

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

COMPOSIÇÃO E VALOR BIOLÓGICO DAS PROTEÍNAS
DE QUATRO VARIEDADES DE MILHO (*Zea mays* L.)
EM DOIS ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO.

Jlana Schonhaus
Farmacêutica - Bioquímica

ORIENTADOR: Prof. Dr. Valdemiro C. Sgarbieri

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia
de Alimentos e Agrícola da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título
de Mestre em Ciências de Alimentos.

CAMPINAS
1980

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Valdemiro C. Sgarbieri por sua orientação dedicada e amiga.

A Tânia Maria Haddad, Adelaide Maria S. Costa, Maria Emília Correa, Keiko Kamikoga, Doraci Helena Durigon, Maria Silvia De Santi, Rosa Maria T.A. Tosello e Maria Isabel R. Rocha pela amizade e auxílios prestados durante este trabalho.

Aos funcionários da biblioteca, Angelina F. de Godoy, Olivaldo B. Filho, Araci A.F. Pires e Creusa K. Nomura, pela paciência e carinho com que sempre me atenderam.

A Fátima Aparecida de Almeida pelos trabalhos de datilografia e Clóvis A. Garcia pelas ilustrações.

A todos os funcionários e professores que estiveram presentes sempre que solicitados.

Aos Professores William J. da Silva e Jaime Amaya-Farfán pelas oportunas sugestões e ao Professor Leopold Hartman pela redação em ingles.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

Aos meus amigos Lúcia, Izauda, Roberto, Terezinha, Carlos e Tania e às Professoras Maria Antonia M. Galeazzi e Lúcia Maria V. Soares pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

A meus pais e a meu irmão pelo seu amor.

A Orlando, companheiro e amigo, por ter acreditado em mim.

ÍNDICE GERAL

SUMMARY	1
RESUMO	4
INTRODUÇÃO	7
REVISÃO DA LITERATURA	
Estudo comparativo da composição e valor nutricional	10
Influência de fatores genéticos e ambientais na composição e valor nutritivo	11
Genes que afetam a síntese de proteína do endosperma	12
Genes que afetam a síntese de carboidratos do endosperma	16
Duplo-mutantes com alteração na síntese de carboidratos e proteínas do endosperma	18
Extração e fracionamento das proteínas	20
Proteínas salino-solúveis	21
Prolaminas	23
Glutelinas	25
MATERIAIS E MÉTODOS	
Preparo das amostras	28
Determinações realizadas	
Umidade	29
Nitrogênio total e proteína	29
Extrato etéreo	29
Cinza	29
Fibra bruta	30
Carboidratos totais	30

Determinação das porcentagens de casca, germe e endosperma e do teor de proteína de cada parte	30
Extração fracionada das proteínas das farinhas de milho integral	30
Isolamento das proteínas dos extratos	30
Determinação da composição em aminoácidos	31
Determinação de triptofano	31
Ensaaios biológicos	33
Preparo das dietas	33
RESULTADOS	
Composição centesimal	37
Porcentagem de casca, germe, endosperma e teor de proteína	37
Composição em aminoácidos das farinhas de milho	40
Extração fracionada das proteínas	40
Composição em aminoácidos das frações protéicas isoladas	45
Propriedades nutricionais	51
DISCUSSÃO	
Interação genotípica, estrutura e composição	56
Proporções relativas das diferentes frações protéicas	61
Variação na composição de aminoácidos das frações protéicas	65
Valor nutritivo	72
CONCLUSÕES	76
BIBLIOGRAFIA	77

ÍNDICES DE QUADROS E FIGURAS

QUADROS

I. Esquema da extração fracionada das proteínas de milho	32
II. Composição centesimal das dietas utilizadas nos ensaios biológicos	34
III. Composição centesimal da mistura salina utilizada nas dietas	35
IV. Composição da mistura vitamínica utilizada nas dietas	36
V. Composição centesimal de quatro variedades de milho em dois estágios de maturação	38
VI. Porcentagem de casca, germe e endosperma do grão de quatro variedades de milho, em dois estágios de maturação, e teor de proteína de cada parte	39
VII. Composição em aminoácidos das farinhas de quatro variedades de milho em dois estágios de maturação	41
VIII. Extração fracionada das proteínas de quatro variedades de milho	43
IX. Composição em aminoácidos das frações proteícas isoladas do milho Maya Normal em dois estágios de maturação	46
X. Composição em aminoácidos das frações proteícas isoladas do milho Doce Piramex em dois estágios de maturação	47

XI. Composição em aminoácidos das frações protéicas isoladas do milho Maya Opaco em dois estágios de maturação	48
XII. Composição em aminoácidos das frações protéicas isoladas do milho Nutrimaiz em dois estágios de maturação	49
XIII. Propriedades nutricionais das proteínas de quatro variedades de milho em dois estágios de maturação	52
XIV. Ganho médio de peso de ratos submetidos a dietas contendo farinha de quatro cultivares de milho, em dois estágios de maturação, comparados com a dieta padrão de caseína	55

FIGURAS

1. Gráfico de barras das diversas frações protéicas de quatro cultivares de milho em dois estágios de maturação	44
2. Proporções relativas dos aminoácidos essenciais e da relação Leu/Ile nas frações protéicas de quatro cultivares de milho em dois estágios de maturação	50
3. Curva de crescimento dos ratos em dietas contendo caseína e farinha de milho, de quatro cultivares em dois estágios de maturação, como única fonte de proteína	53

SUMMARY

The principal aim of the present work was a comparative chemical and nutritional study of four varieties of corn in two stages of maturation: green (20 days after pollination) and dry.

The four varieties studied are characterized by the following endosperm genotypes with respect to carbohydrates and protein: Normal Maya (SuO_2); Sweet Piramex (suO_2); Opaque Maya (Suo_2) and Nutrimaiz or Sweet-Opaque (suo_2).

The chemical investigation involved determinations of percentual composition, variation in the content of the main structural components, amino acid composition of the protein fractions and of the whole flour. The results indicated that there are a marked modification of the grain composition during maturation and that the differences between the varieties are conditioned by the respective genotypes.

Considerable variations were observed in the percentual compositions of the four varieties. Non protein nitrogen, ash, and fiber decreased with maturation whereas the lipid content increased. The Sweet Piramex and Nutrimaiz showed 8.0 and 9.3% of lipid, respectively, in the dry stage of maturation, against 5.0 and 6.4 for the Normal Maya and Opaque Maya.

Fractional extraction of proteins disclosed a similar behaviour of varieties with respect to endosperm genotypes, that is, a similarity exists between Normal Maya and Sweet Piramex (O_2) and between Opaque Maya and Nutrimaiz (o_2) regarding variation of the contents of different protein fractions, during the maturation process. All varieties showed a greater content

of saline-soluble proteins (albumins and globulins) in the green stage, their concentration being greater in Nutrimaiz and Opaque Maya, but diminishing with maturation. The variations observed were: 58.2 to 16.0; 56.1 to 21.0; 60.7 to 40.1 and 69.8 to 49.6% in the varieties Normal Maya, Sweet Piramex, Opaque Maya and Nutrimaiz, respectively. On the other hand, the zein fraction varied from 16.4 to 40.0% and from 14.9 to 37.2% in Normal Maya and Sweet Piramex for green and dry stages of maturation, compared with 8.0 to 10.8% for Opaque Maya and 5.1 to 6.0% for Nutrimaiz. Opaque Maya and Nutrimaiz contained in the dry stage 25.8 and 29.8% of glutelin 3, whereas Normal Maya and Sweet Piramex contained 14.0 and 18.0%, respectively.

Each protein fraction had a characteristic composition; the albumin, globulin and glutelin 3 presenting a better amino acid pattern. Thus Nutrimaiz and Opaque Maya flours showed a more favourable composition in any maturing stage than the remaining varieties. The main deficiencies found in the composition of Normal Maya and Sweet Piramex are related to the essential amino acids lysine (2.4 and 2.7%) and triptophan (0.4 and 0.4%, respectively) whereas in both Opaque Maya and Nutrimaiz lysine accounted for 4.6% and triptophan for 1.2 and 0.9%. The leucine/isoleucine ratio is much higher in the Maya Normal (5.3) and Sweet Piramex (4.7) as compared with that of Opaque Maya (3.3) and Nutrimaiz (3.2) which results in lower nutritional quality for the first two varieties.

Nutritional evaluation was done by PER and nitrogen balance determinations. The PER dropped on maturation from 1.9 to 1.2 for the Maya Normal and 2.0 to 1.4 for the Sweet Piramex whereas it remained practically constant, around 2.6, for the

Maya Opaque and Nutrimaiz. These values shall be compared with 2.9 for the casein diet. The biological value dropped from 70%, in the green stage, to 50.8 and 55% in the mature (dry) stage for the Maya Normal and Sweet Piramex, respectively. For Nutrimaiz and Maya Opaque the biological value remained essentially constant around 74%. Regarding the growth promoting capacity in rats, statistic studies showed that there was no significant difference between the varieties Opaque Maya and Nutrimaiz compared with casein, whereas Sweet Piramex and Normal Maya showed, in relation to casein, significant difference at 5% level in the green stage and at 1% level in the dry stage.

This leads to the conclusion that the Nutrimaiz and Maya Opaque were superior to the Normal Maya and Sweet Piramex in both stage of maturation. The double mutant Nutrimaiz inherited the favourable characteristics of the paternal genes, which confers on it a better chemical composition than that of the ancestral varieties, thus, originating a variety of more favourable protein composition. It contains, in addition, sugars of better quality and a higher percentage of oil. These characteristics ensure to Nutrimaiz nutritional properties equal or superior to those of Maya Opaque, offering prospects of a greater consumption of corn in its natural or processed form.

Os principais objetivos deste trabalho foram concentrados no estudo comparativo químico e nutricional de quatro variedades de milho em dois estágios de maturação: verde (20 dias após polinização) e seco.

As quatro variedades estudadas são caracterizadas pelos seguintes genótipos de endosperma para carboidratos e proteínas: Maya Normal (SuO_2); Doce Piramex (suO_2); Maya Opaco (Suo_2) e Nutrimaiz ou Doce-Opaco (suo_2).

O estudo químico envolveu determinações da composição centesimal, variação no teor dos principais componentes estruturais, extração fracionada das proteínas, composição em aminoácidos das frações protéicas e da farinha integral. Os resultados indicaram que ocorreram modificações profundas na composição do grão com o amadurecimento e que as diferenças entre variedades são condicionadas pelos respectivos genótipos.

Em relação à composição centesimal observou-se nas quatro variedades consideráveis variações com a maturação. As porcentagens de nitrogênio não protéico, de fibra e de cinza diminuíram, enquanto que o teor de lípide aumentou nas quatro variedades. Os milhos Doce Piramex e Nutrimaiz apresentaram 8.0 e 9.3% de lípide, respectivamente, no estágio seco, contra 5.0 e 6.4% para as variedades Maya Normal e Maya Opaco.

A extração fracionada das proteínas revelou um comportamento similar entre as variedades cujos genótipos dos endospermas são semelhantes para proteínas, ou seja, entre o Maya Normal e o Doce Piramex (O_2) e entre o Maya Opaco e o Nutrimaiz (o_2). Todas as variedades apresentaram maior teor de proteínas

salino-solúveis (albuminas mais globulinas) no estágio verde, em maior concentração no Nutrimaiz e no Maya Opaco, sendo que estas diminuíram com o amadurecimento. As variações registradas foram: 58,2 a 16,0; 56,1 a 21,0; 60,7 a 40,1 e 69,8 a 49,6% para as variedades Maya Normal, Doce Piramex, Maya Opaco e Nutrimaiz, respectivamente. Por outro lado, a fração zeína variou de 16,4 a 40,0% e de 14,9 a 37,2% no Maya Normal e no Doce Piramex, nos dois estágios de maturação, em comparação com o Maya Opaco, 8,0 a 10,8% e o Nutrimaiz, 5,1 a 6,0%. O Maya Opaco e o Nutrimaiz apresentaram, no estágio seco, 25,8 e 29,8% de glutelina 3, respectivamente, em contraste com 14% no Maya Normal e 18% no Doce Piramex.

Cada fração protéica revelou uma composição característica, sendo que as frações albumina, globulina e glutelina 3 apresentaram melhor perfil aminoacídico. Assim, as farinhas das variedades Nutrimaiz e Maya Opaco apresentaram uma composição mais favorável que as demais, nos dois estágios de maturação. As principais deficiências encontradas na composição das proteínas dos milhos Maya Normal e Doce Piramex referem-se aos aminoácidos essenciais lisina (2,4 e 2,7%, respectivamente) e triptofano, 0,4%. Para o Maya Opaco e para o Nutrimaiz, a concentração de lisina na proteína foi de 4,6% e para o triptofano 1,2 e 0,9%. A relação leucina/isoleucina, no estágio seco, é também muito alta no Maya Normal e no Doce Piramex contribuindo para as qualidades nutricionais inferiores dessas variedades em relação ao Maya Opaco e ao Nutrimaiz.

A avaliação nutricional foi feita pela determinação de PER e de balanço de nitrogênio. Os valores de PER caíram com a maturação de 1,9 para 1,2 no Maya Normal e de 2,0 para 1,4 no

Doce Piramex, enquanto que permaneceu praticamente constante, em torno de 2,6, no Maya Opaco e no Nutrimaiz. Esses valores de verão ser comparados com 2,9 para a dieta de caseína. O valor biológico caiu de 70%, no estágio verde, para 50,8 e 55% no estágio seco, no Maya Normal e Doce Piramex, respectivamente. Para o Nutrimaiz e para o Maya Opaco o valor biológico permaneceu constante em torno de 74%.

Em relação à capacidade de promover crescimento em ratos, estudos estatísticos demonstraram que não houve diferença significativa entre as variedades Maya Opaco e Nutrimaiz em relação ao padrão caseína, enquanto as variedades Doce Piramex e Maya Normal apresentaram diferença significativa a nível de 5% no estágio verde e 1% no estágio seco em relação ao padrão.

Assim, concluímos que as variedades Nutrimaiz e Maya Opaco são nutricionalmente superiores ao Maya Normal e ao Doce Piramex nos dois estágios de maturação, sendo que o duplo-mutante Nutrimaiz herdou as características favoráveis dos genes paternos, constituindo-se numa variedade que apresenta uma composição protéica mais favorável, além de conter açúcares de melhor qualidade e maior teor de óleo. Estas características conferem ao Nutrimaiz propriedades nutricionais iguais ou superiores ao Maya Opaco, oferecendo uma alternativa favorável em relação a um maior consumo de milho "in natura" ou processado.

INTRODUÇÃO

O milho (Zea mays, L) é uma planta herbácea monocotiledônea, monóica, pertencente à família das gramíneas.

O milho é originário do México e América Central, onde era cultivado na época do descobrimento, tendo sido um dos alimentos básicos das antigas civilizações Maya, Azteca e Inca, que povoaram o hemisfério ocidental. É um cereal muito difundido e sua rápida aceitação se deve ao fácil cultivo, bom rendimento, às variadas formas de consumo e paladar muito apreciado pelos brasileiros e outros povos que o consomem regularmente. É provavelmente a espécie botânica de maior diversificação natural, desenvolvendo-se em regiões e condições as mais diversas, como ao nível do mar ou nos Andes peruanos, em diferentes condições de índice pluviométrico, desenvolvendo-se bem tanto nos verões curtos (como do Canadá) como nos trópicos colombianos.

Atualmente, o milho é o alimento vegetal básico da maioria dos povos americanos (principalmente dos subdesenvolvidos) e sul-africanos. Em alguns países da América Central seu consumo diário chega a 350g/dia/pessoa, suprimindo mais de 50% da ingestão diária de calorias e proteínas (Bressani, 1972), o que lhe confere importância nutricional apreciável. Em todos os lugares seu consumo é maior na área rural do que nos centros urbanos, onde seu cultivo é de subsistência. Nos países desenvolvidos o milho é consumido em larga escala como fonte de proteína e energia em nutrição animal.

O Brasil é um dos maiores produtores de milho do mundo e no período compreendido entre 1970-76 a produção nacional teve um grande aumento, sendo que em 1975 o Brasil foi o 2º pro

dutor mundial, mantendo-se nesta posição até 1978 (FAO, 1978), superado apenas pelos EUA. Dados do IBGE (1978) indicam que o Brasil produziu, neste ano, 13.533.000 toneladas de milho em grãos, o que significa mais da metade de toda a produção sul-americana no mesmo período, embora este valor representasse menos do que 10% da produção norte-americana (FAO, 1978).

O consumo de milho no Brasil vem aumentando, principalmente para suprimento da alimentação animal. Nos centros urbanos tem havido diminuição do consumo dos produtos derivados de milho, principalmente entre as populações de renda mais elevada, com exceção do óleo.

O milho, apesar de ser um alimento importante como fonte de calorias, tem baixo valor nutricional, devido a sua deficiência em alguns aminoácidos essenciais, principalmente lisina e triptofano. Este problema foi intensamente pesquisado e, a partir de 1964, com a descoberta do milho Opaco-2, foram obtidos vários mutantes com melhor perfil de aminoácidos. Atualmente as pesquisas se concentram na busca de novos mutantes com maior teor de lisina e melhores características agrônomicas, físicas e industriais.

Recentemente, o Instituto Agronômico de Campinas anunciou a obtenção de uma variedade de milho, denominada Nutrimaiz, resultante do cruzamento de duas variedades, uma do tipo doce e outra do tipo opaco, com características nutricionais e levadas. Os trabalhos para seleção de tipos com melhores características agronômicas continuaram na Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Genética e Evolução, sob orientação do Prof. W. J. da Silva.

Os objetivos deste trabalho foram concentrados no es

tudo comparativo das proteínas de quatro variedades de milho, geneticamente diferentes, em dois estágios de maturação (verde e seco), sob vários aspectos, a saber: a) variação na composição de proteínas e aminoácidos; b) efeito genético sobre a digestibilidade e valor nutritivo; c) efeitos da interação entre os genes que condicionam os caracteres doce (susu) e opaco (o_2o_2); d) a partir dos resultados obtidos orientar programas de melhoramento e utilização mais racional destas variedades para fins alimentares e/ou industriais.

ESTUDO COMPARATIVO DA COMPOSIÇÃO E VALOR NUTRICIONAL

A composição química do milho varia de acordo com o tipo de semente, solo, qualidade do fertilizante utilizado, condições climáticas e estágio de maturação.

