

RITA DE CÁSSIA OLIVEIRA SANT'ANA

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL DE ZEINAS DO
GERMOPLASMA TROPICAL DE MILHO PARA PRODUÇÃO DE COBERTURA
COMESTÍVEL E BIOFILME

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

S232i
2012
Sant'Ana, Rita de Cássia Oliveira, 1983-
Isolamento e identificação do perfil de zeínas do
germoplasma tropical de milho para a produção de
cobertura comestível e biofilme / Rita de Cássia Oliveira
Sant'Ana. – Viçosa, MG, 2012.
xii, 108f. : il. ; (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Proteínas. 2. Zeína. 3. Milho. 4. Biofilmes. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 572.6

RITA DE CÁSSIA OLIVEIRA SANT'ANA

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL DE ZEINAS DO
GERMOPLASMA TROPICAL DE MILHO PARA PRODUÇÃO DE COBERTURA
COMESTÍVEL E BIOFILME

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 13 de julho de 2012.

Prof. Dr. Christiano Vieira Pires
(Co-Orientador)

Dra. Maria Cristina Dias Paes
(Co-Orientadora)

Prof. Dr. Washington Azevedo da Silva

Prof^ª Dra. Aline Cristina Arruda Gonçalves

Prof^ª Dra. Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientadora)

Aos meus pais

José Fausto e Avelina.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela constante presença em minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade de realização do curso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, pela minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo, à Fundação de Amparo à Pesquisa em Minas Gerais (FAPEMIG) e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do projeto.

Ao Bioagro e à Embrapa Milho e Sorgo pela oportunidade de realização do experimento.

À orientadora, Professora Dra. Maria Goreti de Almeida Oliveira, que sempre me incentivou e me concedeu a oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Agradeço de forma especial ao Professor Dr. Christiano Vieira Pires por ter confiado em mim, incentivado a realização deste trabalho e aberto tantos caminhos mas, principalmente, pela grande amizade e boas conversas.

À co-orientadora Dra. Maria Cristina Dias Paes, obrigada por permitir a participação do projeto sob sua coordenação. Obrigada pelo seu profissionalismo, paciência, compreensão e confiança depositados em mim.

Ao Prof. Washington Azevedo da Silva pelas críticas e sugestões tão importantes para o enriquecimento deste trabalho e do meu conhecimento.

A professora Monica Pirozi por disponibilizar o uso do seu laboratório e pelo grande apoio e amizade.

A professora Aline Cristina Arruda Gonçalves por aceitar participar da banca de defesa.

Agradeço à minha mãe Avelina pela dedicação e orações imprescindíveis para a minha calma na realização deste trabalho, ao meu pai José Fausto pelo apoio e interesse, e aos meus queridos irmãos Júnior e Leonardo pela amizade e compreensão. Aos meus sobrinhos Maria Eduarda e Michel por alegrarem ainda mais a minha vida.

A toda minha família que soube transformar a saudade em estímulo e confiança.

À colega de laboratório Natália Alves Barbosa pela imensa ajuda na reta final do trabalho e pela amizade e carinho fora dele. Sem você tudo se tornaria ainda mais difícil.

À aluna de iniciação científica, Michele, pela dedicação com que realizou todas as tarefas e, principalmente, pela grande amizade.

Aos colegas da Embrapa especialmente ao Carlinhos, Betânia, Camila, Lívia, Andréia, Fabiane, Carla e Ediane pelo incentivo, força e acolhida tão importantes para a execução deste trabalho.

Aos amigos Hosana, Lindaura, Pedro, Fabíola e Thiago por terem sido a minha família em Sete Lagoas.

Às irmãs de república Márcia, Kátia e Mariane pelos momentos de descontração e por me levantarem nos momentos difíceis, que não foram poucos.

Às amigas de todas as horas Izabela Montezano e Vânia Nakajima, que mesmo à distancia me salvavam dos apuros e da tristeza.

Ao Secretário do Programa de Pós-graduação Eduardo Pereira Monteiro pela amizade e prestatividade.

Aos meus colegas do Laboratório de Enzimologia Anderson, Camila, Eduardo, Fabrício, Franciny, Patrícia, Adriane, Solange e aos estagiários Flaviana, Francelina, Lídia, Rafael, Elias, Veronica pelo convívio diário e pelos momentos de descontração.

A todos que de uma forma ou de outra, contribuíram e incentivaram para a conclusão deste trabalho.

