos e químicos, para a exposição das proteínas ao meio, eliminação de interferentes, além de permitir a quebra das pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, evitando agregações indesejáveis e formação de estruturas secundárias (GÖRG; WEISS; DUNN, 2004).

A análise do perfil proteico por SDS-PAGE das amostras nos tempos 0 e 72 horas dos ensaios revelou alterações já esperadas nas sementes germinadas em relação ao início com o grão inteiro. Deve-se destacar que as radículas emergentes durante a germinação foram excluídas nas etapas de extração proteica, restando apenas as sementes remanescente. A Figura 16 expõe, em quatro géis, as diversas corridas para comparação e identificação de bandas proteicas nas amostras deste trabalho. Nesta etapa a extração foi realizada com tampão de extração 62,5 Tris-HCl, pH 6,8, contendo SDS 2%, β-mercaptoetanol (2-ME) 5% (Laemli, 1970). As alterações nos perfis após a germinação evidenciam a diminuição de intensidade, ou até o desaparecimento, de diversas bandas, como as de cerca de 35 KDa, comparativamente às proteínas que se mantém estáveis após 72 h do início da germinação, como as duas bandas entre 90 e 97 KDa, e uma de ~45 KDa, podendo ser proteínas constitutivas, que permanecem estáveis aos processos de metabolização e síntese de novas proteínas e enzimas, que irão compor as radículas e plântulas.

Pela eletroforese é possível constatar a semelhança nos perfis das amostras convencionais e suas correspondentes GM: C1 e G1 são semelhantes em ambos os tempos de germinação do mesmo modo que C3 e G3, porém distintas das anteriores. Neste último conjunto de amostras é notada a ausência, ou baixa expressão, da banda proteica de ~60 KDa, o que torna evidente que as introduções de genes nas amostras GM não afetam os perfis proteicos destas variedades estudadas, podendo as diferenças serem atribuídas às linhagens de cada variedade. Este comportamento foi igualmente notado em variedades distintas de sementes de soja convencional e GM estudadas em nosso laboratório (BACKES, 2011). No caso de soja, as diferenças nos perfis proteicos são ainda menores em função de sua característica autógama, enquanto o milho além de alógamo é também hibrido em suas linhagens comerciais, o que aumenta a possibilidade de expressão proteica distinta entre isolinhas não-GM.