O milho Normal seco é uma excelente fonte de carboidratos e relativamente pobre em proteínas, além de apresentar outros nutrientes importantes em sua composição, como lipídeos, vitaminas e sais minerais (Earle e col., 1956, Bressani e Conde, 1961, Shukla, 1975). O principal carboidrato encontrado na semente de milho é o amido, que perfaz mais de 70% do grão, composto de 27% de amilose e 73% de amilopectina, sendo, portanto, de alta digestibilidade. Os lipídeos constituem cerca de 5% e são encontrados principalmente no germe (cerca de 80% do total) enquanto o endosperma tem apenas 1% (Weber, 1978, Nilsson e col., 1968). O teor de proteínas está em torno de 10%, localizadas principalmente no endosperma (cerca de 80% do total). A proteína é composta de quatro frações principais classificadas, de acordo com sua solubilidade, em: albuminas (solúveis em água), globulinas (solúveis em soluções salinas diluídas), prolaminas (solúveis em solução aquosa de etanol) e glutelinas (solúveis em soluções diluídas de álcalis ou ácidos).

O principal problema apresentado pela proteína do milho é a deficiência em dois aminoácidos essenciais, lisina e triptofano, decorrente do alto teor da fração prolamina (cerca de 50% da proteína total) que, além de ser deficiente nestes dois aminoácidos, é de baixa digestibilidade para os animais mo

no gástricos, tornando o milho uma fonte de proteína de baixo valor nutricional. Este fato foi inicialmente demonstrado por Osborne e Mendel (1914). A partir de 1964, após a descoberta de Mertz e col. (1964) do mutante Opaco-2, com alto teor de lisina e triptofano, vários trabalhos têm sido feitos comparando o valor nutritivo deste milho com o Normal. Estudos feitos com ratos (Mertz e col., 1965, Bressani e col., 1969a, Lohda e col. 1976, Sgarbieri e col. 1977), suínos (Cromwell e col., 1967a, Cromwell e col., 1969, Drews e col. 1969, Gipp e Cline, 1972), ovinos (Drews e col., 1969, Cromwell e col., 1967b) e humanos (Clark e col., 1967 e 1977), mostraram que o milho Normal tem valor nutritivo inferior ao Opaco-2, atingindo níveis satisfatôrios somente após suplementação com lisina e triptofano (Truswell e Brock, 1961. Bressani e col.. 1969. Dutra de Oliveira e Souza, 1972).

INFLUÊNCIA DE FATORES GENÉTICOS E AMBIENTAIS NA COMPOSIÇÃO E VALOR NUTRITIVO

Experiências de quase um século têm mostrado que a composição química do milho pode ser alterada sensivelmente por seleção e manipulação genética, além de pequenos efeitos produzidos pela fertilização do solo (Inglett, 1970). A importância prática destas descobertas depende principalmente dos objetivos almejados. Não podemos excluir a importância da obtenção de variedades com maior rendimento por área, mais resistentes às pragas e doenças ou que produzam grãos com peso maior ou com teor elevado de proteína ou óleo. O principal problema no melhoramento do milho é a conciliação destas qualidades com o aumen-

to do valor nutritivo do grão.

Vários estudos foram feitos na tentativa de aumentar o teor de proteína do grão, obtendo-se variedades com até 25% de proteína, quando o normal está em torno de 10-12% (Inglett, 1970). No entanto, vários pesquisadores (Hansen e col., 1946, Frey, 1951, Hamilton e col., 1951, Schneider e col., 1952) notaram que a zeína aumentava proporcionalmente ao aumento da proteína total, causando modificações profundas na composição aminoacídica global da semente, com grande aumento no teor de leucina e diminuição do teor de lisina, triptofano e valina (Frey, 1951, Hamilton e col., 1951), com a consequente diminuição do seu valor nutritivo.

O tratamento do solo, pelo uso de fertilizantes fosforados e rotação de cultura, exerce efeitos positivos na composição química do grão, aumentando seu peso e os teores de proteína e óleo (Hamilton e col., 1951). Schneider e col. (1952) notaram que o endosperma era o principal componente envolvido no aumento ou diminuição do nitrogênio total do grão, seja por efeito de seleção ou pelo uso de fertilizantes nitrogenados. Portanto, apesar do aumento havido em todas as frações proteicas do grão, a zeína aumentou em maior proporção, mesmos nos mi-
lhos selecionados para alto teor de óleo, o que significa que estes também não devem ter valor biológico muito diferente dos demais.

GENES QUE AFETAM A SÍNTESE DE PROTEÍNA DO ENDOSPERMA

Devido ao baixo valor nutricional das proteínas do milho, vários pesquisadores tentaram obter variedades de milho

com melhor qualidade protéica e, atualmente, são conhecidos vários mutantes capazes de provocar alterações profundas nas propriedades físicas e químicas da semente. Do ponto de vista nutricional, os mutantes mais importantes são aqueles cujo principal efeito consiste na modificação da qualidade da proteína do endosperma da semente.

Mertz e col. (1964) e Nelson e col. (1965) relataram a descoberta de dois genes, opaco-2 e floury-2, respectivamente, capazes de modificar a qualidade da proteína do endosperma, aumentando o teor de lisina e triptofano e modificando o aspecto do grão, que adquire textura farinácea e opaca.

A introdução do gene opaco-2 em uma linhagem de milho Normal aumentou o teor de lisina em 69% (Mertz e col., 1964). Este aumento se deve, primariamente, à redução da fração protéica álcool-solúvel e, conseqüentemente, a um aumento nas demais frações, principalmente a glutelina (Mossé, 1966, Mossé e col., 1966), sendo que a relação zeína/glutelina é praticamente invertida. Estas alterações acarretam modificações no teor de vários aminoácidos, aumentando o teor de histidina, arginina, ácido aspártico e glicina e diminuindo o teor de alanina e leucina (Sodek e Wilson, 1971, Robutti e col., 1974, Mertz, 1968, Mossé e col., 1966). O nível de aminoácidos livres aumenta em dez vezes no milho Opaco, quando comparado com o Normal (Mertz, 1972) e o seu efeito na composição em aminoácidos da proteína está restrito somente ao endosperma (Nelson, 1969).

A diminuição da zeína está associada com a diminuição dos corpos protéicos do endosperma no milho Opaco. No milho Normal, a zeína está armazenada em pequenos corpúsculos protéicos, inseridos na matriz citoplasmática (Duvick, 1961, Christianson

e col., 1969). Wolf e col. (1967 e 1969) verificaram que no milho Opaco estes corpúsculos de proteína eram vinte vezes menos do que no Normal, com uma concentração de zeína bastante reduzida.

A maioria das linhagens onde o gene opaco-2 foi incorporado mostrou grande aumento de ribonuclease no endosperma na terceira semana após polinização e todas apresentaram um aumento desta enzima com o amadurecimento, sugerindo que este aumento na atividade de ribonuclease estaria destruindo mais rapidamente o mRNA responsável pela síntese de zeína (Dalby e Davies, 1967). Jones e col. (1977), a partir de estudos de síntese de zeína "in vitro", verificaram que no milho Normal a síntese de zeína estava associada com uma determinada classe de polissomos ligados à membrana e que estes apareciam em níveis muito reduzidos no mutante Opaco-2, acarretando uma diminuição na "disponibilidade" de mRNAs para a síntese de zeína neste milho. Como consequência, há uma diminuição global na síntese desta proteína, além de uma redução drástica em um de seus principais componentes, a banda Z_1 , que pode ser verificada nos padrões de eletroforese em gel de poliacrilamida (Lee e col., 1976, Jones e col., 1977). Lee e col. (1976) verificaram que os principais componentes da zeína (Z_1 e Z_2) encontrados nos corpos protéicos aparecem em intensidade semelhante quando a zeína é extraída do endosperma como um todo, além de apresentarem composição em aminoácidos semelhante, sugerindo que no milho Opaco-2 o componente mais drasticamente reduzido deveria ser encontrado exclusivamente nos corpos protéicos, devido à redução do tamanho destes corpúsculos encontrados no Opaco-2, em comparação com o Normal. Este fato foi posteriormente confirmado por Righetti e col.

(1977). Estes autores verificaram, a partir de estudos de focalização isoelétrica de zeínas obtidas de variedades geneticamente diferentes, que a quantidade de cada componente estava relacionada com as doses de genes presentes em cada cruzamento, sugerindo que as bandas correspondiam a um sistema de genes estruturais que atuam de forma aditiva. Alterações genéticas relacionadas à síntese de zeína afetaram muito o padrão eletroforético destas proteínas, sendo que a introdução do gene o_2 causou uma redução drástica nos componentes mais alcalinos, praticamente não alterando os mais acídicos, além de reprimir a síntese global da zeína. Portanto, os estudos feitos até o presente indicam que não há síntese de novas proteínas no mutante Opaco-2 e que as diferenças nos perfis de aminoácidos dos endospermas da variedade Normal e do mutante Opaco-2 são devidas principalmente às mudanças nas proporções relativas das proteínas do endosperma, que conferem ao milho Opaco-2 melhores características nutricionais do que o milho Normal. Assim sendo, o Opaco-2 é capaz de proporcionar um incremento no ganho de peso de 3 a 4 vezes e PER 2 a 2,5 vezes maiores em várias espécies animais estudadas. Além disso, o milho Opaco-2 tem maior digestibilidade e valor biológico do que o Normal, proporcionando maior retenção de nitrogênio em humanos adultos (Clark e col., 1967 e 1977), embora a lisina ainda seja o aminoácido limitante para a manutenção do equilíbrio nitrogenado (Kies e Fox, 1972). Em crianças, Bressani e col. (1969b) verificaram que, em níveis de ingestão diária idênticos aos normalmente consumidos pela população em estudo, o valor das proteínas do milho Opaco-2 corresponde a 90% do encontrado para as proteínas do leite.

GENES QUE AFETAM A SÍNTESE DE CARBOIDRATOS DO ENDOSPERMA

Atualmente são conhecidos vários mutantes de milho que apresentam a síntese de carboidratos do endosperma modificada, e conseqüentemente, mostram alterações físicas profundas em algumas propriedades do grão, como textura, forma e quantidade de endosperma. Quimicamente, estas alterações se refletem na modificação das proporções de diversos açúcares e carboidratos presentes e/ou alterações na estrutura química do amido, modificando sua digestibilidade e temperatura final de gelatinização. Em geral, genótipos com alto teor de açúcar têm baixo teor de amido (Andrew e col., 1944, Creech, 1968, Garwood e Creech, 1972).

Neste trabalho daremos ênfase ao mutante sugary e suas modificações, em comparação com o milho Normal, condicionada pelo gene recessivo su. Este gene influencia, primariamente, a síntese de polissacarídeos solúveis em água (WSP) do endosperma, sendo que seus efeitos secundários se refletem no peso do grão (maior que o Normal), maior teor de umidade, que é perdida menos rapidamente com o amadurecimento, influenciando ainda a velocidade de maturação e a textura, que se torna mais macia (Andrew e col., 1944). O gene sugary é, entre todos os mutantes para o endosperma, o único capaz de acumular WSP em altas concentrações, além de aumentar os teores de açúcares simples e diminuir o teor de amido. A fração WSP é um fitoglicogênio, mais ramificado do que a amilopectina (Black e col., 1966).

No milho Normal maduro o amido corresponde a aproximadamente 70% da matéria seca total do grão, enquanto os teores de WSP, açúcares redutores e sacarose são baixos. Esta composição está intimamente relacionada com o estágio de maturação

(Creech, 1965, Tsai e col., 1970). Tsai e col. (1970) estudaram a variação no conteúdo destas frações no milho Normal entre o 8º e o 28º dia após polinização (DAP) e verificaram que entre o 8º e o 10º DAP os açúcares redutores representam 80% dos carboidratos (38% da matéria seca), diminuindo gradativamente após este período, até constituírem pouco mais de 1% dos carboidratos totais no 28º DAP. A sacarose atinge valor máximo em torno do 12º DAP, diminuindo constantemente a partir daí, paralelamente ao grande aumento de amido. No milho Normal há uma relação entre umidade, açúcares redutores, sacarose, amido e peso seco total durante o desenvolvimento do grão, isto é, a umidade decresce continuamente, enquanto o amido e a matéria seca total aumentam. Os dados estão de acordo com o trabalho anterior de Creech (1965), que notou correlações negativas entre o teor de açúcares totais, açúcares redutores e sacarose com a matéria seca e o amido, indicando que os açúcares são precursores do amido. Creech (1968) mostrou que no milho Normal os açúcares totais aumentam até o 15º DAP e diminuem durante o amadurecimento; os açúcares redutores estão presentes em maior quantidade nos primeiros estágios de maturação, diminuindo com o amadurecimento; a sacarose aumenta rapidamente até o 15º DAP, diminuindo lentamente a partir daí e os polissacarídeos totais aumentam constantemente durante o amadurecimento. Os valores encontrados no 28º DAP são semelhantes aos do grão maduro.

Creech (1965) relatou a variação do conteúdo de açúcares redutores, sacarose, WSP e amido no endosperma de vários mutantes de milho Doce, em comparação com o Normal, entre o 16º e 28º DAP e verificou que no Doce (su) o teor de açúcares redutores variou de 9,2% a 3,6%, enquanto no Normal foi de

9,4% a 0,8%. A sacarose variou de 16,5% a 4,4% e no Normal foi de 8,2% a 2,2%. As variações mais marcantes foram no teor de WSP e amido: enquanto no milho Normal o WSP decresceu de 3,7% a 2,2% no Doce aumentou de 22,8% a 24,2%, o que significa um aumento de onze vezes em relação ao Normal. O amido aumentou continuamente no Normal (39,2% a 73,4%), enquanto no Doce variou de 23,3% a 35,4%, isto é, metade do valor encontrado no Normal.

O alto teor de WSP confere ao milho Doce propriedades texturais favoráveis ao enlatamento e consumo "in natura", sendo que o período compreendido entre 21º e o 25º DAP corresponde à fase mais adequada para consumo, por causa do alto grau de doçura e melhor qualidade nutricional, devido ao teor e qualidade das proteínas presentes neste período (Tosello, 1975).

O milho Doce, mesmo no estágio de grão maduro (seco) têm características nutricionais melhores do que o Normal nas mesmas condições, proporcionando maior crescimento e PER do que o Normal (Sgarbieri e col., 1977). Este fato pode ser atribuído ao menor teor de zeína do endosperma (Hansen e col., 1946, Misra e col., 1975a) e maior teor de glutelina 1 (Misra e col., 1975a, Paulis e col., 1978) e ligeiro aumento nas demais frações proteicas. Segundo Paulis e col. (1978), o aumento da fração glutelina 1 seria o principal responsável pelo alto teor de metionina encontrado em vários mutantes do milho Doce contendo o gene "sugary". O alto teor de metionina desta fração foi anteriormente demonstrado em trabalho de Sodek e Wilson (1971).

DUPLO-MUTANTES COM ALTERAÇÃO NA SÍNTESE DE CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS DO ENDOSPERMA

Vários estudos de cruzamento têm sido feitos de mutantes contendo o gene opaco-2 com outras variedades, procurando melhorar certas características físicas desfavoráveis do grão, mantendo, porém, suas qualidades nutricionais.

Misra e col. (1975a), estudando a combinação do mutante Opaco-2 com vários mutantes responsáveis por alterações nas proteínas ou carboidratos do endosperma normal, verificaram que a combinação do gene opaco-2 com genes que condicionam a diminuição da síntese de amido melhorava as qualidades protéicas do endosperma do milho Opaco. Silva e col. (1978) relataram a ob -
tenção de uma variedade duplo-mutante, adaptada às nossas condições, denominada Nutrimaiz, resultante do cruzamento das varie-
dades Doce e Opaco. O novo mutante é homozigoto para os genes recessivos su e o₂, e os dados obtidos até o presente indicam que o Nutrimaiz mantém as qualidades dos mutantes paternos, re-
sultando numa variedade superior até mesmo ao Opaco-2, tanto no aspecto químico como físico e nutricional.

O Nutrimaiz tem seis vezes mais açúcares totais, 50% menos amido (com 38% menos amilose) e um teor de WSP quase vin-
te vezes superior ao Normal e, como o milho Doce, tem menor ve-
locidade de acumulação de matéria seca, aumentando seu período de consumo como milho verde (Silva e col., 1978). Suas caracte-
rísticas protéicas são superiores às dos milhos Normal, Doce e Opaco, com alto teor de lisina e triptofano e baixo teor de leucina, mantendo estas qualidades mesmo nos estágios finais de amadurecimento (Silva e col., 1978, Sgarbieri e col., 1977).

Misra e col. (1975a) verificaram que o mutante suo₂ tem um teor de zeína bem menor do que o Normal e Opaco, mesmo na fase de milho maduro (3%, comparado com 59% do Normal e 26,9% do Opaco). Estas características fazem do Nutrimaiz um mi

lho de maior valor nutricional, maior digestibilidade, capaz de promover o aumento de peso e PER em ratos a níveis próximos ao da caseína (Sgarbieri e col., 1977).

EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DAS PROTEÍNAS

As proteínas dos cereais foram classificadas por Osborne (1907) de acordo com sua solubilidade em diferentes solventes, em quatro frações principais: albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas. Como cada fração é composta de vários componentes diferentes, modificações no método de extração de Osborne fornecem quantidades variáveis e/ou frações adicionais destas proteínas, além de variações no rendimento total da extração.

Mertz e Bressani (1957) obtiveram alto rendimento extraíndo as proteínas do milho com uma solução alcalina contendo íons sódio, cobre e sulfito. Após fracionamento e estudo eletroforético por Mertz e col. (1958), as proteínas puderam ser fracionadas nas mesmas classes obtidas pelo método de Osborne.

Landry e moureaux (1970) modificaram o método de extração fracionada de Osborne pela introdução de agente redutor e detergente, separando as glutelinas em três frações diferentes, com características de solubilidade bem definidas, obtendo alto rendimento de extração.

Nielsen e col. (1970) introduziram o uso de α -amilase para extração do amido, após extração das frações salino e álcool-solúveis, e o resíduo obtido foi considerado como representante mais próximo da glutelina presente no endosperma intacto, pois sua extração evitava possíveis degradações químicas.

Posteriormente, Paulis e Wall (1971) separaram a glútelina assim obtida em duas frações, após redução e alquilação.

PROTEÍNAS SALINO-SOLÚVEIS

Sob esta denominação encontramos duas classes de proteínas diferentes, as albuminas e as globulinas. As albuminas são solúveis em água e em solução salina, enquanto as globulinas só são dissolvidas em solução salina e têm tendência para a agregação em pH neutro (Wall, 1964).