“Agradecer é admitir que houve um momento que se precisou de alguém; é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser autossuficiente”.

BIOGRAFIA

RITA DE CÁSSIA OLIVEIRA SANT'ANA, filha de José Fausto Sant'Anna e Avelina das Graças Oliveira Sant'Ana, nasceu em 24 de fevereiro de 1983, na cidade de Viçosa, Minas Gerais.

Em março de 2003, iniciou o curso de graduação em Nutrição na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, concluindo-o em março de 2007.

Em março de 2007, ingressou no Programa de Mestrado em Bioquímica Agrícola na UFV, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Magister Scientiae* em julho de 2008, com a defesa da dissertação.

Em agosto de 2008, iniciou o Curso de Doutorado em Bioquímica Agrícola na UFV, concluindo os requisitos necessários para obter o título de *Doctor Scientiae* em agosto de 2012, com a defesa da tese.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Anatomia do grão de milho e suas partes	8
Figura 2. Estrutura química do beta-mercaptoetanol e do ácido ascórbico	33
Figura 3: Mini gel (SDS/PAGE) de zeínas extraídas pelo método de Hamaker	42
Figura 4: Mini gel (SDS/PAGE) de zeínas extraídas por diferentes métodos ...	43
Figura 5: Mini geis (SDS/PAGE) de zeínas extraídas pelo Novo Método	58
Figura 6: Mini geis (SDS/PAGE) de zeínas extraídas pelo Novo Método	59
Figura 7: Mini geis (SDS/PAGE) de zeínas extraídas pelo Novo Método	59
Figura 8: Mini geis (SDS/PAGE) de zeínas extraídas pelo Novo Método	60
Figura 9: Mini geis (SDS/PAGE) de zeínas extraídas pelo Novo Método	60
Figura 10: Mini geis (SDS/PAGE) de zeínas extraídas pelo Novo Método	61
Figura 11: Representação tridimensional da cor CIELAB	74
Figura 12: Fotografia do biofilme a base de zeína utilizando lente de aumento.	78
Figura 13: Representação tridimensional da cor CIELAB	94
Figura 14: Foto tirada antes do armazenamento das espigas sem cobertura	97
Figura 15: Foto tirada no 9º dia de armazenamento das espigas sem cobertura	97
Figura 16: Foto tirada no 9º dia de armazenamento das espigas com cobertura de zeína extraída do milho BR 473	98
Figura 17: Foto tirada no 9º dia de armazenamento das espigas com cobertura de zeína extraída do milho BRS 1060	98
Figura 18: Foto tirada no 12º dia de armazenamento das espigas com e sem cobertura de zeína extraída do milho	99

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1: Amostras utilizadas e os seus respectivos solventes de extração	36

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Porcentagem (%) do constituinte total indicado nas estruturas físicas específicas do grão de milho	11
Tabela 2: Teor de nitrogênio e proteína de amostras de milho extraídas por diferentes solventes	41
Tabela 3: Valores obtidos pela análise de espessura, cor e angulo de contato de acordo com a formulação dos biofilmes a base de zeína	77
Tabela 4: Número de amostras de milho verde para cada tratamento de acordo com o tempo a serem analisados	92
Tabela 5: Teor da perda de massa nas espigas de milho verde dos diferentes tratamentos em função do tempo de armazenamento	100
Tabela 6: Teor de pH nas espigas de milho verde dos diferentes tratamentos em função do tempo de armazenamento	100
Tabela 7: Teor de umidade nas espigas de milho verde dos diferentes tratamentos em função do tempo de armazenamento	100
Tabela 8: Teor de acidez titulável nas espigas de milho verde dos diferentes tratamentos em função do tempo de armazenamento	101
Tabela 9: Teor de sólidos solúveis totais nas espigas de milho verde dos diferentes tratamentos em função do tempo de armazenamento	101
Tabela 10: Parâmetros de cor das espigas de milho aos 9 dias de armazenamento.....	102

RESUMO

SANT'ANA, Rita de Cássia Oliveira, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Isolamento e identificação do perfil de zeínas do germoplasma tropical de milho para produção de cobertura comestível e biofilme.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-Orientadores: Maria Cristina Dias Paes, Christiano Vieira Pires, Rodrigo Siqueira Batista e Joel Antonio de Oliveira.