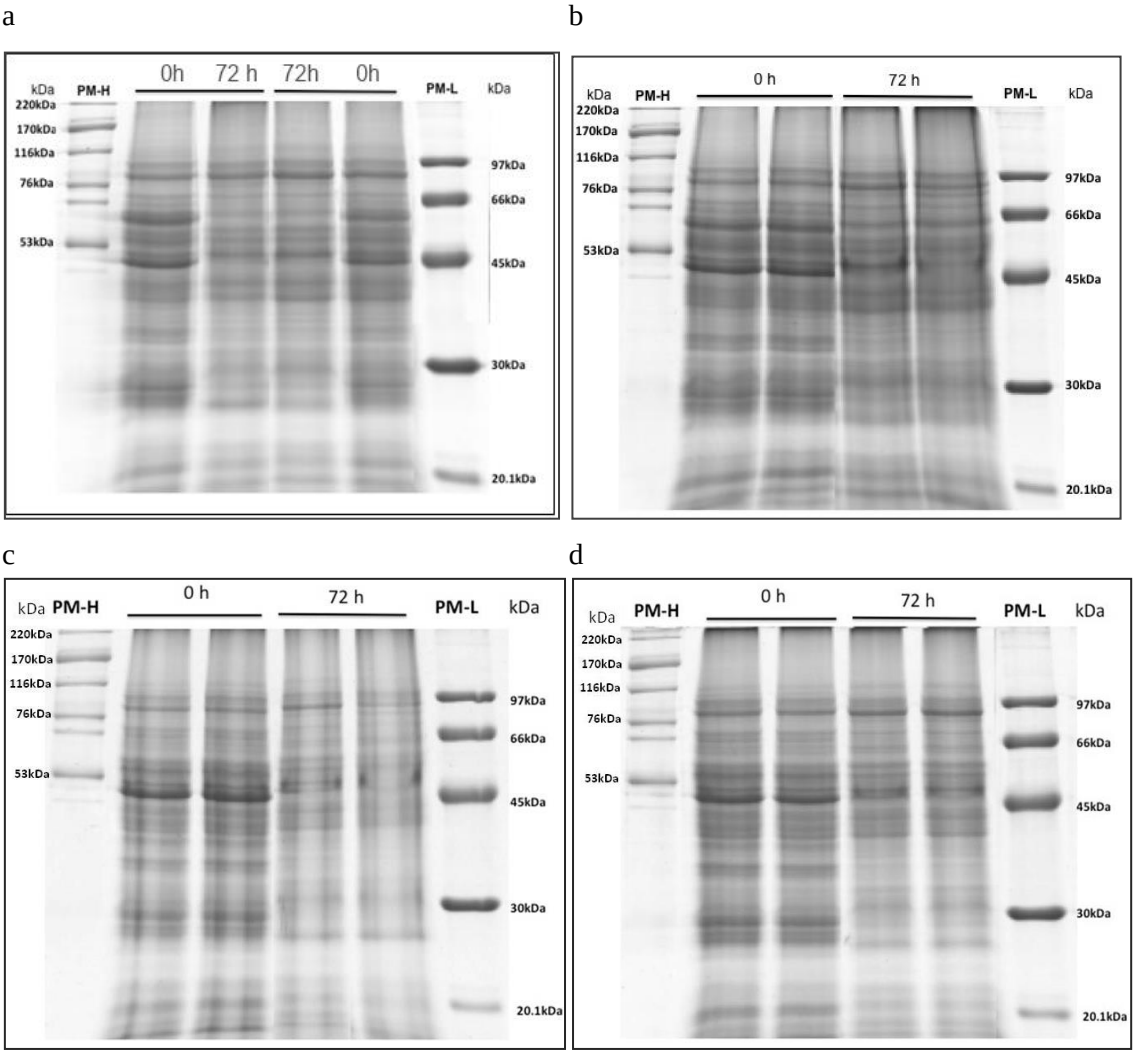


Figura 16: Géis de poliacrilamida 12,5% das variedades de milho convencionais genitoras e GM, com amostras tomadas no início da germinação (0h) e após 3 dias (72h), com 25 µg de proteínas por raia. PM = padrões de peso molecular de 20 a 220 kDa. a. C1; b. G1; c. C3; d. G3

Em nova extração com tampão contendo fenol, indicado para estudos proteômicos, foram confirmados os resultados acima, quanto ao comportamento das bandas proteicas, antes e após a germinação, porém com melhor resolução de algumas proteínas.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no trabalho sobre o estudo de milhos geneticamente modificados com seus respectivos genitores convencionais, pode-se concluir que:

1. A composição química nas quatro cultivares não apresenta diferenças significativas em suas diversas frações, ou seja, mantem-se a equivalência substancial entre as amostras convencionais e geneticamente modificadas;
2. Os testes de vigor e germinação tem maior sensibilidade em demonstrar, ou predizer, o desempenho das sementes de milho apresentando valores estatisticamente iguais sob condições e ambiente controlados;
3. Há uma tendência de aumento na atividade da α-amilase na amostra G1 e β-amilase em ambas cultivares GM;
4. Os perfis de proteínas apresentam diferenças nos tempos 0 e 72 h após embebimento, porém sem distinção entre os pares de amostras convencionais e transgênicas, C1 e G1 ou C3 e G3, evidenciando a variabilidade entre as sementes parentais;
5. É possível afirmar que não há diferenças que limitem o uso dos milhos GM em processos fermentativos, reafirmando seu caráter de segurança.

7. REFERÊNCIAS

ALVES, J.D.; MAGALHÃES, M.M.; GOULART, P.F.P.; DANTAS, B.F.;GOUVÊA, J.A.; PURCINO, R.P.; MAGALHÃES, P.C.;FRIES, D.D.; LIVRAMENTO, D.E.; MEYER, L.E.; SEIFFERT, M.; SILVEIRA, T. Mecanismos de tolerância da variedade de milho "Saracura" (BRS4154) ao alagamento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, n.1, p-42-53, 2002.

ANDREOLI, C.; ANDRADE, R.V.; ZAMORA, S.A.; GORDON, M. Influencia da germinação da semente e da densidade de semeadura no estabelecimento do estande e na produtividade de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.24, n.2, p. 1-5, 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists**. 16.ed. Arlington. Cap.33. p.10-12, 1995.