As proteínas salino-solúveis estão distribuídas irregularmente nos vários tecidos do grão, exercendo funções enzimáticas e estruturais, além de servirem como hidrocolóides, promovendo a absorção de água durante a germinação da semente (Wall, 1964). Devido a seus baixos pesos moleculares e conteúdo total de aminoácidos com cargas elétricas, as albuminas e as globulinas são capazes de migrar eletroforéticamente. Segundo Paulis e Wall (1969), as albuminas e as globulinas do milho são constituídas de uma variedade de proteínas de diferentes pesos moleculares, podendo existir em diferentes tamanhos moleculares ou estados de agregação. Estudos de Misra e col. (1976b) mostraram que os principais peptídeos da fração salino-solúvel têm pesos moleculares médios na faixa de 13400 a 58000.

Paulis e Wall (1969), após a extração das albuminas e globulinas, verificaram que os sólidos recuperados da fração solúvel em água (albuminas) continham somente 6% de nitrogênio, sendo que o material não protéico era composto principalmente de carboidratos, dos quais cerca de 8% eram açúcares redutores. A fração globulina, precipitada após diálise, era mais pura, com

13% de nitrogênio. Segundo os mesmos autores, a dificuldade na ressolubilização destas proteínas em solução salina, após liofilização, pode ser devida a oxidação de grupamentos sulfidrilos (-SH), formando ligações dissulfídicas intermoleculares.

A maior parte dos trabalhos encontrados na literatura diz respeito à composição da fração salino-solúvel ao invés de cada fração separadamente. Dados de Paulis e Wall (1969) indicaram pequenas diferenças no teor de alguns aminoácidos entre as albuminas e as globulinas, mas não entre proteínas similares do endosperma e do germe. As principais diferenças na composição referem-se aos aminoácidos: arginina, ácido glutâmico (maior quantidade nas globulinas), ácido aspártico, treonina, prolina, glicina e alanina (mais elevados nas albuminas). Os valores encontrados por Sodek e Wilson (1971) não foram muito diferentes dos de Paulis e Wall (1969), mas as diferenças na composição em aminoácidos entre as duas frações foram menos significativas.

As albuminas e globulinas apresentam um bom perfil de aminoácidos, com teores elevados de resíduos básicos, sulfurado e triptofano, e baixos de ácido glutâmico, prolina e leucina (Paulis e Wall, 1969, Sodek e Wilson, 1971, Mossé e col., 1966, Misra e col., 1976a). Esta composição sugere um valor nutritivo superior às demais frações protéicas encontradas no endosperma do milho, embora estas qualidades sejam diluídas se levarmos em conta o teor final destas frações no grão maduro.

O teor de proteínas salino-solúveis diminui com o amadurecimento, variando de 60%, nos estágios iniciais de maturação, até cerca de 6% da proteína total no endosperma maduro (Murphy e Dalby, 1971, Bressani e Conde, 1961, Misra e col., 1975b).

PROLAMINAS

As prolaminas, proteínas álcool-solúveis dos grãos de cereais, formam, quantitativamente, a fração mais importante e, qualitativamente, as de menor valor nutricional, devido à sua composição em aminoácidos (Mossé, 1966).

Zeína, a prolamina do milho, perfaz mais de 50% da proteína total do grão maduro (Hansen e col., 1946, Bressani e Conde, 1961, Mossé, 1966) e está localizada no endosperma do grão, armazenada em corpúsculos protéicos dispersos em uma matriz protéica no citoplasma (Duvick, 1961, Khoo e Wolf, 1970). Duvick (1961) notou que o aparecimento e desenvolvimento destes corpúsculos coincide com a formação de zeína no endosperma do milho. A zeína, juntamente com as glutelinas, atua como proteína de reserva para a nutrição do germe, além de auxiliar na manutenção da integridade do grão, como componente estrutural, de corrente de sua composição química (formação de pontes de hidrogênio através das amidas das cadeias laterais) e de sua estrutura molecular de ligações dissulfídicas cruzadas (Wall, 1964).

Bressani e Conde (1961) demonstraram que a zeína é produzida somente após o 23º dia da floração, com rápido aumento na velocidade de síntese, paralelamente ao amadurecimento do grão. Este comportamento foi confirmado em trabalhos posteriores de Murphy e Dalby (1971) e Tsai e Dalby (1974).

Estudos eletroforéticos levaram a crer que a zeína apresentava um grau moderado de heterogeneidade, composta de frações polipeptídicas com peso molecular na faixa de 19000 a 25000, sendo que os dois componentes principais apresentaram valores médios de 19000 e 21800 (Misra e col., 1976b, Lee e col., 1976), concordantes com o trabalho de Turner e col. (1965) que

obtiveram um peso molecular médio de 21000 para a zeína reduzida e 44000 para a zeína nativa.

Righetti e col. (1977) verificaram, a partir de estudos de focalização isoelétrica, que a zeína apresenta uma grande heterogeneidade de tamanho e carga, com cerca de 15 bandas, com pIs na faixa de pH 6 a 9, independente do método de extração ou estágio de maturação, e concluíram que este comportamento está baseado na desamidação "in vivo" da glutamina e asparagina e na mutação em alguns dos genes responsáveis pela síntese de zeína. Segundo os mesmos autores, devido ao alto teor de resíduos de ácido glutâmico e de ácido aspártico presentes na composição da zeína, e se os mesmos estivessem na forma de ácidos, a proteína teria um pI em torno de 3,2. A maioria das bandas apresentou pIs na faixa de pH 7-8, o que significa que pelo menos 90% dos ácidos aspártico e glutâmico devem estar na forma de amidas.

As prolaminas são deficientes em grupos polares livres e sua composição em aminoácidos é específica e característica. Seu alto teor em prolina e ácido glutâmico (principalmente na forma de glutamina) explicam o nome prolamina, proposto por Osborne (Mossé, 1966). A zeína é caracterizada por níveis muito baixos de lisina e outros aminoácidos básicos e triptofano, e alto teor de prolina, leucina, alanina e glutamina, que perfazem cerca de 70% da composição total dos aminoácidos da proteína (Mossé, 1966, Baudet e col., 1966, Landry e Moureaux, 1970, Sodek e Wilson, 1971, Lee e col., 1976). Como cerca de 50% dos aminoácidos totais do grão provém da zeína, seu desequilíbrio aminoacídico se reflete na composição global do grão, diminuindo seu valor nutritivo, embora o teor de cistina desta fra-

ção seja muito importante, tanto sob o ponto de vista estrutural (ligações dissulfídicas) como nutricional (Mossé, 1966).

Portanto, a diminuição do teor de zeína no grão é uma das formas mais eficientes de elevar o valor nutritivo da proteína do milho, já que o simples aumento no teor da proteína total é acompanhado por um aumento proporcional do teor de zeína e diminuição no teor das demais frações protéicas do grão.

GLUTELINAS

As glutelinas constituem a fração protéica mais insolúvel das proteínas dos cereais. Esta insolubilidade é devida mais a seu peso molecular e conformação do que à sua composição em aminoácidos (Wall, 1964).

O teor de glutelina do grão varia de acordo com o método de extração e estágio de maturação. Segundo Dimler (1966) e Nielsen e col. (1970), atinge valores de 35 a 50% no grão maduro, embora alguns trabalhos citem valores em torno de 20% (Mertz e col., 1958, Sodek e Wilson, 1971). Sua síntese inicia-se cedo (6,4% no 10º dia da floração), aumentando com o amadurecimento (cerca de 30% da proteína total no grão maduro), segundo Bressani e Conde (1961).

As glutelinas têm sido geralmente extraídas por soluções alcalinas diluídas, com evidente degradação tanto de estrutura como de alguns aminoácidos, como lisina e cistina (Parker e Kharasch, 1959, Donovan, 1967). A alta insolubilidade desta fração, modificada após redução das pontes dissulfídicas, e o alto teor de resíduos de cistina indicaram que a glutelina é um sistema protéico caracterizado por subunidades polipeptídicas de

baixo peso molecular, ligadas por pontes dissulfídicas intermoleculares numa estrutura tridimensional, constituindo uma matriz na qual estão inseridos grânulos de amido e corpúsculos de zeína (Christianson e col., 1969, Paulis e Wall, 1971).

A glutelina é altamente insolúvel mesmo nos solventes mais potentes de dissociação de proteínas, tornando-se solúvel após redução de suas ligações dissulfídicas (Moureaux e Landry, 1968, Nielsen e col., 1970, Paulis e Wall, 1971) e os peptídeos resultantes podem ser fracionados por diferença de solubilidade (Landry e Moureaux, 1970, Paulis e Wall, 1971 e 1977). Uma destas frações é solúvel em solução aquosa de etanol com mercaptoetanol e foi denominada glutelina 1 por Moureaux e Landry (1968), zeína 2 por Sodek e Wilson (1971) e glutelina reduzida álcool-solúvel (ASG) por Paulis e Wall (1971). Esta fração tem propriedades de solubilidade semelhantes à zeína, mas os resultados de estudos eletroforéticos e composição em aminoácidos mostraram que esta fração é composta de proteínas diferentes da fração zeína, com teores bem mais elevados de histidina, metionina, prolina e glicina e menores de ácido aspártico, ácido glutâmico, leucina, isoleucina e fenilalanina (Paulis e Wall, 1971, Sodek e Wilson, 1971, Landry e Moureaux, 1970).

É interessante notar que Murphy e Dalby (1971), baseados em variações ocorridas no teor de alguns aminoácidos e resultados de estudos eletroforéticos, consideraram que a fração glutelina era progressivamente diluída por material semelhante à zeína, com o amadurecimento.

Trabalhos de Paulis e Wall (1971) indicaram que as subunidades da fração glutelina reduzida têm pesos moleculares na faixa de 17500 a mais de 70000, sendo que os peptídeos de pe

so molecular entre 17500 e 25000 foram encontrados na zeína sob o mesmo tratamento. Mertz e col. (1958) obtiveram três componentes da glutelina, o menor com peso molecular de 21000 a 26000 , considerado como a unidade repetitiva da proteína, assemelhando-se à zeína no aspecto estrutural. Os dados estão de acordo com o fato de parte da glutelina reduzida e alquilada ser solúvel em etanol e de Lloyd e Mertz (1958) terem extraído mais proteína álcool-solúvel que o obtido pelo método de Osborne. Isto seria explicado pela solubilização do componente da glutelina que é solúvel em etanol após redução.

Os dados referentes à composição em aminoácidos da fração glutelina mostram que esta contém mais ácido aspártico , arginina, cistina, glicina, lisina e triptofano e menos ácido glutâmico, isoleucina, leucina, prolina e serina do que a zeína (Lloyd e Mertz, 1958, Paulis e Wall, 1971 e 1977, Sodek e Wilson, 1971, Dimler, 1966). A sua composição global em aminoácidos é intermediária entre a das proteínas salino-solúveis e a zeína. O alto teor de lisina e triptofano são características favoráveis desta proteína, principalmente se levarmos em conta o seu teor final no grão maduro, bem superior ao das proteínas salino-solúveis.

MATERIAIS E MÉTODOS

O material estudado é proveniente de quatro cultivares com os seguintes genótipos para os endospermas: Maya Normal (SuO_2), Doce Piramex (suO_2), Maya Opaco-2 (Suo_2) e Nutrimaiz (suo_2), fornecidos pelo Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

A variedade Maya Normal é uma variedade sintética produzida no Instituto Agronômico de Campinas. A variedade Maya Opaco-2, homozigota para o fator opaco-2, foi sintetizada a partir do cultivar Maya, no Instituto Agronômico de Campinas. A variedade Doce Piramex corresponde ao cultivar Piramex, homozigoto para o fator "sugary". O cultivar Piramex foi sintetizado pelo Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz (ESALQ) de Piracicaba e a versão Doce foi obtida pelo Instituto Agronômico de Campinas. O Nutrimaiz corresponde a uma variedade sintética, obtida por Silva e col. (1978), através de um programa de retrocruzamento, utilizando como pai recorrente o cultivar Maya Opaco-2 e como fonte de gene *su* a variedade de milho Doce Pajimaca (cubana), escolhida como pai não recorrente por ser uma população bem adaptada às condições tropicais.

PREPARO DAS AMOSTRAS

Farinhas de milho verde - as espigas foram colhidas aos 20 dias após polinização, acondicionadas em sacos e mantidas congeladas a -20°C . Para obtenção das farinhas as espigas foram liofilizadas, os grãos retirados manualmente e moídos em moinho

de martelo (Dumore, mod. 7104), até passagem completa em peneira nº 040. As farinhas foram conservadas em frascos de vidro vedados durante os 18 meses de duração do experimento.

Farinhas de milho seco - estas foram preparadas por moagem direta dos grãos, após debulhação mecânica das espigas colhidas aos 60 dias após polinização e conservadas da mesma forma que as farinhas verdes.

DETERMINAÇÕES REALIZADAS

Todas as determinações foram feitas com as quatro variedades nos dois estágios de maturação.

UMIDADE. Foi determinada segundo procedimento da AOAC (1970), método nº 14004, usando-se temperatura de 105°C, até peso constante.

NITROGÊNIO TOTAL E PROTEÍNA. O nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldhal, conforme descrito na AACC (1976), método nº 46-12. A proteína foi calculada multiplicando-se a porcentagem de nitrogênio total pelo fator 6,25,

NITROGÊNIO NÃO PROTÉICO. Foi determinado no extrato aquoso da farinha desengordurada, após precipitação das proteínas hidrossolúveis do extrato com ácido tricloroacético (TCA 5% P/V), segundo método descrito por Becker e col. (1940).

EXTRATO ETÉREO. Os lipídeos totais foram determinados conforme método descrito na AOAC (1970), procedimento nº 7048, usando-se extrator Goldfish.

CINZA. O resíduo mineral foi determinado conforme método

tudo descrito na AOAC (1970), procedimento nº 14006.

FIBRA BRUTA. Determinada pelo método de Van de Kamer e Van Junkel (1952), após digestão da amostra com uma mistura de ácidos (acético, nítrico e TCA) e filtração em cadinho G₄. A fibra corresponde ao resíduo que permanece após filtração.

CARBOIDRATOS TOTAIS. O teor de carboidratos totais foi calculado por diferença, ou seja, subtraindo-se de 100 a soma dos valores obtidos nas determinações dos demais componentes.

DETERMINAÇÃO DAS PORCENTAGENS DE CASCA, GERME E ENDOSPERMA E DO TEOR DE PROTEÍNA DE CADA PARTE. Cerca de 20 grãos foram usados na determinação. A casca foi retirada com pinça e o endosperma com auxílio de bisturi. Os grãos de milho verde foram previamente hidratados, enquanto que os secos foram imersos em água gelada para separação da casca. Os germes e endospermas foram homogeneizados em gral, determinando-se a porcentagem de proteína.

EXTRAÇÃO FRACIONADA DAS PROTEÍNAS DAS FARINHAS DE MILHO INTEGRAL. A extração fracionada das proteínas foi feita de acordo com método descrito por Landry e Moureaux (1970), após desengorduramento das farinhas com acetona e éter a -10°C, conforme sugerido por Baudet e col. (1966). As proteínas foram separadas em 5 frações por diferença de solubilidade em diversos solventes e condições de extração, segundo esquema descrito no Quadro I.

ISOLAMENTO DAS PROTEÍNAS DOS EXTRATOS. Após extração as frações protéicas foram submetidas a uma sequência de operações, com o objetivo de isolar e purificar parcialmente as pro-

teínas dos extratos: a) frações salino-solúveis (albuminas e globulinas) - os extratos foram dialisados contra água destilada (48h, 4°C), com duas trocas diárias de água, havendo precipitação das globulinas, que foram separadas das albuminas por centrifugação. O material resultante foi liofilizado, determinando-se em seguida a porcentagem de proteína; b) frações álcool-solúveis (zeína e glutelina 1) - os extratos foram concentrados por evaporação do solvente em evaporador rotatório, com controle de temperatura, e os resíduos lavados com água destilada e liofilizados, determinando-se a porcentagem de proteína do material liofilizado; c) frações solúveis em álcali (glutelinas 2 e 3) - os extratos foram dialisados para eliminação dos sais, a agente redutor e detergente. Após diálise, foram liofilizados e sua porcentagem de proteína foi determinada. Todo o material liofilizado foi conservado sob refrigeração e foi posteriormente utilizado para análise de aminoácidos.

DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS. A determinação dos aminoácidos das farinhas integrais e frações proteicas isoladas foi executada em analisador semi-automático da Beckman, modelo 120 C, segundo manual descrito pela própria Beckman (1973).

DETERMINAÇÃO DE TRIPTOFANO. O triptofano, por ser destruído na hidrólise ácida, foi determinado pelo método colorimétrico de Spies (1967). O método está baseado na reação do triptofano com N-dimetil-p-aminobenzaldeído (p-DABA), após hidrólise enzimática das proteínas, e determinação colorimétrica a 600nm em função de uma curva padrão de triptofano.

Quadro I. Esquema da extração fracionada das proteínas de milho, segundo Landry e Moureaux (1970).

Solvente	Temperatura (°C)	Tempo de agitação nas extrações su- cessivas (min.)	Frações protéicas
NaCl	4	60	Albuminas e Globulinas
		30	
		30	
H ₂ O	-	15	-
		15	
Isopropanol 70%	20	30	Zeína
		30	
		30	
Isopropanol 70% + 2 mercaptoetanol 0,6%	20	30	Glutelina 1
		30	
Tampão pH 10 + 2 mercaptoetanol 0,6%	20	60	Glutelina 2
		30	
		15	
Tampão pH 10 + 2 mercaptoetanol 0,6% + lauril sulfato de sódio 0,5%	20	60	Glutelina 3
		30	
		15	
			Resíduo

Tampão pH 10: borato, NaOH, NaCl $\mu = 0,5$

Relação farinha/solvente 1:10 (P/V)

ENSAIOS BIOLÓGICOS. Para o estudo comparativo da qualidade nutricional das proteínas das diferentes variedades de milho foi determinado o coeficiente de eficiência protéica (PER) pelo procedimento do AOAC (1970), a digestibilidade aparente, o valor biológico aparente e a retenção de nitrogênio, utilizando-se ratos em crescimento, da linhagem Wistar, recém-desmamados, com peso inicial de 50 ± 2 g. A digestibilidade e o valor biológico aparentes foram determinados basicamente pelo método de Mitchell (1923). Durante os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com água e comida "ad libitum". Em todos os ensaios a caseína foi utilizada como proteína padrão.

PREPARO DAS DIETAS. A composição centesimal das dietas utilizadas nos ensaios biológicos está baseada nos trabalhos de Alisson (1964) e AOAC (1970), procedimento nº 39.166. As proporções usadas estão relacionadas no Quadro II, enquanto a composição das misturas salina e vitamínica se encontram representadas nos Quadros III e IV, respectivamente.

Quadro II. Composição centesimal das dietas utilizadas nos ensaios biológicos.