Prolaminas referem-se a uma classe de proteína de armazenamento solúvel em álcool presentes nos cereais, sendo que essas proteínas são chamadas zeínas no grão de milho. Esse grupo de polipeptídeos de diferente peso molecular é responsável por mais de 50% das proteínas totais do milho e é comumente extraída da farinha de glúten de milho, um subproduto do processamento de moagem a seco de milho, que contém até 70% de zeínas. Quatro tipos de zeína, α , β , γ e δ já foram identificadas, apresentando essas diferentes sequências aminoacídicas e pesos moleculares. Solução aquosa de álcool é utilizada para extrair α -zeína diretamente, ao passo que a extração das outras zeínas requer um agente redutor, principalmente o β -mercaptoetanol. Isso limita o uso direto de filmes a base de zeínas nos alimentos. Realizar o perfil cromatográfico de diferentes padrões pertencentes ao Banco Germoplasma utilizando um novo método de extração da zeína usando agente redutor não tóxico e avaliar a utilização dessa proteína isolada na produção de filmes e coberturas comestíveis. Quatro métodos diferentes de isolamento foram testados, três já publicados na literatura e um novo método com agente redutor não tóxico. O perfil das frações de proteína extraídas foi obtido por meio de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de

sódio (SDS-PAGE), sendo as zeínas extraídas utilizadas na produção de filmes e coberturas. O perfil eletroforético das prolaminas do milho permitiu identificar a presença de quatro frações de zeína nos materiais extraídos na presença de um agente redutor, não havendo nenhuma diferença desses perfis dos isolados obtidos com agente redutor não tóxico. Sendo assim, a substituição do agente redutor tóxico na extração de zeínas pode ser uma alternativa para viabilizar a aplicação de zeína extraída diretamente do grão de milho diretamente na produção de biofilmes com a finalidade de aplicação na indústria alimentícia. A cobertura de zeína ficou evidenciado que o armazenamento utilizando a cobertura de zeína foi eficiente para manter a umidade dos grãos das espigas e aumentar a luminosidade e brilho. Esse aspecto já é positivo levando em consideração que a perda da umidade das espigas gera o murchamento dos grãos e, conseqüentemente, perda na vida de prateleira dos mesmos, assim como a luminosidade melhora o aspecto visual das espigas. Sendo assim, sugere-se mais estudos com relação à composição da cobertura de zeína para que possa haver melhorias em outros aspectos de conservação.

ABSTRACT

SANT'ANA, Rita de Cássia Oliveira, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. Zein isolation of maize tropical germplasm for biofilm production and evaluation. Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-advisers: Maria Cristina Dias Paes, Christiano Vieira Pires, Rodrigo Siqueira Batista and Joel Antonio de Oliveira

Zein is a class of storage proteins soluble in alcohol present in the corn grain. It accounts for more than 50% of total protein from maize and is commonly extracted from corn gluten meal, a byproduct of dry milling of corn, which contains up to 70% of zein storage. Four types of zein, α , β , δ and μ have been identified, each with different molecular weight. Aqueous alcohol solution is used to extract α -zein directly, while the other extraction of zein storage requires a reducing agent. This limits the direct use of films based on zein storage foods. Realising the chromatographic profile of different patterns belonging to the Germplasm Bank using a new method for extraction of zein using non-toxic reducing agent and evaluate the use of this protein isolated in the production of films and coatings. Four different isolation methods were tested, three have already been published in the literature and a new method with non-toxic reducing agent. Characterization of the extracted protein fractions was performed by electrophoresis on denaturing polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) and extracted zein was used to produce films and coatings. The electrophoretic pattern of prolamine corn revealed the presence of four fractions of extracted zein materials in the presence of a reducing agent with no protein bands

difference between isolates with non-toxic reducing agent. Thus, the replacement of a reducing agent in the extraction of toxic zein storage may be an alternative to apply the zein production of biofilms for the purpose of maintenance. Considering the coverage of zein was shown that the storage using the cover of zein was effective to keep the ears of grain moisture and increase the brightness and brilliance. This positive aspect is already taking into account the loss of moisture from the spikes raises the shrinkage of the grains and hence loss of shelf life thereof, and the brightness improved visual appearance of the spikes. Thus, it is suggested further studies with respect to the composition of zein cover so that there is improvement in other aspects of conservation.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO GERAL	4
2. REFERENCIAL TEÓRICO	7
2.1. O grão de milho.....	7
2.1.1. Estrutura anatômica do milho.....	8
2.1.2. Composição Química do Grão Maduro.....	11
2.2. Zeínas.....	13
2.3. Biofilmes.....	16
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivos Gerais.....	20
3.2. Objetivos Específicos.....	20
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
CAPITULO 1: Comparação entre métodos de extração de zeínas do grão de milho utilizando diferentes solventes	28
RESUMO	29
ABSTRACT.....	30
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.1. Preparo da amostra	35
2.2. Solventes de extração das zeínas do milho.....	36
2.3. Métodos de extração de zeína	36
2.3.1. Método de Hamaker et al (1995)	36
2.3.2. Método de Landry et al (2000)	37