BACKES S. **Análise protômica de variedades convencionais e geneticamente modificadas de soja (*Glycine max*) visando proteínas bioativas.** São Paulo, 2011. 136p. Tese (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

BASSINELLO, P.Z.; NAVES, M.M.V**. Bioquímica e saúde humana**. In: SANTOS, A.B. dos; STONE, L.F.; VIEIRA, N.R. de A. A cultura do arroz no Brasil. 2.ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. p.31-51.

BEZUTI, C. G. **Avaliação *in vivo* da qualidade protéica da soja Geneticamente modificada.** São Paulo, 2004. 88p. Tese (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

BEWLEY, J.D. & BLACK, M. **Seeds. Phyisiology of development and germination.** New York: Plenum Press. 1985. 367p.

BORGES ET AL., 2011 G.DA S.C. BORGES, F.G.K. VIEIRA, C. COPETTI, L.V. GONZAGA, R.C. ZAMBIAZI, J.M. FILHO, R. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of Jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. **Food Research International**, v.44, p. 2128–2133, 2011.

BORZANI, W. AQUARONE, E. & LIMA, U. A. **Biotecnologia: Tecnologia das Fermentações.** Vol. 01. 3ª Reimpressão. Ed. Edgard Blucher Ltda. São Paulo – SP. 1986, 304 p.

BUCKERIDGE, M.S.; TINÉ, M.A.S.; SANTOS,H.P.; LIMA,D.U Polissacarídeos ded reserva de parede cellular em sementes. Estrutura , metabolismo funções e

aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v.12 (edição especial), p.136-162, 2000.

BULÉON, A. et al. Starch granules: structure and biosynthesis. Mini review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, n. 2, p. 85-112, 1998.

CALDARELLI, C.E; BACCHI, M. R. P. **Fatores de influência no preço do milho no Brasil.** Nova Economia, Belo Horizonte, v.22 n.1, p. 141-162, 2012.

CASTRO, V. A. **Avaliação de equivalência substancial e potencial de alergenicidade de cultivares de soja tolerantes ao herbicida glifosato**. São Paulo, 2009. 139p. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, 2009.

CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. **Composição quimica de sementes**. In: Sementes, ciência, tecnologia e produção**.** Jaboticabal: FUNEP.. p. 66-97, 2000.

CRAWLEY, M.J.; BROWN, S.L; HAILS, R.S.; KOHN, D.D.; REES, M. Transgenic crops in natural habitats. **Nature**, v.409, p.682-683, 2001.

CEREDA, M.P., coord. **Propriedades gerais do amido**. São Paulo**.** Fundaçao Cargil, v.1, p.224, 2001.

CRUZ, C.D.; CARVALHO, S.P. de; VENCOVSKY, R. Estudos sobre divergência genética: fatores que afetam a predição do comportamento de híbridos. **Revista Ceres**, v.41, p.179-182, 1995.

CTNBio. Informações gerais. **Ministerio de Ciência e Tecnologia**. Disponivel em: http://cib.org.br/. Acesso em Fevereiro de 2016.

DIEZ-RODRIGUEZ, G.I.; OMOTO, C. Herença da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) à lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, v.30, n.2, p.316, 2001.

DONALD, A.M. **Understanding starch structure and functionality**. In: ELIASSION, A.C. (Ed.). Starch In Food: structure, function and aplications. Cambridge: CRC Press, Chap.5, p.1560184, 2004.

EFSA, 2015. Guidance document of the Scientific Panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants containing stacked transformation events. EFSA J. 512, 1–5 <http://www.efsa.europa.eu/EFSA/Scientific_Document/gmo_guidance_ej512_GM_stacked_events_en.pdf>.

ELIASSON, A.C. **Starch in food- Structure, function and applications**. New York: Boca Raton, CRC, 605P, 2004.

EVANS, I. D.; HAESMAN, D. R. Rheological of gelatinized starch suspensions. **Journal of Texture Studies**, 28, 253-257, 1997.

FISCHHOFF, D.A. **Insect-resistant crop plants**, In: PERSLEY, G.J. (ED). Biotechnology and integrated pest management. Wallingford: CAB INTERNATIONAL, Cap.12, p.214-227, 1996.

FINCHER, G.B. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. Annual **Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.** v. 40, p. 305-346, 1989.

FRANCO, C. M. L. et al. Structural and functional characteristics of selected soft wheat starches**. Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 79, p. 243-248, 2002.