Composição	Porcentagem
Proteínas	10
Cordura (Óleo de milho comercial)	9
Sais minerais (ver Q3)	4
Vitaminas (ver Q4)	2
Sacarose (açúcar refinado comercial)	25
Amido (amido de milho comercial)	q.s.p. 100

Quadro III. Composição centesimal da mistura salina usada nas dietas.

Componentes	Proporção (mg/100g ração)
Molibdato de amônio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3,0
Carbonato de cálcio CaCO_3	29290,0
Fosfato de cálcio CaHPO_4	430,0
Sulfato cúprico CuSO_4	156,0
Citrato férrico $\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O})_n$	620,0
Sulfato de magnésio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3333,0
Sulfato de manganês $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	121,0
Iodeto de potássio KI	0,5
Fosfato de potássio K_2HPO_4	34310,0
Cloreto de sódio NaCl	25060,0
Selenito de sódio Na_2SeO_3	2,0
Cloreto de zinco ZnCl_2	20,0

Fonte: Rogers, Q.R. e Harper, A.E. J. Nutr., 87:267, 1965.

Quadro IV. Composição da mistura vitamínica utilizada nas dietas.

Componentes	Proporção: mg/100g ração
Vitamina A *	2000
Vitamina D *	220
α -Tocoferol	11,000
Menadiona	5,000
Colina (HCl)	165,000
Ácido p-aminobenzóico	11,000
Inositol	11,000
Niacina	9,900
Pantotenato de cálcio	6,600
Riboflavina	2,200
Tiamina (HCl)	2,200
Piridoxina (HCl)	2,200
Ácido fólico	0,200
Biotina	0,044
Vitamina B ₁₂	0,003
Ácido ascórbico	99,000
Dextrose	q.w.p. 1000

* expressos em unidades internacionais (U.I.): 1 unidade internacional de vitamina A corresponde a 0,300 μ g de vitamina A₁ ou 0,600 μ g de β -caroteno ou 0,344 μ g de acetato de vitamina A₁; 1 unidade internacional de vitamina D corresponde a 0,025 g de vitamina D₃.

Fontes: NBC - Diet Catalog (1977/78); AOAC (1970), proc. n° 39.166.

RESULTADOS

COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Os resultados da composição centesimal das quatro variedades de milho, nos dois estágios de maturação, estão representados no Quadro V. Podemos notar que, de um modo geral, não há diferenças significativas nos teores dos diversos componentes do grão das quatro variedades, no estágio verde, com exceção do teor de lípides, maior na variedade Doce Piramex, e de nitrogênio não protéico (NNP) encontrado em quantidades apreciáveis nas variedades Maya Opaco e Nutrimaiz. Com o amadurecimento houve diminuição no teor de NNP, cinza e fibra em todas as variedades, enquanto os lípides aumentaram, notadamente nos milhos Doce Piramex e Nutrimaiz.

PORCENTAGEM DE CASCA, GERME, ENDOSPERMA E TEOR DE PROTEÍNA

Os resultados expressos no Quadro VI indicam que o germe contribui com a menor porcentagem em peso, enquanto o endosperma perfaz cerca de 80% do peso total do grão em todas as variedades, no estágio verde. Com o amadurecimento, verifica-se uma diminuição no teor de casca, enquanto o germe aumentou em cerca de 50% nas variedades Maya Normal e Doce Piramex e 2,5 vezes nas variedades Nutrimaiz e Maya Opaco. As variações do endosperma foram menos significativas, com ligeira diminuição nos milhos Doce Piramex e Nutrimaiz.

Em relação às proteínas, pode-se notar que a casca contém o menor teor e que estas diminuíram com o amadurecimento,

Quadro V. Composição centesimal de quatro variedades de milho em dois estágios de maturação (base seca).

Determinações (%)	<u>Maya Normal</u>		<u>Doce Píamex</u>		<u>Maya Opaco</u>		<u>Nutrimaiz</u>	
	verde	seco	verde	seco	verde	seco	verde	seco
Proteína (% N x 6,25)	13,0	11,9	13,6	14,2	11,2	13,2	14,0	13,3
NNP (% N x 6,25)	2,6	0,8	2,3	0,9	3,5	1,5	4,6	1,5
Lípides totais	3,8	5,0	5,1	8,0	3,7	6,4	4,0	9,3
Cinza	2,2	0,6	2,1	0,6	2,0	1,8	2,3	1,7
Fibra	3,6	1,6	3,4	2,3	2,8	1,6	3,4	3,2
Carboidratos (por diferença)	74,8	80,1	73,5	44,0	76,8	75,5	71,7	71,0

Quadro VI. Porcentagem de casca, germe e endosperma do grão de quatro variedades de milho, em dois estágios de maturação, e teor de proteína de cada parte.

Variedade	Parte Anatômica	% do grão		% Proteína	
		verde	seco	verde	seco
Maya Normal	Casca	10,8	6,6	7,1	3,7
	Germe	6,7	9,7	13,0	19,5
	Endosperma	82,5	83,7	12,8	10,5
Doce Piramex	Casca	11,8	11,2	6,0	3,6
	Germe	8,1	13,5	12,5	17,7
	Endosperma	80,1	75,3	11,8	12,8
Maya Opaco	Casca	11,6	6,1	8,0	3,4
	Germe	5,1	12,7	18,3	28,1
	Endosperma	83,3	81,2	13,2	9,2
Nutrimaiz	Casca	13,6	10,3	7,6	4,1
	Germe	7,2	18,8	15,9	22,9
	Endosperma	79,2	70,9	12,2	9,8

enquanto as do germe tiveram um incremento bastante significativo em todas as variedades, sendo que o Nutrimaiz e o Maya Opaco mantiveram os teores mais elevados. O teor de proteína do endosperma diminuiu com o amadurecimento dos grãos, exceto no milho Doce Piramex.

COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS DAS FARINHAS DE MILHO

Os resultados das análises de aminoácidos das farinhas das quatro variedades de milho, nos dois estágios de maturação, estão expressos no quadro VII. Podemos notar que, mesmo no estágio verde, as variedades Maya Normal e Doce Piramex apresentam um perfil de aminoácidos mais desfavorável, com baixo teor de triptofano e uma relação leucina/isoleucina mais alta que as demais variedades. No estágio seco estas características são agravadas pela diminuição do teor de lisina (em cerca de 70% em relação ao estágio verde). As farinhas de milho Maya Opaco e Nutrimaiz apresentaram bom balanço aminoacídico, mesmo após amadurecimento, com teores mais elevados de lisina (duas vezes maior que o encontrado no Maya Normal, estágio seco) e triptofano (2,5 a 3 vezes maior que o teor encontrado no Maya Normal), além de uma diminuição na relação leucina/isoleucina, que apresentou valores até 60% menores nestas variedades, quando comparadas com o Maya Normal.

EXTRAÇÃO FRACIONADA DAS PROTEÍNAS

As diferenças nas proporções das principais frações protéicas do milho das quatro variedades, nos dois estágios de

Quadro VII. Composição em aminoácidos das farinhas de quatro variedades de milho em dois estágios de maturação.

Aminoácidos	Maya Normal		Doce Piramex		Maya Opaco		Nutrimaiz	
	verde	seco	verde	seco	verde	seco	verde	seco
Lisina	4,1	2,4	3,9	2,7	4,4	4,6	4,6	5,4
Histidina	3,0	2,7	1,9	2,8	2,1	3,3	3,4	3,8
Arginina	3,2	3,6	2,4	3,4	3,1	7,2	3,3	5,2
Aspártico	9,4	6,7	10,3	7,2	11,2	9,3	12,4	10,5
Treonina	4,2	3,1	4,0	3,6	3,7	3,5	3,8	7,5
Serina	6,4	7,3	6,2	5,1	5,3	4,6	5,5	6,3
Glutâmico	31,3	32,9	26,5	27,9	26,5	21,5	27,1	16,6
Prolina	10,5	11,0	9,4	10,6	6,7	9,6	6,7	14,6
Glicina	3,9	3,6	4,0	4,8	4,3	5,8	4,6	7,4
Alanina	12,2	9,6	13,5	8,9	10,7	6,0	15,1	7,9
1/2 Cistina	1,1	1,4	t	1,3	0,8	1,5	1,0	1,7
Valina	4,5	4,8	4,7	5,1	4,1	4,6	4,3	6,2
Metionina	1,5	1,7	1,5	0,9	1,3	1,4	1,2	1,1
Isoleucina	2,9	3,5	2,5	3,4	2,4	2,9	2,3	3,1
Leucina	15,6	18,2	11,6	15,9	8,8	8,7	7,7	9,7
Tirosina	2,2	3,2	3,0	1,6	1,7	3,1	2,0	2,0
Fenilalanina	4,1	5,4	3,7	4,8	3,2	3,8	2,9	4,3
Triptofano *	0,4	0,4	0,6	0,4	0,9	1,2	0,8	0,9

t traces. * determinado pelo método de Spies (1967).

maturação, podem ser observadas no Quadro VIII e Figura 1. Os resultados indicam que, no estágio verde, a fração salino-solúvel (albuminas mais globulinas) é a mais importante, contribuindo com cerca de 56 a 70% da proteína total, dependendo da variedade. A fração zeína, neste mesmo estágio, aparece em proporções relativamente baixas, principalmente na variedade Nutrimaiz, cujo teor corresponde a 1/3 do encontrado no Maya Normal. O teor de glutelinas é baixo, com exceção da fração glutelina 3 da variedade Maya Opaco, 2,5 vezes maior do que o encontrado no Maya Normal.

Podemos notar que, com o amadurecimento, houve modificações profundas na proporção das diversas frações protéicas em todas as variedades. Embora a fração salino-solúvel tenha diminuído em todas as variedades, o decréscimo foi mais marcante nas variedades Maya Normal e Doce Piramex, enquanto que as variedades Maya Opaco e Nutrimaiz mantiveram quantidades apreciáveis destas proteínas, com teores de 2,5 (Maya Opaco) a 3 vezes (Nutrimaiz) mais elevados do que o Maya Normal. A variação mais importante diz respeito à fração zeína: enquanto nos milhos Maya Normal e Doce Piramex corresponde a cerca de 40% das proteínas do grão maduro, contribuiu com pouco mais de 10% no Maya Opaco e praticamente não sofreu alteração no Nutrimaiz com o amadurecimento. Em relação às glutelinas, a fração glutelina 1 aumentou em todas as variedades, exceto na variedade Nutrimaiz, aumentando, porém, em maior proporção no Maya Normal. A glutelina 2 aumentou na variedade Maya Normal, mas seu teor não foi muito significativo, mesmo no grão maduro, contribuindo com menos de 10% da proteína total em todas as variedades. A glutelina 3 aumentou em todas as variedades, principalmente nas

Quadro VIII. Extração fracionada das proteínas de quatro variedades de milho em dois estágios de maturação (Landry e Moureaux, 1970).

Variedades	Alb.+ Glob.		Zeína		Glutelina 1		Glutelina 2		Glutelina 3		Total Extr.	
	verde	seco	verde	seco	verde	seco	verde	seco	verde	seco	verde	seco
Maya Normal	58,2	16,0	16,4	40,0	4,5	13,2	5,2	9,2	5,2	14,0	89,5	92,4
Doce Piramex	56,1	21,0	14,9	37,2	6,3	9,5	6,7	6,4	5,9	18,0	89,9	92,1
Maya Opaco	60,7	40,1	8,0	10,8	5,4	9,6	5,9	7,7	13,0	25,8	93,0	94,0
Nutrimaiz	69,8	49,6	5,1	6,0	4,1	4,4	5,6	6,1	9,4	29,8	94,0	95,1

PROPORÇÕES RELATIVAS DAS DIVERSAS FRAÇÕES PROTÉICAS

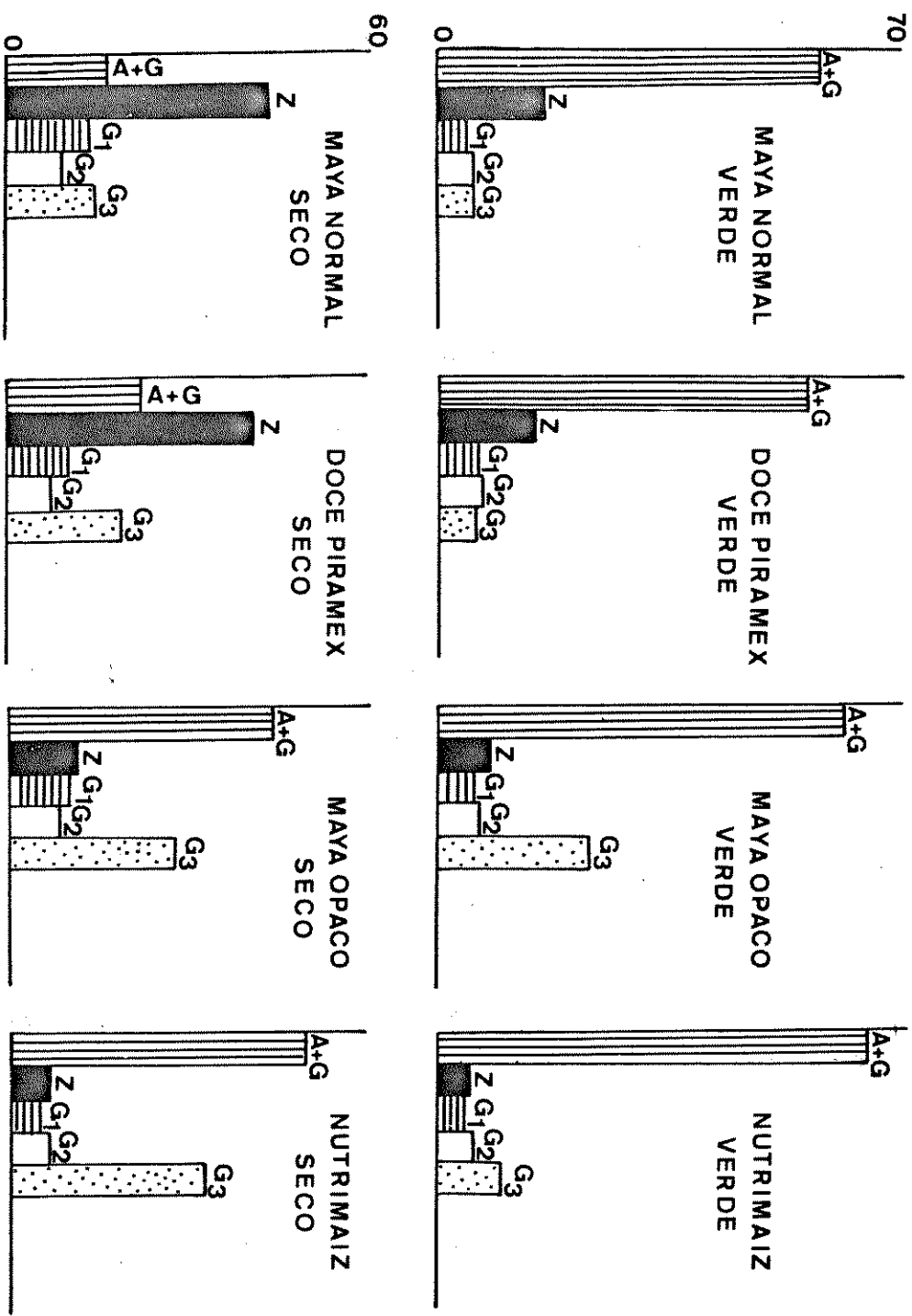


Figura 1. Gráfico de barras das diversas frações protéicas de 4 cultivares de milho em dois estágios de maturação: A, albumina; G, globulina; Z, zeína; G₁, glutelina 1; G₂, glutelina 2; G₃, glutelina 3.

variedades Nutrimaiz e Maya Opaco, cujos teores corresponderam ao dobro do encontrado no Maya Normal.

A variedade Doce Piramex, nos dois estágios, apresentou um comportamento similar ao Maya Normal.

COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS DAS FRAÇÕES PROTÉICAS ISOLADAS

Os resultados das determinações de aminoácidos das frações protéicas isoladas (Quadros IX a XII e Figura 2) sugerem uma certa independência da composição em relação à variedade. De um modo geral, podemos notar que as frações salino-solúveis (albuminas e globulinas) apresentam bom perfil de aminoácidos, com todos os aminoácidos essenciais presentes em proporções balanceadas. Com o amadurecimento há diminuição no teor de lisina das frações globulina, enquanto os teores de leucina e isoleucina diminuem a níveis inferiores ao desejado, embora a relação leucina/isoleucina se torne mais favorável. As frações álcool-solúveis (zeína e glutelina 1) apresentam uma composição global semelhante, com baixo teor de lisina, arginina, ausência de triptofano, alto teor de ácido glutâmico, prolina e fenilalanina mais tirosina, além de uma relação leucina/isoleucina muito alta. Apesar da semelhança, a fração glutelina 1 caracteriza-se pelo alto teor de metionina, além de apresentar maior teor de histidina do que a zeína (com exceção da variedade Doce Piramex, onde não se verifica diferença significativa). A fração glutelina 2 é caracterizada pelo alto teor de histidina, bem maior do que o encontrado nas demais frações, prolina, e ácido glutâmico, e baixo teor de lisina e triptofano, e uma relação leucina/isoleucina desfavorável. A fração glutelina 3 parece ter

Quadro IX. Composição em aminoácidos das frações protéicas isoladas do milho Maya Normal em dois estágios de maturação (g/16g N).

Aminoácidos	Albumina		Globulina		Zeína		Glutelina 1		Glutelina 2		Glutelina 3	
	verde	seco	verde	seco	verde	seco	verde	seco	verde	seco	verde	seco
Lisina	10,2	5,9	7,4	5,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,9	1,6	3,3	4,3
Histidina	2,7	1,8	2,3	2,7	1,1	1,2	1,4	2,3	8,6	5,1	2,6	3,6
Arginina	6,5	6,1	5,6	9,6	1,4	1,7	1,8	2,6	2,6	2,8	3,9	6,1
Aspártico	15,3	8,1	12,1	6,7	6,7	6,7	5,2	4,8	1,6	1,3	6,9	7,9
Treonina	6,9	4,5	7,7	2,7	3,2	3,1	3,6	3,6	3,7	2,9	3,6	4,2
Serina	7,3	4,5	5,3	4,4	6,8	6,3	7,0	6,6	2,9	2,3	4,1	5,1
Glutâmico	12,4	12,3	17,7	14,5	35,0	33,9	29,4	27,5	26,3	24,4	20,9	19,7
Prolina	7,5	7,4	4,4	6,9	11,5	10,9	13,9	13,7	20,4	12,2	7,8	7,9
Glicina	8,1	10,2	5,5	4,7	1,7	1,2	3,7	3,3	4,6	4,1	4,4	5,1
Alanina	11,1	11,0	7,9	4,5	13,5	13,7	14,7	12,6	4,0	4,0	6,8	7,2
1/2 Cistina	1,7	1,2	1,1	2,0	t	t	t	t	0,8	t	a	t
Valina	8,6	4,2	7,3	3,9	3,9	4,0	4,7	4,2	6,3	5,6	6,0	6,1
Metionina	2,4	1,1	2,4	1,1	0,9	1,1	6,1	4,8	1,4	1,2	1,6	2,0
Isoleucina	5,3	4,4	4,6	4,1	4,4	4,1	3,5	3,1	1,9	2,3	3,4	3,6
Leucina	12,7	9,5	11,4	8,1	25,2	24,9	19,9	14,7	9,6	8,1	10,7	10,8
Tirosina	5,1	2,3	3,8	2,5	5,7	5,4	3,9	5,5	1,9	1,6	2,8	3,8
Fenilalanina	5,7	2,4	4,8	3,6	8,3	8,2	3,4	6,5	1,7	1,4	4,2	4,5
Triptofano *	0,8	0,8	1,3	0,9	b	b	b	b	0,1	0,3	0,8	1,2

a não apareceu no aminograma; t traços; * determinado pelo método de Spies (1967); b não deu

Quadro X. Composição em aminoácidos das frações protéicas isoladas do milho Doce Piramex em dois estágios de maturação (g/16g N).