2.3.3. Método de Forato et al (2008)	38
2.3.4. Método Modificado	38
2.4. Caracterização das proteínas por SDS-PAGE	38
2.5. Determinação do teor de proteína	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1. Comparação entre os solventes extratores no isolamento da zeína	40
3.2. Comparação entre os métodos de isolamento de zeína	42
4. CONCLUSÕES	45
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
CAPITULO 2: Perfil eletroforético de zeínas isoladas de diferentes	
acessos de germoplasma tropical de milho	49
RESUMO	50
ABSTRACT	52
1. INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1 Preparo da amostra	56
2.2 Métodos de extração de zeína	56
2.3 Caracterização das proteínas por SDS-PAGE	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4. CONCLUSÕES	64
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
CAPITULO 3: Comparação entre biofilmes produzidos a partir de zeína..	67
RESUMO	68
ABSTRACT	69
1. INTRODUÇÃO	70
2. MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1 Elaboração dos biofilmes	73
2.2 Caracterização dos biofilmes	74
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4. CONCLUSÕES	80
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
CAPITULO 4: Avaliação de atributos de qualidade em coberturas	
coméstiveis a base de zeína aplicados em milho verde	83

RESUMO	84
ABSTRACT	86
1. INTRODUÇÃO	88
2. MATERIAL E MÉTODOS	91
2.1 Milho verde	91
2.2 Solução filmogênica	92
2.3 Preparo das bandejas.....	92
2.4 Determinações físico-químicas	93
2.5 Análise estatística	94
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
3.1 Aspecto geral das espigas de milho	96
3.2 Análises físico-químicas	99
3.3 Cor	102
4. CONCLUSÕES	104
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
5. CONCLUSÕES GERAIS	108

1- INTRODUÇÃO GERAL

A crise ambiental iniciada no século passado devido ao esgotamento de fontes naturais e ao crescimento do lixo nas grandes cidades, principalmente pelo acúmulo de embalagens plásticas, fez crescer a necessidade de materiais obtidos a partir de fontes sustentáveis que, ao mesmo tempo, não agredissem o meio ambiente após sua utilização (ORLIAC et al., 2003), uma vez que as embalagens desenvolvidas pelas indústrias são derivadas do petróleo, sendo praticamente não degradáveis (SORRENTINO et al., 2007). Uma das soluções encontradas, particularmente na área de embalagens de alimentos, foi o desenvolvimento de filmes e coberturas a partir de biopolímeros que pudessem substituir os materiais sintéticos. Esse tema tem sido apontado como de grande importância para o desenvolvimento industrial. Dentre os materiais pesquisados, os biopolímeros naturais, como os polissacarídeos e as proteínas, se apresentam os mais promissores, por serem abundantes, renováveis, econômicos, e capazes de formar uma matriz contínua (AGBOOLA e MILLS, 2005; AOAC, 1995; FORATO, 2000; GONTARD e GUILBERT, 1996). Esses biopolímeros, além de biodegradáveis, proporcionam embalagens comestíveis, quando não sujeitos a modificações químicas e quando adicionados somente de aditivos de grau alimentício (MONTERREY-QUINTERO e SOBRAL, 2000).

Os filmes biodegradáveis aparecem como uma forma de diminuir a utilização de polímeros convencionais em diversos campos de aplicação, tais como, em embalagens para alimentos. Tais filmes podem ser utilizados como único material na produção de embalagens, ou em associação a polímeros obtidos a partir do petróleo. Outra vantagem

de se obter filmes de biopolímeros biológicos é a utilização de resíduos, que normalmente são descartados no meio ambiente ou destinados a produtos de menor valor agregado (GENNADIOS, 2002).

As características estruturais e a composição química do biopolímero utilizado na elaboração dos biofilmes são muito importantes. Nesse sentido as proteínas são mais interessantes que os polissacarídeos (homopolímeros), por possuírem em sua estrutura até 20 monômeros diferentes (aminoácidos), com alto potencial de interações intermoleculares (GONTARD e GUILBERT, 1996). Segundo Cuq (1996), as propriedades funcionais (força, deformação, barreira aos gases, etc.) dos biofilmes dependem, sobretudo, do tipo de ligação intermolecular.