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 do Amido. In: Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, **Propriedades Gerais do Amido**. CEREDA, M.P. (coord.). São Paulo: Fundação Cargill, p.224, 2001.

FOGARTY, W. M.; KELLY, C. T.; Starch-degrading enzymes of microbial origin. In: Bull, AH eds. (1979) Progress in Industrial Microbiology. **Elsevier Publ Company**, Amsterdam, pp. 87-150.

GANA, J.A., KALENGAMALIRO, N.E., CUNNINGHAM, S.M., VOLENEC, J.J. Expression of beta-amylase from alfalfa taproots**. Plant Physiol**. V.118, n.4, p. 14950506, 1998.

GEORG-KRAEMER, J.E.; MUNDSTOCK, E. C.; CAVALLI-MOLINA, S. Developmental expression of amylases during barley malting. **Journal of cereal science**, v. 33, p.279-288, 2000.

GODFREY, T.; WEST, S. **Inustrial enzymolohy** (2nd Ed.). London: MacMillan Press Ltd. P. 1996, 341-35.

GORG, A; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomic. **Proteomics**, v. 4, p. 3665-3685, 2004.

GUPTA, R., GIGRAS, P., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V. K., CHAUHAN, B. Microbial α-amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v.38, p.1-18, 2003.

HAGER A. S.; MAKINEN O. E.; ARENDT E. K. Amylolytic activities and starch reserve mobilization during the germination of quinoa**. Eur Food Res Technol**, v. 239, p. 621-627, 2014.

HARGER, C. ; SPRADA, D. ; HIRATSUKA, E. **Amilase Fúngica**. In: Bioquímica das Fermentações, 1982. 56 p.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**, v.45, n.3, p.253-267, 2001.

ILSI (INTERNATIONAL LIFE SCIENCE INSTITUTE), 2009. **Workshop on evaluating biological variation in non-transgenic crops**, November 16-17, Paris, France.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analiticas do Instituto Adolfo Lutz**. Metodos fisicos e quimicos para analyses de alimentos. 4. Ed. Brasilia: ANVISA, p. 98-99, 2005a.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analiticas do Instituto Adolfo Lutz**. Metodos fisicos e quimicos para analyses de alimentos. 4. Ed. Brasilia: ANVISA. p. 105-106, 2005b

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analiticas do Instituto Adolfo Lutz**. Metodos fisicos e quimicos para analyses de alimentos. 4. Ed. Brasilia: ANVISA, p. 117-118, 2005c.

JOBLING, S. Improving starch for food and industrial applications. **Currente Opinion in Plant Biology**, v.7, p.210-218, 2004.

KAUR, A.; SINGH, N.; EZEKIEL, R.; SODHI, N. S. Properties of starches separated from potatoes stored under different conditions. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1396-1404, 2009.

KHUSH G. Green revolution: preparing for the 21st century**. Genome** v.42, p.646–655, 1999.

KOK, E. J., KEIJER, J.; KLETER, G. A.; KUIPER, H. A. Comparative safety assessment of plant-derived foods. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v.50, p.98–113, 2008.

KOHNO, A., NANMORI, T, SHINKE, R. Purification of β-amylase from alfafa (Medicago sativa L.) seeds. **Journal of Biochemistry**, v.105, n.2, p.231-233, 1989.

KRZYZANOWSKI, F.C., VIEIRA, R.D., FRANÇA-NETO, J.B. **Vigor de sementes: Conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

KUNZE, W. **Technology brewing and malting**. **Research and teaching institute of brewing**, 1996. Disponível em: < http://www.vlbberlin.org/english/kunze/enzym.htm>.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, V. 227, p. 680-685, 1970.

LEADLAY, P.F. **An Introduction to Enzyme Chemistry**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1993. 82p.

LII, C. Y.; TSAI, M. L.; TSENG, K. H. Effect of amylose content of the rheological properties of Rice starch. **Cereal Chemistry**, v. 73, p. 415-420, 1996.

LOBO A. R.; FILHO, J. M.; ALVARES, E. P.; COCATO, M. L.; COLLI, C.; Effects of dietary lipid composition and inulin-type fructans on mineral bioavailability in growing rats. **Journal of Nutrition**, v. 25, pp. 216–225, 2009.

LOVEGROVE, A.; HOOLEY, R. Gibberellin and abscisic acid signaling in aleurone. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, p. 102-110, 2000.