Aminoácidos	Albumina		Globulina		Zeína		Glutelina 1		Glutelina 2		Glutelina 3	
	verde	seco	verde	seco	verde	seco	verde	seco	verde	seco	verde	seco
Lisina	8,1	4,7	6,9	6,0	0,9	0,2	0,9	0,1	0,8	1,3	4,0	5,5
Histidina	2,3	3,3	2,6	3,3	1,3	1,2	1,2	2,0	7,3	9,1	3,2	3,9
Arginina	9,3	8,5	5,8	10,3	1,7	1,7	1,7	1,6	2,7	4,6	3,9	7,6
Aspártico	11,8	10,5	12,0	6,1	6,3	7,2	6,6	3,4	1,6	2,8	6,6	8,0
Treonina	5,4	5,9	4,5	3,9	3,1	3,4	3,2	2,7	3,3	4,7	3,3	4,1
Serina	5,0	6,0	4,5	3,6	6,3	7,7	6,5	4,9	2,9	4,4	3,6	4,7
Glutâmico	19,0	17,0	19,1	17,6	35,7	31,6	27,5	23,2	21,8	28,4	20,1	15,6
Prolina	6,2	7,4	5,4	4,5	11,5	12,9	11,8	16,3	17,4	22,3	8,3	7,1
Glicina	6,7	9,6	5,7	5,7	2,1	1,5	2,2	3,0	3,8	5,6	4,3	5,0
Alanina	8,8	10,0	7,8	6,1	11,6	15,5	12,1	9,1	3,6	4,9	6,3	6,4
1/2 Cistina	a	3,0	1,1	1,3	t	t	t	t	1,0	t	a	t
Valina	8,5	5,7	9,2	5,7	3,2	4,5	4,1	2,8	5,6	6,4	6,6	5,5
Metionina	1,7	1,4	2,4	1,7	0,9	1,4	0,9	2,8	0,3	1,3	1,3	1,7
Isoleucina	5,0	3,0	5,4	3,4	4,3	4,7	4,3	2,1	1,7	2,9	3,5	3,4
Leucina	10,2	5,4	12,2	7,4	25,0	20,4	13,8	13,6	8,2	10,6	11,4	9,5
Tirosina	2,7	2,7	3,6	3,6	5,6	6,3	5,7	1,5	1,8	4,6	3,0	3,3
Fenilalanina	5,0	2,9	5,4	5,2	7,7	9,1	7,9	4,6	1,4	3,4	4,2	4,0
Triptofano *	0,7	1,1	0,8	1,0	b	b	b	b	0,2	0,2	0,8	1,2

a não apareceu no aminograma; t traços; * determinado pelo método de Spies (1967); b não deu

Quadro XI. Composição em aminoácidos das frações protéicas isoladas do milho Maya Opaco em dois estágios de maturação (g/16g N).

Aminoácidos	Albumina		Globulina		Zeína		Glutelina 1		Glutelina 2		Glutelina 3	
	verde	seco	verde	seco	verde	seco	verde	seco	verde	seco	verde	seco
Lisina	5,9	5,9	9,2	5,1	0,3	0,8	0,6	0,1	1,7	1,1	7,4	4,0
Histidina	1,7	2,6	2,7	3,4	1,3	0,8	3,3	1,3	6,0	6,5	2,7	2,2
Arginina	6,4	6,9	7,8	13,8	1,4	2,4	2,9	2,0	4,7	3,9	5,3	4,6
Aspártico	14,0	10,3	13,4	7,4	6,0	5,0	3,2	4,6	1,3	2,7	10,4	7,9
Treonina	5,5	5,8	5,1	3,0	3,3	2,2	2,8	3,0	5,9	3,6	5,1	3,9
Serina	5,9	6,1	6,0	5,8	6,8	5,5	4,2	5,7	5,8	5,1	5,6	4,4
Glutâmico	19,3	16,5	20,2	19,0	36,1	20,4	32,2	31,6	27,3	23,7	16,0	13,8
Prolina	5,8	5,0	5,0	3,5	12,2	10,7	12,1	11,9	13,9	17,4	6,0	5,3
Glicina	6,4	8,2	6,3	5,4	2,0	2,3	2,9	2,7	2,9	4,7	5,5	4,9
Alanina	8,6	8,2	8,3	4,9	11,8	12,4	8,6	10,4	2,4	4,0	8,0	6,2
1/2 Cistina	2,2	1,5	1,3	1,4	t	t	t	t	1,3	t	t	t
Valina	6,2	5,3	7,2	5,1	4,4	2,5	3,3	3,4	4,6	5,8	6,8	5,6
Metionina	2,2	1,1	2,7	1,3	1,7	0,6	2,1	2,0	0,2	0,7	1,1	1,5
Isoleucina	4,1	2,9	4,8	2,5	4,0	3,9	2,3	2,9	1,4	1,9	3,6	3,2
Leucina	10,2	5,5	12,2	4,2	23,0	19,2	17,6	15,2	6,2	8,5	10,2	8,5
Tirosina	3,4	2,9	4,3	2,8	6,2	3,4	1,4	5,2	1,7	2,4	2,0	3,1
Fenilalanina	4,2	3,1	5,2	4,9	7,3	5,7	5,0	6,8	2,0	1,9	4,8	4,0
Triptofano *	1,0	0,9	0,9	1,1	— ^a	— ^a	— ^a	0,1	0,3	0,4	1,1	0,9

t traços: * determinado pelo método de Spies (1967); ^a não deu leitura.

Quadro XII. Composição em aminoácidos das frações protéicas isoladas do milho Nutrimaiz em dois estágios de maturação (g/16g N).

Aminoácidos	Albumina		Globulina		Zeína		Glutelina 1		Glutelina 2		Glutelina 3	
	verde	seco	verde	seco	verde	seco	verde	seco	verde	seco	verde	seco
Lisina	5,5	7,0	7,2	5,8	0,3	0,5	0,1	0,2	2,2	1,0	4,4	6,1
Histidina	1,7	2,4	2,5	3,6	0,6	1,0	2,6	2,1	11,8	5,9	2,7	4,0
Arginina	4,0	7,9	6,4	11,8	1,5	2,1	2,2	2,7	4,8	4,0	4,6	9,0
Aspártico	9,2	10,3	11,7	8,0	5,7	4,9	2,0	4,7	3,0	2,7	8,5	9,1
Treonina	4,2	5,6	4,6	3,5	2,6	3,0	3,0	3,1	6,4	3,9	4,2	4,5
Serina	4,3	5,8	5,1	6,0	6,0	5,3	4,2	5,3	6,3	3,8	5,3	5,4
Glutâmico	13,4	17,0	18,3	18,7	35,5	25,5	25,1	31,0	31,9	21,6	19,7	16,1
Prolina	4,9	5,0	4,7	4,7	9,4	6,6	13,8	13,9	13,9	17,2	7,4	6,2
Glicina	5,1	8,7	5,7	5,7	1,4	2,9	3,5	5,6	7,0	4,7	5,2	5,7
Alanina	6,4	8,8	7,5	5,8	12,5	10,2	6,8	10,7	6,4	4,0	7,1	7,0
1/2 Cistina	1,1	3,0	0,8	0,7	t	0,5	1,6	0,5	0,9	t	t	t
Valina	5,2	5,1	6,3	6,3	3,6	3,1	3,8	4,5	8,0	5,0	5,5	6,2
Metionina	1,5	1,3	2,4	1,4	0,6	1,0	2,8	2,6	0,8	0,7	1,7	2,0
Isoleucina	3,3	3,0	4,5	2,9	4,0	2,9	1,5	2,8	2,3	1,9	3,4	3,6
Leucina	8,2	5,8	11,7	6,7	20,6	19,4	12,9	17,7	11,5	8,3	10,4	10,2
Tirosina	2,2	2,9	3,8	3,0	5,0	3,7	4,8	5,2	2,9	2,7	3,5	3,8
Fenilalanina	3,4	2,6	5,0	5,0	7,6	5,7	4,6	8,0	2,0	1,9	3,7	4,9
Triptofano *	0,9	0,9	0,9	0,9	__a	__a	__a	__a	0,3	0,4	1,2	1,2

t tracos; * determinado pelo método de Spies (1967); a não deu leitura.

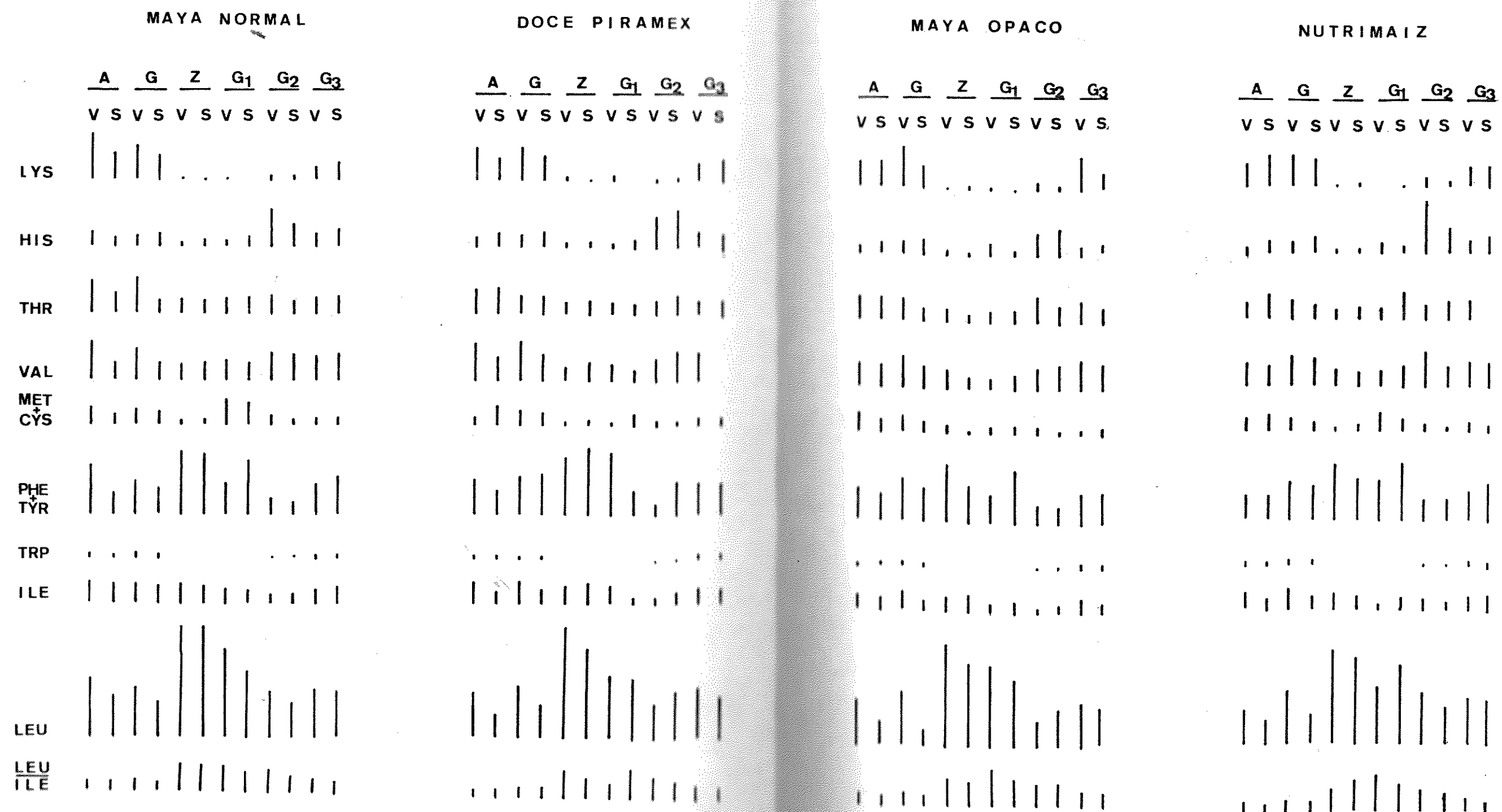


Figura 2. Proporções relativas dos aminoácidos essenciais e da relação Leu/Ile nas frações proteicas de 4 cultivares de milho em dois estágios de maturação: A, albumina; G, globulina; Z, zeína; G₁, glutelina 1; G₂, glutelina 2; G₃, glutelina 3; P, padrão (FAO/OMS, 1973); V, verde; S, seco.

uma composição global mais relacionada com as proteínas salino-solúveis, sendo que o teor de aminoácidos essenciais praticamente não sofre alterações com o amadurecimento. Esta fração apresenta como características favoráveis o alto teor de triptofano, além de quantidades apreciáveis de lisina.

PROPRIEDADES NUTRICIONAIS

Os resultados da determinação das características nutricionais das quatro variedades de milho, nos dois estágios de maturação, em comparação com a caseína, estão expressos no Quadro XIII. Podemos observar que as farinhas de milho Maya Opaco e Nutrimaiz apresentaram PERs superiores às demais, dando ainda valores mais elevados para valor biológico aparente e, consequentemente, maior retenção de nitrogênio, qualidades que foram mantidas após o amadurecimento. Pode-se notar também que estas duas variedades apresentaram valores mais próximos aos encontrados para a caseína, para todos os parâmetros estudados, e que a diferença em relação às demais variedades se torna mais acentuada no estágio seco, onde as farinhas de milho Maya Normal e Doce Piramex tiveram grande diminuição no valor nutricional, com redução marcante dos valores de PER e do nitrogênio retido, em consequência da diminuição da digestibilidade e do valor biológico aparente.

As curvas de crescimento (Figura 3) estão de acordo com os valores encontrados para o PER e com os valores médios de ingestão diária de dieta por rato: Maya Normal, 8,7g seco e 8,9g verde; Doce Piramex, 9,21g seco e 9,65g verde; Maya Opaco, 10,4g seco e 11,0g verde; Nutrimaiz, 10,6g seco e 12,0 verde.

Quadro XIII. Propriedades nutricionais das proteínas de quatro variedades de milho em dois estágios de maturação.

Fontes de Proteína (Farinhas)	PER		Retenção de N (g)		Digestibilidade aparente (%)		Valor biológico aparente	
	verde	seco	verde	seco	verde	seco	verde	seco
Maya Normal	1,9 $\pm$ 0,29	1,2 $\pm$ 0,21	1,6	1,1	78,6	73,0	69,6	50,8
Doce Piramex	2,0 $\pm$ 0,22	1,4 $\pm$ 0,20	1,7	1,2	79,0	75,6	70,0	55,0
Maya Opaco	2,6 $\pm$ 0,20	2,5 $\pm$ 0,24	1,9	1,8	80,0	79,0	74,0	70,7
Nutrimaiz	2,75 $\pm$ 0,22	2,6 $\pm$ 0,20	2,0	1,9	80,6	79,5	74,4	73,8
Caseína	2,9 $\pm$ 0,25		2,1		88,4			81,0

PER - Determinado em experimentos com 28 dias de duração, usando-se ratos recém-desmamados (5 por grupo) da linhagem Wistar e dietas com 9% de proteína.

Demais parâmetros calculados a partir de material coletado (urina e fezes) durante 72h, em experimentos de balanço de nitrogênio, utilizando-se 3 ratos por dieta.

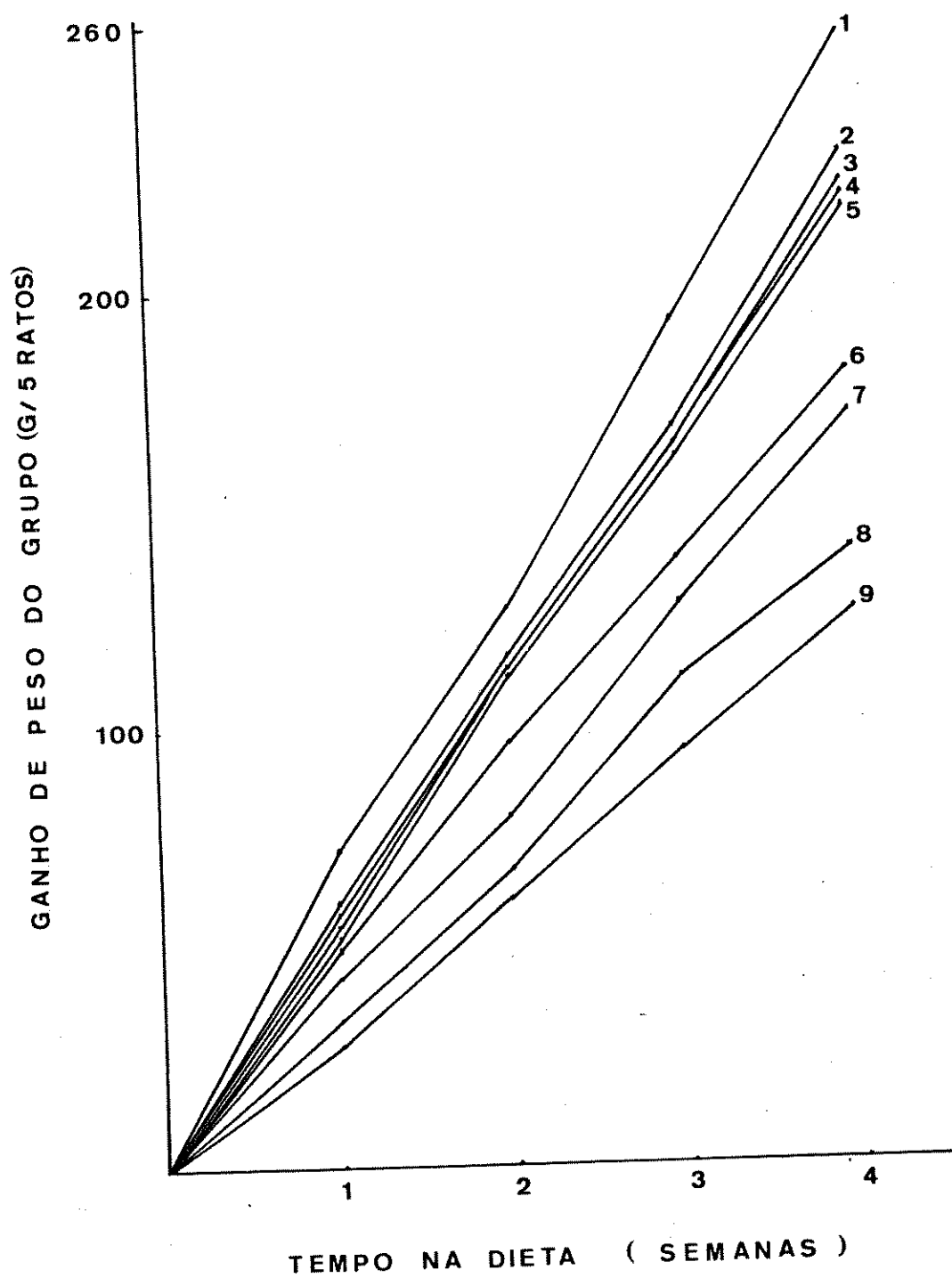


Figura 3. Curvas de crescimento dos ratos (variedade Wistar) recém-desmamados em dietas contendo caseína e farinha de milho, de 4 cultivares em dois estágios de maturação, como única fonte de proteína: 1, Caseína; 2, Nutrimaiz verde; 3, Maya Opaco verde; 4, Nutrimaiz seco; 5, Maya Opaco seco; 6, Doce Piramex verde; 7, Maya Normal verde; 8, Doce Piramex verde; 9, Maya Normal seco.

de.

Para melhor interpretação das variações ocorridas nas curvas de crescimento das diferentes dietas, os resultados foram analisados estatisticamente através da aplicação da análise de variância e Teste de "Student", e os resultados podem ser observados no Quadro XIV. A análise de variância para as quatro variedades em dois estágios de maturação mostrou que existe diferença ao nível estatístico de 1% entre as variedades Nutrimaiz e Maya Opaco em relação ao Maya Normal e ao Doce Piramex e que não houve diferença significativa dentro de cada variedade entre os estágios de maturação verde e seco.

Aplicação do Teste de "Student" para avaliação das diferenças entre médias resultou nos valores críticos de "t" 13,58 para o nível de significância de 5% e 18,31 para o nível de 1%, significando que qualquer diferença entre médias (Quadro XIV) igual ou maior que os valores críticos de "t" é estatisticamente significativa.

Assim, as variedades Maya Normal e Doce Piramex diferiram da caseína ao nível de significância de 1%, no estágio seco, e ao nível de 5% no estágio verde. As variedades Maya Opaco e Nutrimaiz não diferiram estatisticamente da caseína em nenhum dos dois estágios de maturação. O Nutrimaiz diferiu do milho Doce Piramex ao nível de significância de 1% nos dois estágios de maturação, não diferindo, contudo, do Maya Opaco.

Quadro XIV. Ganho médio de peso de ratos submetidos a dietas contendo farinha de quatro cultivares de milho, em dois estágios de maturação, como única fonte protéica, comparados com a dieta padrão de caseína.

Fonte Protéica	Ganho de peso * (g)
Caseína	51,2
Nutrimaiz verde	45,9
Nutrimaiz seco	44,1
Maya Opaco verde	44,6
Maya Opaco seco	43,4
Doce Piramex verde	36,0
Doce Piramex seco	28,0
Maya Normal verde	34,0
Maya Normal seco	25,2

* Valores representam a média de ganho de peso (28 dias) de cinco ratos.

Valor crítico "t" 5%, 13,58

1%, 18,31

INTERAÇÃO GENOTÍPICA, ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO

Os resultados da composição centesimal indicaram diferenças entre variedades, acentuadas com o amadurecimento, o que reflete uma profunda modificação nos componentes do grão durante o desenvolvimento da semente de milho, e que parecem estar diretamente relacionadas com os respectivos genótipos para endosperma.

Os valores encontrados para os diversos componentes foram expressos em base seca para efeito de comparação entre variedades, devendo-se levar em conta que os valores reais são bem diferentes, principalmente para o milho verde, cujo teor de umidade corresponde a cerca de 70% do peso do grão. Sendo assim, podemos considerar que o milho é um alimento principalmente energético, embora apresente vários dos principais componentes nutricionais desejáveis de um alimento, cujos teores variam com o amadurecimento, o que significa que algumas características podem ser alteradas durante este processo.

Os dados encontrados mais frequentemente na literatura referem-se à composição do milho normal seco e os valores determinados em nosso trabalho, para este milho (Maya Normal), estão dentro da faixa de valores descritos por vários pesquisadores (Earle e col., 1956, Bressani e Conde, 1961, Shukla, 1975). Bressani e Conde (1961) estudaram, ainda, a variação na composição química do milho Normal em diferentes estágios de desenvolvimento e verificaram que, com o amadurecimento, havia diminuição nas porcentagens de proteína (13,3 a 11,0), nitrogênio não

protéico (1,25 a 0,1), cinza (2,7 a 1,3) e fibra (5,9 a 3,3), e aumento nas de carboidrato (76,0 a 79,5) e de lípide (2,1 a 4,9). Estes valores referem-se, respectivamente, ao 23º e ao 65º dias após floração, considerados os mais aproximados em relação aos estágios de maturação das variedades estudadas neste trabalho, colhidas aos 20º e 60º dias após polinização.

As variedades Doce Piramex e Nutrimaiz caracterizaram-se pelo alto teor de lípidos, sendo que esta última apresentou ainda alto teor de nitrogênio não protéico (NNP). Resultados semelhantes foram descritos por Sgarbieri e col. (1977). Embora o teor de NNP não seja muito significativo em nenhuma das variedades no estágio seco, aparece em níveis apreciáveis no milho verde, principalmente nas variedades Maya Opaco e Nutrimaiz. Este fato se torna mais significativo se considerarmos a composição da fração aminoácidos livres presente no milho. Segundo Sodek e Wilson (1971) os aminoácidos livres do endosperma do milho Normal seco se apresentam com um perfil característico, diferente do encontrado em qualquer das frações protéicas do endosperma, com teores mais elevados de ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina, glutamina e prolina, que contribuem com a maior parte do nitrogênio desta fração, enquanto a leucina, que é muito abundante nas frações protéicas, aparece como um dos menores componentes desta fração. O milho Opaco apresentou ainda, um incremento de 68% no teor de lisina, em relação ao Normal. Misra e col. (1975c) também verificaram um aumento no teor de aminoácidos livres e lisina no Opaco em comparação com o Normal (estágio seco) e em todos os duplo-mutantes em que o gene opaco-2 foi introduzido. Por exemplo, a introdução do gene opaco-2 em uma linhagem de milho Doce proporcionou um aumento

de 54% no teor de aminoácidos livres do duplo mutante (suO_2). Nossos resultados (Quadro V) indicaram um aumento de 60% no teor de NNP do milho Nutrimaiz (suO_2) em relação ao Doce Piramex (suO_2).

Estas características do duplo-mutante (Nutrimaiz) indicam uma influência dos diferentes genótipos que a originaram, ou seja, o alto teor de lípides, característico da variedade Doce Piramex, e o alto teor de NNP, característico do Maya Opaco, que também parece interferir no teor de cinza. Como consequência o Nutrimaiz parece apresentar uma composição centesimal mais favorável que os demais, independente do estágio de maturação.

A influência do genótipo do endosperma pode ser observada também nas diferenças encontradas nas proporções das principais partes componentes do grão (casca, germe e endosperma), que são mais acentuadas no estágio seco. As variedades Doce Piramex e Nutrimaiz apresentaram maior proporção de germe, mesmo no estágio verde, o que poderia justificar os maiores teores de lípides encontrados nestas variedades, uma vez que existe uma correlação positiva entre tamanho de germe e teor de lípides. Esta é uma característica favorável destas variedades, principalmente se levarmos em conta que o germe é o principal reservatório de lípidos da semente e que no milho estes apresentam boa composição em ácidos graxos (Weber, 1978). Da mesma forma, podemos correlacionar a menor proporção de endosperma destas variedades com uma menor velocidade de maturação (Andrew e col., 1944). Mangelsdorf, em 1926, já havia lançado a hipótese de que o desenvolvimento do endosperma do milho é alcançado em condições normais de síntese de amido, sendo que as diferentes variedades de milho seguem o mesmo padrão de crescimento, mas com diferentes pontos finais de

crescimento. Segundo Hansen e col. (1946), a mesma analogia poderia ser feita para a síntese de carboidratos, menor nas variedades doces (Doce Piramex e Nutrimaiz em nosso trabalho), que armazenam boa parte destes na forma de polissacarídeos solúveis. A menor velocidade na maturação destas variedades traz, como consequência, menor síntese de zeína, melhorando as suas características nutricionais. Dados de Silva e col. (1978) confirmaram essa teoria, pois a variedade Nutrimaiz é caracterizada pelo alto teor de polissacarídeos solúveis em água (WSP) e baixo teor de zeína, embora este último seja devido principalmente à influência do gene opaco-2, que também propicia um maior aumento de proteínas do germe, diminuindo as do endosperma.

Hamilton e col. (1951) e Schneider e col. (1952) já haviam notado que as condições de cultivo afetam o teor de cada parte componente e as respectivas porcentagens de proteína e óleo. Como as quatro variedades em estudo foram cultivadas nas mesmas condições, as diferenças podem ser atribuídas unicamente ao seu genótipo. Assim, as variedades que tiveram aumento na proporção de germe, às custas do endosperma, tiveram um incremento no valor nutritivo pelo aumento no teor de lípidos e proteínas salino-solúveis. Dentre as quatro variedades estudadas neste trabalho, o Nutrimaiz foi a que apresentou o maior aumento no teor de germe com o amadurecimento (2,6 vezes maior do que o encontrado no estágio verde) e diminuição mais acentuada no endosperma, embora este último seja menos importante na determinação de seu valor nutritivo, em virtude de sua composição protéica praticamente não sofrer alteração com o amadurecimento. Ao contrário, o aumento no teor de germe traz, efetivamente, um aumento no valor nutricional, devido ao aumento no teor de proteínas e, prin-

principalmente, do teor de óleo. O aumento na proporção do germe foi uma característica comum a todas as variedades estudadas, variando de 45%, para o Maya Normal, a 161%, para o Nutrimaiz, enquanto seu teor de proteína também teve um incremento de 42 a 54%. Este aumento no teor de proteínas do germe, paralelamente à diminuição das proteínas do endosperma (18 a 30%) em todas as variedades, sugere uma transferência de material protéico do endosperma para o germe durante o amadurecimento.

Schneider e col. (1951), estudando a variação na estrutura e composição de diversas variedades de milho (híbridos comerciais, milhos com alto e baixo teor de proteína ou óleo) também notaram em todas as variedades uma maior concentração de proteína no germe (18,8%), seguido do endosperma (9,4%), sendo que a casca teve a menor concentração (3,8%). O peso de cada parte no grão foi de 11,9%, 81,9% e 5,3%, respectivamente. Estes resultados indicam que, embora ocorram variações no teor e porcentagem de proteína de cada componente, conforme a variedade, este comportamento parece ser constante, ou seja, o endosperma é o componente encontrado em maior proporção, seguido do germe. A casca contribui com menos de 10% do peso total do grão seco, sendo que o germe é o componente que apresenta o maior aumento, tanto em peso como no teor de proteínas.

Melhor comparação de nossos resultados pode ser feita com os descritos por Hamilton e col. (1951) para o milho Norma seco. As porcentagens em peso de 5, 10 e 84% para casca, germe e endosperma podem ser comparadas com os dados por nós obtidos de 6,6, 9,7 e 83,7%, respectivamente. Os teores de proteínas do germe e do endosperma encontrados por Hamilton e col. foram 17,4% e 13,9%, enquanto que os encontrados em nosso trabalho fo

ram de 19,5% e 10,5%, respectivamente, para o Maya Normal. Trabalhos de Mertz (1963) e Wolf e col. (1975) citam valores intermediários, indicando que houve boa concordância entre nossos resultados e os citados na literatura.

PROPORÇÕES RELATIVAS DAS DIFERENTES FRAÇÕES PROTÉICAS

A variação na proporção das frações protéicas do endosperma do milho Normal, durante a maturação, é o fator mais importante na determinação do seu baixo valor nutricional. Este fato se deve ao grande aumento na fração zeína, em detrimento das frações salino-solúveis, paralelamente ao desenvolvimento do grão (Zeleny, 1935, Bressani e Conde, 1961, Murphy e Dalby, 1971, Landry e Moureaux, 1976).

Murphy e Dalby (1971), estudando as modificações nas frações protéicas do endosperma dos milhos Normal e Opaco, notaram que inicialmente, as proteínas salino-solúveis representavam a maior fração nos dois genótipos e que, com o desenvolvimento, havia uma diminuição acentuada desta fração, em menor intensidade no milho Opaco, onde contribuía com 21% da proteína total do endosperma maduro, comparado com 6% no Normal. Esses autores verificaram também que a fração glutelina tornava-se a principal fração, em ambos, no começo do desenvolvimento, mantenendo sua importância até a maturidade do grão, contribuindo com maior proporção no milho Opaco e, embora a velocidade de aumento da glutelina seja igual nos dois genótipos, há uma diluição progressiva destas proteínas por material semelhante à zeína, no milho Normal, diminuindo o teor de glutelina "verdadeira", com o amadurecimento. Este fato foi confirmado em estudos de Landry

e Moureaux (1970), que denominaram glutelina 1 à fração semelhante à zeína. A fração zeína aumentou continuamente até a maturidade no endosperma do milho Normal, em contraste com o do Opaco, onde não contribuiu com mais de 15% da proteína total, havendo, portanto, uma redução na síntese de zeína, que não apareceu no grão até o 15º DAP no milho Opaco, enquanto no Normal aumentou continuamente a partir do 10º DAP. Segundo Misra e col. (1975b), o teor de zeína encontrado no endosperma do milho Normal no 10º DAP só é alcançado no Opaco no 21º DAP. Este fato, aliado à menor velocidade na síntese de zeína, reduz sua produção total a menos de 50% no Opaco em relação ao Normal.

Landry e Moureaux (1976), em estudo comparativo do desenvolvimento do grão de milho Normal e Opaco, verificaram que a dinâmica de acumulação das frações protéicas durante o desenvolvimento do grão de milho Normal podia ser dividida em quatro fases: 1) onde estão presentes as proteínas salino-solúveis e glutelina 3; 2) onde todas as proteínas são acumuladas; 3) caracterizada por um lento declínio nas proteínas salino-solúveis, paralelamente ao aumento das glutelinas; e 4) máxima modificação das proteínas salino-solúveis, que sofrem um declínio abrupto, enquanto a glutelina 3 aumenta. No desenvolvimento do grão de milho Opaco também houve uma relação linear entre o teor das frações protéicas e a proteína total, mas com diferenças na dinâmica de acumulação de várias frações: a fase 1 é a mais importante e suas proteínas são sintetizadas em maior quantidade em relação ao total, em comparação com o Normal. As fases 2, 3 e 4 não são diferenciadas, sendo que o grão de milho Opaco acumula, da fase 2 até a maturidade, o mesmo teor de proteína total que o Normal sintetiza na fase 2. Isto significa que o Opaco tem menor

teor de proteínas álcool-solúveis quando maduro, decorrente da ação inibitória do gene o_2 na síntese de zeína.

É interessante notar que a introdução do gene o_2 em linhagens de milho Doce tem a capacidade de reduzir ainda mais o teor de zeína, como pode ser verificado comparando-se a proporção das diferentes frações protéicas do milho Nutrimaiz com a do Maya Opaco, obtidas neste trabalho. Resultados semelhantes foram descritos por Misra e col. (1975a) que verificaram que a combinação dos genes su e o_2 proporcionava um aumento na concentração de proteínas salino-solúveis e glutelina 3 e uma supressão quase completa da síntese de zeína. Mais importante seria o fato de que esta característica se mantém ao longo de todo o processo de maturação, aliado ao fato de que a diminuição das proteínas salino-solúveis, além de ter sido menor em relação às demais variedades, é compensada pelo maior aumento da fração glutelina 3 que, sabidamente, apresenta um perfil de aminoácidos melhor do que as demais glutelinas e do que a zeína.

Em relação às demais variedades estudadas, as pequenas diferenças observadas entre o Maya Normal e o Doce Piramex já foram citadas anteriormente por Hansen e col. (1946) e Misra e col. (1975a), que também verificaram um teor ligeiramente menor de zeína para a variedade Doce em relação à Normal. Em termos numéricos, torna-se mais difícil uma comparação direta de nossos resultados com a maioria dos encontrados na literatura, onde os estudos comparativos sobre a variação no teor das frações protéicas durante o desenvolvimento do grão foram feitos utilizando-se apenas o endosperma da semente e diferentes métodos de extração. No entanto, pode-se verificar que houve um comportamento semelhante, conforme a variedade, ou seja, as va-

riedades Maya Normal e Doce Piramex foram caracterizadas pelo grande aumento no teor de zeína, durante o amadurecimento, enquanto os mutantes Maya Opaco e Nutrimaiz (duplo-mutante onde o gene o_2 foi introduzido) apresentaram melhor distribuição das frações protéicas com o amadurecimento, com diminuição da síntese de zeína e aumento da glutelina 3 e menor diminuição no teor das proteínas salino-solúveis. Alguns pesquisadores (Mossé e col., 1966 e Landry e Moureaux, 1970) utilizaram o grão integral em seus estudos de fracionamento, o que permitiria uma comparação direta dos resultados descritos por estes autores com os obtidos em nosso trabalho. Mossé e col. (1966) utilizaram o método clássico de Osborne para extração fracionada das proteínas de duas variedades de milho (Normal e Opaco), no estágio seco, obtendo tres frações: salino-solúvel (Normal, 21% e Opaco, 39%), zeína (Normal, 44% e Opaco, 18%) e glutelina (Normal, 35% e Opaco, 43%). A glutelina corresponde à soma das glutelinas obtidas pelo método de Landry e Moureaux, utilizado nesta pesquisa, para a qual obtivemos os seguintes valores: Maya Normal 36,4% e Maya Opaco 43,1%. Os resultados descritos por Landry e Moureaux (1970) para o milho Normal seco foram: Albuminas mais Globulinas, 19% (Maya Normal, estudado neste trabalho, 16%); zeína, 38% (Maya Normal, 40%); glutelina 1, 11,5% (Maya Normal, 13,2%); glutelina 2, 10% (Maya Normal, 9,2%) e glutelina 3, 10% (Maya Normal, 14%). Pode-se verificar que houve boa concordância entre nossos resultados e os descritos na literatura.