MARCOS FILHO, J. **Pesquisa sobre vigor de sementes de hortaliças**. Informativo ABRATES, Londrina, vol 11, n.3, p.63-75, 2001.

MARTINELLI-SENEME, A; MARTINS, C.C.; CASTRO, M.M.; NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, J. Avaliação do vigor de sementes peliculizadas de tomate. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 26, p. 1-6, 2004.

MARTINS, C.C.; MARTINELLI-SENEME, A; CASTRO, M.M.; NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, C. Comparação entre metodos para avaliação do vigor de lotes de sementes de couve-brócolis. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 96-101, 2002.

MARTINS, C.C.; CASTRO, M.M.; SENEME, A.; NAKAGAWA, J. Metodologia para avaliação do vigor de sementes de tomate. **Horticultura Brasileira de Sementes**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 301-304, 2006.

MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of plants.** Oxford: Pergamon Press, 4ed. p, 270, 1985.

MAYA-AMPUDIA, V.; BERNAL-LUGO, I. Redoxsensitive target detection in gibberellic acidinduced barley aleurone layer. **Free radical biology and medicine**, v. 40, p.1362 –1368, 2006.

MEDCALF, D.G**. Structure and composition of cereal component as related to their potential industrial utilization**. In: Industrial uses of cereal. POMERANS, Y. (ed.). St Paul: American Association of Cereal Chemistry. p.121-160, 1973.

MONTEIRO, F.V.; Nascimento, K.O. do. Associação do consumo do amido resistente na prevenção e tratamento do diabetes mellitus tipo 2. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 12-19, 2013.

MURALIKRISHNA, G NIRMALA, M. Cereal □-amylase-an overview. **Carbohydrate polymers**, p.1-11, 2005.

MÄKINEN OE, ARENDT EK. At malt as a baking ingredient a comparative study of the impact of oat, barley and wheat malts on bread and dough properties. **J Cereal Sci,** p. 747–753, 2012.

NAKAMINAMI K, SAWADA Y, SUZUKI M, KENMOKU H, KAWAIDE H, MITSUHASHI W, SASSA T, INOUE Y, KAMIYA Y, TOYOMASU T (2003) Deactivation of gibberellin by 2-oxidation during germination of photoblastic lettuce seeds. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 67, p. 1551–1558, 2006.

NONOGAKI, H., BASSEL G. W., BEWLEY, J. D. Germination—Still a mystery. **Plant Science**, v. 179, p. 574-581, 2010.

OLIVEIRA, A.L. et al. Produção de forragem de milho pelo sistema de hidroponia. In**. Anais Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 38, Piracicaba, SBZ. p.268-269, 2011.

PAOLETTI, M. G. AND D. PIMENTEL, "The Environmental and Economic Costs of Herbicide Resistance and Host-Plant Resistance and Host-Plant Resistance to Plant Pathogens and Insects," **Technological Forecasting and Social Change**, v.50, p. 9-23, 2000.

PENFIELD, M. P.; CAMPBELL, A. M. **Experimental food science**. 3rd ed. San Diego: California Academic Press, 1990. p.541.

PEREZ-FERNANDEZ J, et al. (2005) The acidic protein binding site is partially hidden in the free Saccharomyces cerevisiae ribosomal stalk protein P0. **Biochemistry** 44(14):5532-40.

PEREZ, S. BERTOFT, E. the Molecular Structures of Starch Components : A comprehensive Review**. Starch**, vol.62, p.389-420, 2010.

RILEY, C. K.; WHEATLEY, A. O.; ASEMOTA, H. N. Full length research paper isolation and characterization of starches from eight Dioscorea alata cultivars grown in Jamaica. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 17, p. 1528-1536, 2006.

ROOD, S. B. & LARSEN, K. M. Gibberellins, amylase, and the onset of heterosis in maize seedlings. **Journal of Experimental Botany**, v.39, n.199, p.223-33, 1988.

RUEBELT, M. C.; LEIMGRUBER, N. K.; LIPP, M.; REYNOLDS, T. L.; NEMETH, M. A.; ASTWOOD, J. D.; ENGEL, K. H.; JANY, K. D. Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. Assessing analytical validation. **J. Agric. Food Chem**, v.54, p.2154–2161, 2006.