A associação do gene opaco-2 com vários mutantes simples de milho tem sido fartamente descrita na literatura, obtendo-se vários duplo-mutantes com características superiores às variedades que os originaram. A facilidade na transferência do ge

ne opaco-2 para linhagens de híbridos comerciais ou para populações de caráter genético mais variável deve-se ao fato do caráter opaco ser de herança monogênica. Mas, deve-se procurar associações que, além de melhorarem ainda mais as características nutricionais próprias ao opaco-2, eliminem ou diminuam certos efeitos indesejáveis, associados ao gene opaco-2, como por exemplo, menor rendimento, aspecto menos desejável (devido às características do endosperma), maior suscetibilidade ao ataque de insetos. Ao que tudo indica, o Nutrimaiz representa uma associação adequada dos genes *su* e *o₂*, capaz de reter as melhores características dos genes que estavam nos tipos paternos, ou seja, características nutricionais superiores tanto em relação aos componentes nitrogenados (herdados do Maya Opaco) como dos carboidratos e maior teor de lípidos (herdados da variedade Doce), apresentando ainda, melhores características agrônômicas, sensoriais e industriais.

VARIAÇÃO NA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DAS FRAÇÕES PROTÉICAS

A extração fracionada das proteínas, baseada na diferença de solubilidade em diferentes solventes, pressupõe diferenças significativas em sua composição, que podem ser facilmente evidenciadas comparando-se a composição em aminoácidos das diferentes frações protéicas presentes no grão de milho. Verifica-se que cada fração tem características específicas, relacionadas com a concentração de determinados aminoácidos e que, embora ocorram variações no teor destes aminoácidos com a maturação, estas características são mantidas, mesmo quando as proteínas são provenientes de variedades diferentes. Como cada fração

protéica é composta de vários peptídeos, as pequenas diferenças que se notam entre variedades poderiam ser explicadas por diferenças no teor de alguns peptídeos, que estariam diretamente relacionadas com o genótipo, mas que não alterariam sua composição global. Este fato já foi evidenciado para a fração zeína, em estudos comparativos de síntese e composição no milho Normal e Opaco (Lee e col., 1976, Jones e col., 1977; Righetti e col., 1977), onde se verificou que havia supressão na síntese dos principais peptídeos que compõem a zeína no milho Opaco, sem que esta perdesse suas características de solubilidade e composição.

De um modo geral, parece que a composição de cada fração se torna mais definida e, portanto, mais próxima de frações iguais provenientes de outras variedades. no estágio de milho seco, sugerindo que durante o processo de maturação ocorram modificações na síntese de determinados peptídeos que a compõe. Por exemplo, as albuminas e globulinas caracterizaram-se por apresentarem uma composição aminoacídica muito boa, contendo todos os aminoácidos essenciais em proporções balanceadas (embora apareçam diferenças no teor de vários aminoácidos). Mas, diferenças entre estas duas frações, que foram uma característica constante em todas as variedades, foram evidenciadas somente no estágio seco e estão relacionadas com os seguintes aminoácidos: alanina, glicina, prolina, ácido aspártico e treonina, que aparecem em maior proporção nas albuminas, e histidina, arginina e ácido glutâmico, em maior teor nas globulinas. O fato de não haver dependência da composição global da fração em relação à variedade já havia sido verificado por Sodek e Wilson (1971), que compararam a composição das albuminas e globulinas dos milhos Normal e Opaco e verificaram uma grande semelhança entre

cada proteína proveniente dos diferentes genótipos, embora seus resultados não evidenciem diferenças significativas entre as duas proteínas. Outros pesquisadores (Baudet e col., 1966 e Paulis e Wall, 1969) citam diferenças entre as albuminas e as globulinas que incluem os aminoácidos referidos neste trabalho.

A zeína foi caracterizada por níveis muito baixos de aminoácidos básicos, principalmente a lisina, ausência de triptofano e níveis muito altos de ácido glutâmico, prolina e leucina, independente da variedade estudada. Resultados semelhantes foram descritos por Baudet e col. (1966), Sodek e Wilson (1971) e Misra e col. (1976a). O alto teor de leucina é responsável pela relação leucina/isoleucina muito alta encontrada nesta fração. Esta mesma relação é verificada na glutelina 1, que apresentou uma composição global que se assemelha à zeína, porém difere desta última por apresentar diferenças no teor de alguns aminoácidos, com maior teor de metionina, histidina, prolina e menor de ácido aspártico, leucina e isoleucina, independente da variação estudada. A principal característica desta fração foi o alto teor de metionina, que é bastante diluído na composição protéica global do grão, pois mesmo no estágio seco esta fração contribuiu com cerca de 10% da proteína total, ao contrário da zeína, cuja composição se reflete na composição global da semente, como pode ser verificado nos milhos Maya Normal e Doce Pira-mex, onde contribuiu com cerca de 40% da proteína total no estágio seco. A fração glutelina 2 apresentou uma composição intermediária entre as proteínas álcool-solúveis e glutelina 3, e sua principal característica foi o alto teor de histidina. Misra e col. (1976a) relataram valores de 8,2 a 9,6 para o milho Normal seco e 7,6 a 9,0 para mutantes com alto teor de lisina, também no estágio seco. Isto significa que, embora ocorram pe-

quenas diferenças entre variedades, todas apresentaram alto teor deste aminoácido, mantendo-se a característica desta fração, independente da variedade. Nossos resultados, relativos ao milho no estágio seco, foram inferiores aos descritos por estes autores, com exceção da variedade Doce Piramex, que apresentou valor 9,1 para histidina. Assim, embora o teor desta fração represente menos que 10% da proteína total do grão, acreditamos que o alto teor de histidina é significativo na determinação do aumento da concentração deste aminoácido na composição da proteína total do grão.

O fato de a glutelina 1 ter uma composição semelhante à da zeína e a glutelina 2 apresentar uma composição intermediária (mais relacionada com a Glutelina 3), parece sugerir funções específicas, distintas da zeína e da glutelina 3, consideredas como proteínas de reserva. É provável que estas frações "intermediárias" funcionem como pontos comuns na interação entre as estruturas da zeína e glutelina 3, auxiliando na manutenção de sua disposição estrutural no grão.

A fração glutelina 3 apresentou uma composição em aminoácidos mais favorável, superada apenas pelas proteínas salino-solúveis. Suas características mais importantes foram o alto teor de triptofano e lisina, associado a um teor relativamente alto de isoleucina, tornando a relação leucina/isoleucina mais favorável. Segundo Misra e col. (1976a), o aumento desta fração, juntamente com o das proteínas salino-solúveis, ambas com alto teor de lisina, constitui o principal fator responsável pelo alto teor de lisina de vários mutantes que apresentam esta característica em sua composição global de aminoácidos.

O fato de os valores encontrados por nós relativos

aos aminoácidos sulfurados estarem muito abaixo do esperado, principalmente para as frações glutelinas, deve-se às perdas durante a hidrólise e às condições alcalinas de extração, que favorecem sua destruição (Blackburn, 1968). Quando as frações zeína e glutelina (milho Normal seco) foram reduzidas e alquiladas antes da hidrólise, a análise de aminoácidos forneceu os seguintes resultados para metionina e cistina, respectivamente: zeína, 1,6 e 1,7; glutelina 1, 7,9 e 5,0; glutelina 2, 1,0 e 5,3 e glutelina 3, 3,9 e 2,7 (Misra e col., 1976a).

Os valores de triptofano são raramente expressos nas composições em aminoácidos citadas na literatura, mas nossos resultados parecem estar de acordo com as características gerais apresentadas para cada fração, ou seja, as frações álcool-solúveis são 100% deficientes, enquanto as frações salino-solúveis e glutelina 3 apresentaram valores médios de 1%, que corresponde à proporção indicada como ideal para este aminoácido (FAO/OMS, 1973). Lloyd e Mertz (1958) relataram valores de 1% para a glutelina total. A glutelina 2, como era de se esperar, apresentou valores intermediários entre as demais frações. Isto indica que o aumento das proteínas salino-solúveis e glutelina 3, durante o desenvolvimento da semente de mutantes de milho, também é o principal responsável pelo aumento no teor de triptofano na composição global do grão, da mesma forma que para a lisina.

Estes fatos são extremamente importantes quando verificamos o teor de cada fração protéica nas diferentes variedades e estágios de maturação estudados em nosso trabalho. O fato de todas as variedades apresentarem maior teor de proteína salino-solúveis no estágio verde seria o principal responsável pela melhor composição global das farinhas, já que as glutelinas, nesta fase,

ainda estão em proporções relativamente baixas, assim como a zeína. É de se esperar, portanto, que as variedades que tiveram maior aumento na glutelina 3, concomitantemente com menor aumento de zeína e menor diminuição de albuminas e globulinas, apresentem melhor composição global após amadurecimento. Isto pode ser verificado na composição em aminoácidos das farinhas de milho, expressas no Quadro VII. Pode-se notar que houve boa correlação entre o teor das diferentes proteínas de cada variedade com a composição das farinhas, levando-se em conta o estágio de maturação. As farinhas das variedades Maya Opaco e Nutrimaiz apresentam melhor perfil de aminoácidos, com maior teor de lisina, triptofano, treonina, entre outros, além de apresentar uma relação leucina/isoleucina mais favorável, em comparação com as demais. Esta é uma característica muito importante, decorrente do fato de que existem evidências de que a pelagra pode ser induzida por uma relação desfavorável de leucina/isoleucina, sendo que um aumento no teor de isoleucina melhora o efeito antagonístico da leucina na conversão de triptofano em niacina (Gopalan, 1968, Hanks e col., 1971). Os valores relativamente baixos de cistina, principalmente na farinha de milho Doce Piramex, devem ser consequência da instabilidade da cistina e cisteína durante a hidrólise ácida, principalmente na presença de carboidratos (Blackburn, 1968).

A maioria dos trabalhos citados na literatura referem-se a determinações feitas com as proteínas do endosperma da semente ao invés do grão integral, uma vez que as proteínas do germe não sofrem alterações qualitativas por modificações genéticas. Portanto, surgem diferenças no teor de vários aminoácidos, conforme expressos em relação ao endosperma ou ao grão integral.

Mertz (1968), comparando a composição em aminoácidos do endosperma com a do grão integral, para uma mesma variedade de milho, verificou que os aminoácidos que aparecem em maior teor nas frações salino-solúveis têm seu valor aumentado quando expressos em termos da composição da farinha integral. Isto se deve ao fato de as proteínas do germe serem constituídas basicamente de proteínas salino-solúveis. Por exemplo, a lisina apresentou valores de 1,6 quando expressa em relação à composição do endosperma e de 3,0 para o grão integral de uma linhagem Normal, estágio seco (Mertz, 1968). Apesar de estas diferenças não permitirem uma comparação direta de nossos resultados com os descritos na literatura, referentes à composição do endosperma, algumas observações se tornam interessantes. Mertz (1968) verificou que o endosperma do milho Opaco apresentou duas vezes mais lisina e triptofano e 50% mais arginina, ácido aspártico e glicina e 30% menos de alanina e leucina, concluindo que estas modificações eram causadas principalmente pela diminuição do teor de zeína. A essa mesma conclusão chegaram Mertz e col. (1964) e Misra e col. (1975b), sendo que o resultado das determinações de aminoácidos (Mertz e col., 1964) levaram à conclusão de que esta mesma relação era obtida quando se comparavam a composição da zeína com a da glutelina. Portanto, as diferenças na composição global dos endospermas normal e opaco seriam uma consequência direta da inversão na razão zeína/glutelina.

Melhor comparação de nossos resultados pode ser feita com os de Bressani e Mertz (1958), Baudet e col. (1966), para o milho Normal seco, e Mertz (1968) para as variedades Normal e Opaco. Estes autores relataram a composição em aminoácidos das farinhas do grão integral, com as quais os nossos apresentaram boa

concordância. Bressani e Mertz (1958) relataram valor de 0,47 para o triptofano do milho Normal seco (0,4 em nossa pesquisa, para o Maya Normal) e Mertz (1968), 0,7 para o Normal e 1,3 para o Opaco (1,2 para o Maya Opaco). Misra e col. (1975a) encontraram os seguintes valores de triptofano para o endosperma de quatro variedades de milho seco: Normal, 0,3; Doce, 0,3 (0,4 em nossa pesquisa, para o Doce Piramex); Opaco, 0,8 e Doce-Opaco, 0,8 (0,9 para o Nutrimaiz). Com exceção do valor encontrado por Mertz (1968) para o milho Normal, os demais apresentaram boa concordância com os encontrados e relatados neste trabalho.

VALOR NUTRITIVO

As características nutricionais das diferentes farinhas de milho foram determinadas através dos ensaios de PER e balanço de nitrogênio. Embora o teste de PER tenha recebido diversas críticas (Pellet, 1978, Steinke, 1977, Hackler, 1977), a escolha deveu-se, primeiro, à sua simplicidade e, segundo, porque, apesar das deficiências conhecidas, é ainda um método bastante utilizado e a maioria dos resultados das avaliações biológicas descritas na literatura, referentes a estudos nutricionais comparativos com animais, utilizando o milho como fonte de proteína, são expressos em termo de PER e balanço de nitrogênio. Como as condições durante os nossos experimentos foram mantidas estritamente idênticas, acreditamos que as diferenças mais significativas possam ser atribuídas principalmente às características particulares de cada variedade, relacionadas com os respectivos genótipos.

Os dados obtidos nos ensaios biológicos e determinações químicas sugerem que as variedades Nutrimaiz e Maya Opaco têm qua

lidades nutricionais melhores do que as demais, com características muito próximas às da caseína. É interessante notar que em relação à capacidade de promover crescimento em ratos não houve diferença significativa (estatisticamente) entre estas variedades e a caseína, mesmo no estágio seco. Embora os resultados da análise de variância não tenham revelado diferença significativa entre os estágios de maturação para uma mesma variedade, as diferenças de médias para o ganho de peso total das quatro variedades no estágio verde e seco sugerem que há uma tendência para todas as variedades, principalmente a Maya Normal e a Doce-Piramex, de apresentarem melhores características nutricionais no estágio verde. Isto poderia ser melhor evidenciado pelo fato de estas duas variedades terem apresentado diferenças a níveis distintos em relação à caseína, conforme estágio de maturação, ou seja, 5% verde e 1% seco. O fato de as diferenças entre variedades, e de cada variedade em relação à caseína, tornarem-se mais acentuadas no estágio seco, parecem indicar que o principal fator determinante é a diferença nas proporções das frações protéicas encontradas neste estágio, ou seja, as variedades que apresentaram menor valor biológico, com retenção de nitrogênio, PER e capacidade de promover crescimento menores, são as que apresentaram maior teor de proteínas álcool-solúveis e menor concentração de proteínas salino-solúveis e glutelina 3. Isto estaria de acordo também com os valores encontrados para a digestibilidade aparente destes milhos, pois sabe-se que a zeína é uma proteína de baixa digestibilidade para os animais monogástricos. No entanto, no estágio verde não se verificou uma diferença significativa na digestibilidade aparente. Deve-se lembrar, porém, que o fator digestibilidade não é uma característica que advém somente da com-

posição da proteína, pois sabe-se que a presença de carboidratos (qualitativa e quantitativamente) influi no aproveitamento dos compostos nitrogenados (Allison, 1955, Young e col., 1977). Além disso, há evidências que sugerem que os ratos preferem dietas com sabor ligeiramente doce (Steinke, 1977), o que poderia influir nos níveis de ingestão (os milhos no estágio verde têm maior teor de açúcares solúveis) e nas pequenas diferenças encontradas entre os milhos Maya Normal e Doce Piramex, que não poderia ser explicadas unicamente pela diferença no teor de proteínas álcool-solúveis. Deve-se lembrar ainda que, embora a digestibilidade tenha influência no valor nutritivo, o aminoácido mais limitante é o principal fator que determina o valor nutritivo da proteína, o que estaria de acordo com o fato de as variedades que apresentaram maior teor de proteínas deficientes em lisina e triptofano terem seu valor biológico diminuído, assim como sua capacidade de promover crescimento em ratos.

Embora não se possa extrapolar diretamente destes resultados obtidos com animais, vários estudos feitos com humanos (crianças e adultos), com o milho Opaco-2, sugerem que o Nutrimaiz deve produzir efeitos iguais ou melhores do que este, podendo servir como alternativa para consumo, principalmente em regiões onde o milho é um dos principais componentes da dieta. Os resultados da avaliação nutricional sugerem também que, qualquer que seja a variedade, o milho deve ser consumido de preferência no estágio verde, e que as farinhas de milho seco, principalmente as das variedades Maya Normal e Doce Piramex, deveriam ser suplementadas com lisina e triptofano, conforme sugestão de vários autores. Além disso, o Nutrimaiz poderia perfeitamente substituir o milho Doce em produtos industrializados (p. ex., enlatados), visto te

apresentado características favoráveis tanto no aspecto nutritivo como sensorial (estudos em andamento no Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição), além de permitir maior período de colheita como milho verde, devido sua menor velocidade de acumulação de matéria seca (Silva e col., 1978).

CONCLUSÕES

O milho Nutrimaiz mostrou-se bastante superior ao Maya Normal e ao Doce Piramex quanto à composição e ao valor nutritivo apresentando-se, ainda, ligeiramente superior ao Maya Opaco. Não houve diferenças estatisticamente significativa entre o Maya Opaco e o Nutrimaiz, assim como destes em relação à ração contendo caseína, no que diz respeito à capacidade de promover crescimento em ratos.

Os dados analíticos permitiram concluir que o Nutrimaiz herdou as boas características protéicas do Maya Opaco resultando em uma acentuada repressão da síntese de zeína em favor de um aumento considerável dos teores de albuminas, globulinas e glutelina 3. As três últimas frações protéicas foram as que apresentaram melhor balanço de aminoácidos e relação leucina/iso-leucina mais adequada. Essas alterações devidas ao gene opaco-2 (o_2) refletem favoravelmente na composição aminoacídica do milho integral e, conseqüentemente, no seu valor nutritivo.

Da variedade Doce Pajimaca, o Nutrimaiz herdou as características de maior teor de açúcares solúveis, de polissacarídeos hidrossolúveis e de óleo, em relação ao Maya Normal e ao Maya Opaco.

O conjunto das características herdadas das variedades que deram origem ao Nutrimaiz, isto é, Maya Opaco e Doce Pajimac conferiram à nova variedade: melhor composição em relação às proteínas, aos carboidratos e à fração lipídica; melhor valor nutritivo; melhor textura e maturação mais lenta, com evidentes vantagens para o consumo como milho verde.

BIBLIOGRAFIA

- AACC. 1976. Approved methods of the american association of cereal chemists. St. Paul. American association of cereal chemists, Inc.. vol. 2.
- ALLISON, J.B. 1955. Biological evaluation of proteins. *Physiol. Rev.* 35:664.
- ALLISON, J.B. 1964. The nutritive value of dietary proteins. In *Mammalian Protein Metabolism* (Munro, H.N. e Allison, J.B. ed.) N. Y. Ac. Press, vol. 2, p. 45.
- ANDREW, R.H., R.A. BRINK and N.P. NEAL. 1944. Some effects of the waxy and sugary genes on endosperm development in maize. *J. Agric. Res.* 69:355.
- AOAC. 1970. Official methods of analysis, Association of official analytical chemists, 11^o ed.
- BAUDET, J., J. MOSSE and T. MOUREAUX. 1966. Étude sur les protéines du maïs. I. Composition en acides aminés des fractions azotées du grain. *Ann. Physiol. Vég.* 8:321.
- BECKER, H.C., R.T. MILNER and R.H. NAGEL. 1940. A method for determination of non protein nitrogen in soybean meal. *Cereal Chem.* 17:447.
- BECKMAN. 1973. Procedures manual 120-PM-1. Published by Spinco Division of Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, California.
- BLACK, R.C., J.D. LOERCH, L.J. Mc ARDLE and R.G. CREECH. 1966. Genetic interation affecting phytoglycogen and the phyto-

glycogen-forming branching enzyme. Genetics 53:661.

BLACKBURN, S. 1968. Amino acid determination. Methods and techniques. Wool Ind. Res. Assoc. Leeds, England. Marcel Dekker, Inc., N.Y.

BRESSANI, R. and E.T. MERTZ. 1958. Studies on corn proteins. IV. Protein and amino acid content of different corn varieties. Cereal Chem. 35:227.

BRESSANI, R. and R. CONDE. 1961. Changes in the chemical composition and in the distribution of nitrogen of maize at different stages of development. Cereal Chem. 38:76.

BRESSANI, R., L.G. ELIAS and R.A. GÓMEZ-B. 1969a. Protein quality of Opaque-2 corn evaluation in rats. J. Nutr. 97:173.

BRESSANI, R., J. ALVARADO and F. VITERI. 1969b. Evaluación, en niños, de la calidad de la proteína del maíz Opaco-2. Arch. Lat. Amer. Nutr. 19:129.

BRESSANI, R. 1972. The importance of maize for human nutrition in Latin America and other countries. In Nutritional Improvement of Maize - INCAP, pp. 5-29.

CHRISTIANSON, D.D., H.C. NIELSEN, U. KHOO, M.J. WOLF and J.S. WALL. 1969. Isolation and chemical composition of protein bodies and matrix proteins in corn endosperm. Cereal Chem. 46:372.

CLARK, H.E., P.E. ALLEN, S.M. MAYERS, S.E. TUCKETT and Y. YAMAMURA. 1967. Nitrogen balances of adults consuming Opaque-2 maize protein. Amer. J. Clin. Nutr. 20:825.

CLARK, H.E., D.V. GLOVER, J.L. BETZ and L.B. BAILEY. 1977.

Nitrogen retention of young men who consumed isonitrogenous diets containing Normal, Opaque-2 or Sugary-2-Opaque-2 corn. J. Nutr. 107:404.

CREECH, R.G. 1965. Genetic control of carbohydrate synthesis in maize endosperm. Genetics 52:1175.

CREECH, R.G. 1968. Carbohydrate synthesis in maize. Advan. Agron. 20:275.

CROMWELL, G.L., R.A. PICKETT and W.M. BEESON. 1967a. Nutritional value of Opaque-2 corn for swine. J. Animal Sci. 26:1325.

CROMWELL, G.L., J.C. ROGLER, W.R. FEATHERSTON and R.A. PICKETT. 1967b. Nutritional value of Opaque-2 corn for the chick. Poultry Sci., 56:705.

CROMWELL, G.L., R.A. PICKETT, T.R. CLINE and W.M. BEESON. 1969. Nitrogen balance and growth studies of pigs fed Opaque-2 and Normal corn. J. Animal Sci. 28:478.

DALBY, A. and I. DAVIES. 1967. Ribonuclease activity in developing seeds of Normal and Opaque-2 maize. Science 155:1573.

DIMLER, R.J. 1966. Alcohol-insoluble proteins of cereal grains. In Nutrition Society Symposium. Feder. Proc. 25:1670.

DONOVAN, J.W. 1967. Spectrophotometric observation of the alkaline hydrolysis of protein disulfide bonds. Biochem. Biophys. Res. Commun. 29:734.

DREWS, J.E., N.W. MOODY, V.W. HAYS, V.C. SPEER and R.C. EWAN. 1969. Nutritional value of Opaque-2 corn for young chicks

and pigs. J. Nutr. 97:537.

DUTRA DE OLIVEIRA, J.E. and N. SOUZA. 1972. The nutritive value of maize milled products supplemented with amino acids and mixtures of common or Opaque-2 maize. In Nutritional Improvement of Maize - INCAP, pp. 205-211.

DUVICK, D.N. 1961. Protein granules of maize endosperm cells. Cereal Chem. 38:374.

EARLE, F.R., J.J. CURTIS and J.E. HUBBARD. 1946. Composition of the component parts of the corn kernel. Cereal Chem. 23: 504.

FAO. 1978. FAO Production Yearbook.

FAO/OMS. 1973. Necesidades de Energia y de Proteinas. Informe de un Comité Especial Mixto FAO/OMS de Expertos. Roma. FAO: Reuniones sobre nutrición. Informe nº 52. Organización Mundial de la Salud, Serie de Informes Técnicos nº 522.

FREY, K.J. 1951. The interrelationships of proteins and amino acids in corn. Cereal Chem. 28:123.

GARWOOD, D.L. and R.G. CREECH. 1972. Kernel phenotypes of Zea mays L. genotypes possessing one to four mutated genes. Crop Sci. 12:119.

GIPP, W.F. and T.R. CLINE. 1972. Nutritional studies with Opaque-2 and high protein Opaque-2 corns. J. Animal Sci. 34: 963.

GOPALAN, C. 1968. Leucine and pellagra. Nutr. Rev. 26:323.

- HACKLER, L.R. 1977. Methods of measuring protein quality. A review of bioassay procedures. *Cereal Chem.* 54:984.
- HAMILTON, T.S., B.C. HAMILTON, B.C. JOHNSON and H.H. MITCHELL. 1951. The dependence of the physical and chemical composition of the corn kernel on soil fertility and cropping system. *Cereal Chem.* 28:163.
- HANKES, L.V., J.E. LEKLEM, R.R. BROWN and R.C.P.M. MECKEL. 1971. Tryptophan metabolism in patients with pellagra: problem of vitamin B₆ enzyme activity and feedback control of tryptophan pyrrolase enzyme. *Amer. J. Clin. Nutr.* 24:730.
- HANSEN, D.W., B. BRIMHALL and G.F. SPRAGUE. 1946. Relationship of zein to the total protein in corn. *Cereal Chem.* 23:329.
- IBGE. 1978. Anuário Estatístico do Brasil. Fundação IBGE.
- INGLETT, G.E. 1970. Corn in perspective. In *Corn, Culture Processing Products* (Inglett, G.E. ed.). The AVI Publishing Co. Inc. Westport, Conn.
- JONES, R.A., B.A. LARKINS and C.Y. TSAI. 1977. Storage protein synthesis in maize. II. Reduced synthesis of a major zein component by the Opaque-2 mutant of maize. *Plant Physiol.* 59:525.
- KHOO, V. and M.J. WOLF. 1970. Origin and development of protein granules in maize endosperm. *Amer. J. Bot.* 57:1042.
- KIES, C. and H.M. FOX. 1972. Protein nutritional value of Opaque-2 corn grain for human adults. *J. Nutr.* 102:757.
- LANDRY, J. and T. MOUREAUX. 1970. Hétérogénéité des glutélines

- du grain de maïs: extraction sélective et composition en acides aminés des trois fractions isolées. Bull. Soc. Chim. Biol. 52:1021.
- LANDRY, J. and T. MOUREAUX. 1976. Quantitative estimation of accumulation of protein fractions in unripe and ripe maize grain. Qual. Plant.-Pl. Fds. Hum. Nutr. XXV: 343.
- LEE, K.H., R.A. JONES, A. DALBY and C. Y. TSAI. 1976. Genetic regulation of storage protein content in maize endosperm. Biochem. Genetics. 14:641.
- LLOYD, N.E. and E.T. MERTZ. 1958. Studies on corn proteins.III. The glutelins of corn. Cereal Chem., 33:156.
- LOHDA, M.L., K.N. SRIVASTAVA, H.O. GUPTA, B.O. EGGUM, S.L. MEHTA and J. SINGH. 1976. Nutritive value of Normal and Opaque-2 maize. Current Sci. 45:287.
- MANGELSDORF, P.C. 1926. The genetics and morphology of some endosperm characters in maize. Conn. Agr. Expt. Sta. Bull. 279.
- MERTZ, E.T. and R. BRESSANI. 1957. Studies on corn proteins. I. A new method of extraction. Cereal Chem. 34:63.
- MERTZ, E.T., N.E. LLOYD and R. BRESSANI. 1958. Studies on corn proteins. II. Electrophoretic analysis of germ and endosperm extracts. Cereal Chem. 35:146.
- MERTZ, E.T. 1963. Corn proteins. A chemical and nutritional perspective. Proc. 18th Ind. Res. Conf. Amer. Trade Assoc., Hybrid Corn Division, pp. 7-12.

- MERTZ, E.T., L.S. BATES and O.E. NELSON. 1964. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science*, 145:279.
- MERTZ, E.T., O.A. VERON and L.S. BATES: 1965. Growth of rats fed on Opaque-2 maize. *Science*, 148:1741.
- MERTZ, E.T. 1968. High lysine corn. *Agric. Sci. Rev.* 6:1.
- MERTZ, E.T. 1972. Recent improvements in corn proteins. In *Symposium: Seed Protein* (G.E. Inglett-ed.). The AVI Publ. Co. Inc. pp. 136-143.
- MISRA, P.S., E.T. MERTZ and D.V. GLOVER. 1975a. Studies on corn proteins. VI. Endosperm protein changes in single and double endosperm mutants of maize. *Cereal Chem.* 52:161.
- MISRA, P.S., E.T. MERTZ and D.V. GLOVER. 1975b. Studies on corn proteins. VII. Developmental changes in endosperm proteins of high-lysine mutants. *Cereal Chem.* 52:735.
- MISRA, P.S., E.T. MERTZ and D.V. GLOVER. 1975c. Studies on corn proteins. VIII. Free amino acid content of Opaque-2 double mutants. *Cereal Chem.* 52:844.
- MISRA, P.S., E.T. MERTZ and D.V. GLOVER. 1976a. Studies on corn proteins. IX. Comparison of the amino acid composition of Landry-Moureaux and Paulis-Wall endosperm fractions. *Cereal Chem.* 53:699.
- MISRA, P.S., E.T. MERTZ and D.V. GLOVER. 1976b. Studies on corn proteins. X. Polypeptid molecular-weight distribution in Landry-Moureaux fraction of normal and mutant endosperms. *Cereal Chem.* 53:705.

MITCHELL, H.H. 1923. A method of determining the biological value of protein. J. Biol. Chem. 58:873.

MOSSE, J. 1966. Alcohol-soluble proteins of cereal grains. In Nutrition Society Symposium. Feder. Proc. 25:1663.

MOSSE, J., J. BAUDET, J. LANDRY and T. MOUREAUX. 1966. Étude sur les protéines du maïs. II. Comparaison entre les compositions en acides aminés et les proportions mutuelles des fractions protéiques de grains normaux et mutants. Ann. Physiol. Vég. 8:331.

MOUREAUX, T. and J. LANDRY. 1968. Extraction sélective des protéines du grain du maïs et en particulier de la fraction "glutelines". C.R. Acad. Sci. 266:2302.

MURPHY, J.J. and A. DALBY. 1971. Changes in protein fractions of developing Normal and Opaque-2 maize endosperm. Cereal Chem. 48:336.

NELSON, O.E., E.T. MERTZ and L.S. BATES. 1965. Second mutant gene affecting the amino acid pattern of maize endosperm proteins. Science, 150:1469.

NELSON, O.E. 1969. Genetic modification of protein quality in plants. Advan. Agron. 21:171.

NIELSEN, H.C., J.W. PAULIS, C. JAMES and J.S. WALL. 1970. Extraction and structure studies on corn glutelin proteins. Cereal Chem. 47:501.

NILSSON, J.L.G., E. REDALEIN, I.M. NILSSON and K. FOLKERS. 1968. On the protection against infestation by corn oil. Acta

Chem. Scand. 22:97.

NBC. 1977/78. Nutritional Biochemicals Corporation Division of
ICN life Sciences Group - Diet Catalog.

OSBORNE, T.B. 1907. The proteins of wheat kernel. Carnegie
Inst. Washington, D.C.

OSBORNE, T.B. and L.B. MENDEL. 1914. Nutritive properties of
the maize kernel. J. Biol. Chem. 18:1.

PARKER, A.J. and N. KHARASCH. 1959. The scission of the sulfur-
-sulfur bond. Chem. Rev. 59:583.

PAULIS, J.W. and J.S. WALL. 1969. Albumins and globulins in
extracts of corn grain parts. Cereal Chem. 46:263.

PAULIS, J.W. and J.S. WALL. 1971. Fractionation and properties
of alkylated-reduced corn glutelin proteins. Biochim.
Biophys. Acta, 251:57.

PAULIS, J.W., and J.S. WALL. 1977. Fractionation and characteri-
zation of alcohol-soluble reduced corn endosperm glutelin
proteins. Cereal Chem. 54:1223.

PAULIS, J.W., J.S. WALL and J. SANDERSON. 1978. Origin of high
methionine content in sugary-1 corn endosperm. Cereal Chem.
55:705.

PELLET, P.L. 1978. Protein quality evaluation revised. Food
Technol. 32(5):60.

RIGHETTI, P.G., E. GIANAZZA, A. VIOTTI and C. SOAVE. 1977.
Heterogeneity of storage proteins in maize. Planta, 136:
115.

- ROBUTTI, J.L., R.C. HOSENEY and C.W. DEYOE. 1974. Modified Opaque-2 corn endosperm. I. Protein distribution and amino acid composition. Cereal Chem. 51:163.
- ROGERS, Q.R. and A.E. HARPER. 1965. Amino acid diets and maximal growth in the rat. J. Nutr. 87:267.
- SCHNEIDER, E.O., E.B. EARLEY and E.E. DETURK. 1952. Nitrogen fractions of the component parts of the corn kernel as affected by selection and soil nitrogen. Agron. J. 44:161.
- SGARBIERI, V.C., W.J. SILVA, P.L. ANTUNES and J. AMAYA-F. 1977. Chemical composition and nutritional properties of a Sugary-1/Opaque-2 (su_1/o_2) variety of maize (Zea mays L.). J. Agr. Food Chem. 25:1098.
- SHUKLA, T.P. 1975. Cereal proteins: chemistry and food applications. CRC - Critical Rev. Food Sci. Nutr. 6:1.
- SILVA, W.J., J.P.F. TEIXEIRA, P. ARRUDA and M.B. LOVATO. 1978. Nutrimaiz, a tropical sweet maize cultivar of high nutritional value. Maydica XXIII: 129.
- SODEK, L. and C.M. WILSON. 1971. Amino acid composition proteins isolated from Normal, Opaque-2 and Floury-2 corn endosperm by a modified Osborne procedure. J. Agr. Food Chem. 19:1144.
- SPIES, J.R. 1967. Determination of tryptophan in proteins. Analyt. Chem. 39:1412.
- STEINKE, F.H. 1977. Protein efficiency ratio - pitfalls and causes of variability: a review. Cereal Chem. 54:949.

- TOSELLO, G.A. 1975. Avaliação da qualidade e do conteúdo de proteína e carboidratos em mutantes selecionados para endosperma e suas duplas combinações com Opaco-2 em dois estágios de desenvolvimento em Z. mays L. Informativo del Maiz Lima, Perú, vol. 1:45.
- TRUSWELL, A.S. and J.F. BROCK. 1961. Effects of amino acid supplements on the nutritive value of maize protein for human adults. Amer. J. Clin. Nutr. 9:715.
- TSAI, C.Y., F. SALAMINI and O.E. NELSON. 1970. Enzymes of carbohydrate metabolism in developing endosperm of maize. Plant Physiol. 46:299.
- TSAI, C.Y. and A. DALBY. 1974. Comparison of the effect of Shrunken-4, Opaque-2, Opaque-7 and Floury-2 genes on the zein content of maize during endosperm development. Cereal Chem. 51:825.
- TURNER, J.E., J.A. BOUNDY and R.J. DIMLER. 1965. Zein: a heterogeneous protein containing disulfide-linked aggregates. Cereal Chem. 42:452.
- VAN DE KAMER, J.H. and L. VAN JUNKEL. 1952. Rapid determination of crude fiber in cereals. Cereal Chem. 29:239.
- WALL, J.S. 1964. Cereal proteins. In Proteins and their reactions, Symp. on Foods. (Schultz, H.W. and Anglemier, A. F. eds.), pp. 315-341. Westport, Conn. AVI Publ. Co.
- WEBER, E.J. 1978. Corn lipids. Cereal Chem. 55:572.
- WOLF, M.J., V. KHOO and H.L. SECKINGER. 1967. Subcellular

structure of endosperm protein in high-lysine and Normal corn. Science, 157:556.

WOLF, M.J., V. KHOO and H.L. SECKINGER. 1969. Distribution of subcellular structure of endosperm protein in varieties of ordinary and high-lysine maize. Cereal Chem. 46:253.

WOLF, M.J., C.C. HARRIS and G.L. DONALDSON. 1975. Corn endosperm: protein distribution and amino acid composition in Amylomaize vs. Normal dent hybrid. Cereal Chem. 52:765.

YOUNG, V.R., W.M. RAND and N.S. SCRIMSHAW. 1977. Measuring protein quality in humans: a review and proposed method. Cereal Chem. 54:929.

ZELENY, L. 1935. The distribution of nitrogen in the seed of Zea mays L. at different stages of maturity. Cereal Chem. 12:536.