SANTANA, J. C. C. (2003), **Recuperação das enzimas a e b-amilases em sistema bifásico aquoso PEG/ CaCl2 para uso como biocatalizador amiláceos**. MSc Thesis, School of Chemical Engineering, Campinas, SP, Brazil.

SATIN M. **Functional properties of starches Chief, Agro-Industries and post harvest management service**, FAO, Italy, www.fao.org/ag/AGS/agsi/starch.2006.

SHAHNOOR S. SHAEK; MASSIMILIANO CARCIOFI; HELLE J. MARTENS; KIM H. HEBELSTRUP; ANDREAS BLENNOW. Starch bioengineering affects cereal grain germination and seedling establishment. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 65, No. 9, pp. 2257–2270, 2014.

SHAEK, S. S.; CARCIOFI, M.; MARTENS, H. J.; HEBELSTRUP H. K.; BLENNOW, A. Starch bioengineering affects cereal grain germination and seedling establishment. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 65, No. 9, pp. 2257–2270, 2014.

SING, N.. SINGH, J.; KAUR, L.; SODHI, N. S.; GILL, B. S. Review: morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v. 81, p. 219-231, 2003.

SNIFFEN, C. J., J. B. RUSSELL, AND P. J. VAN SOEST. 1983. The influence of carbon source, nitrogen source and growth factors in rumen microbial growth. **Proc. Cornell Nutr**. Conf. p 26. Ithaca, NY.

SMITH, A. M.; ZEEMAN, S. C.; SMITH, S. M. Starch Degradation. **Annual Review of and Plant Molecular Biology**, v. 56, p. 73-98, 2005.

SMITH P. K.; KROHN R. I.; HERMANSON G. T.; MALLIA A. K.; GARTNER F. H.; PROVENZANO M. D.; FUJIMOTO E. K.; GOEKE N. M.; OLSON B. J.; KLENK D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem**. v. 150, 76-85, 1985.

TAKIZAWA, F. F. et al. Characterization of tropical starches modified with potassium permanganate and lactic acid. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 6, p. 921-931, 2004.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Review: Starch Composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**, v. 39, p. 151-165, 2004.

TEKRONY, D.M. **Precision is na essential component in seed vigour testing**. Seed Science and Technology, Zurich, v.31, n.2, p. 435-447, 2003.

UTRILLA-COELLO, R. G.; E. AGAMA-ACEVEDO, A. P. BARBA DE LA ROSA, J. L. MARTÍNEZ-SALGADO, S. L. RODRÍGUEZ-AMBRÍZ, and L. A. BELLO-PÉREZ. 2009. Blue maize: morphology and starch synthase characterization of starch granule. **Plant Foods for Human Nutrition**. v.64, p.18-24, 2009.

USDA - United States Department of Agriculture. World Agricultural Supply and Demand Estimates 2014. Disponivel em <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdquery.aspx>. Acesso em 10 fev. 2015

VAN DER MAAREL, M. J. E. C., VAN DER VEEN, B., UITDEHAAG, J.C.M., LEEMHUIS, H., DIJKHUIZEN, L., Properties and applications of starch converting enzimes of the α-amilase family, **Journal of Biotechnology**, v. 94, p. 137-155, 2002.

VARNER, J.E.; RAM-CHANDRA, G. CHRISPEELS, M.J. **Journal of Cell Composition and Physiology**, v.66 (supplement), p.55-60, 1965.

VILES, F. J.; SILVERMAN, L. Determination of starch and cellulose with anthrone. **Analytical Chemistry**, v. 21, p. 950 – 953, 1949.

XIE Z.; ZHANG, S.; HANZLIK, E. ; SHEN Q. J.; Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid-inducible WRKY gene. **Plant molecular biology**, v. 64, p. 293-303, 2007.

ZAMSKI, E. Transport and accumulation of carbohydrates in developing seeds:the seed as a sink. In: **Seed development and germination**. KEIGEL, J. & GALILI, G. (eds.). New York: Marcel Decker. p.139-162. 1995.

ZEIGLER, P. . In: **Seed development and germination**. KEIGEL, J. & GALILI, G. (eds.). New York: Marcel Decker. p.139-162,1995.

ZHANG, T.; OATES, G. C. Relationship between α-amylase degradation and physicochemical properties of sweet potato starches. **Food Chemistry**, v. 65, p. 157-163, 1999.

ANEXOS OBRIGATÓRIOS