A zeína, um grupo de proteínas de reserva encontrados no endosperma de milho (WANG e PÁDUA, 2005), tem sido usada como um material importante na ciência e na indústria por suas propriedades únicas, uma vez que oferece vantagens potenciais como matéria prima para a produção de filmes, coberturas e aplicações plásticas; além de ser biodegradável e renovável (LAWTON, 2002). No entanto, geralmente, os biopolímeros exibem pobres propriedades mecânicas e de barreiras, as quais necessitam ser aperfeiçoadas para que eles possam ser utilizados em diferentes aplicações (SOZER, KOKINI, 2009). Essas propriedades melhoradas são geralmente alcançadas pelo espaço preenchido na matriz polimérica em comparação com os materiais convencionais. Em relação à biodegradabilidade, esses materiais também apresentam vantagens (PAVLIDOU, PAPASPYRIDES, 2008).

O isolamento da zeína foi feito pela primeira vez em 1821 e desde então tem sido objeto de grande interesse científico (SHUKLA e CHERYAN, 2001). Diferentes procedimentos utilizando diferentes solventes para extrair as proteínas dos cereais são relatados na literatura, nos quais fatores como concentração e tipo de solvente, temperatura e tempo da extração variam com o intuito de aumentar a eficiência do processo. O método usado para isolar as proteínas tem efeitos importantes nas suas propriedades (AGBOOLA e MILLS, 2005).

De acordo com o exposto, este trabalho teve o propósito de otimizar o método de extração da zeína diretamente do grão do milho com a aplicação direta de agente redutor não-tóxico, possibilitando a extração de todas as frações da mesma e permitindo a utilização do isolado na produção de filmes e coberturas comestíveis.

Considerando a existência de diversidade na composição de proteínas de diferentes genótipos do milho, pretende-se ainda caracterizar acessos de germoplasma de milho tropical, identificando o perfil eletroforético de zeínas.

2- REFERENCIAL TEÓRICO

2.1- O grão de milho

Botanicamente, o milho (*Zea mays*) é uma espécie diplóide e alógama, pertencente à família Poacea (*Gramineae*). O seu plantio originou-se, aproximadamente, de sete a dez mil anos atrás mais provavelmente na América Central, particularmente no México, de onde se estendeu ao norte do Canadá e Sul da Argentina, alcançando posteriormente a Europa. É considerado uma das plantas cultivadas mais antigas e um dos vegetais superiores mais estudados (FAO, 1992; GUIMARÃES, 2007).

O milho é uma das espécies cultivadas mais adaptadas a diferentes ambientes e sistemas de cultivo (FRIZZI et al., 2008), sendo produzido em vários países. O Brasil se encontra entre os três principais produtores de milho, atrás dos Estados Unidos da América e da China (KLEIN, 2009). Em algumas regiões, como em países da Ásia, África e América Latina o milho é a principal fonte de alimento para mais de 1,2 bilhões de pessoas (HULSHOF et al., 2007), e suas sementes podem representar até 56% do total de calorias diárias dessas populações (PRASANNA et al., 2001).

O processo de formação do grão de milho ocorre principalmente em três estágios, sendo o primeiro caracterizado pela fertilização, divisão celular e histodiferenciação dos principais tecidos, enquanto no segundo estágio ocorre grande acúmulo de proteína, lipídios e amido, que pode ser comprovado pelo aumento de matéria seca. O terceiro estágio ocorre quando as sementes ou grãos atingem o ponto de

maturidade fisiológica, que culmina com a dessecação e paralisação da deposição de reservas (RAGHAVAN,1996; ADAMS & RINNE, 1980).

A composição química do grão varia de acordo com a cultivar e com as condições do ambiente (COELHO, 1997). As propriedades composicionais (oligosacarídeos, lipídios, hormônios, enzimas, radicais livres e metabólitos intermediário) de organelas e suborganelas (mitocôndria, integridade da membrana, estrutura de cromatina e proteínas) das sementes de milho podem ser reportadas se estiverem associadas com germinação no frio e tolerância à dessecação (PERDOMO E BURRIS, 1998).

Os grãos do milho são, geralmente, amarelos ou brancos, podendo apresentar colorações variando desde o preto até o vermelho. O peso individual do grão varia, em média, de 250 a 300mg e sua composição média em base seca é 72% de amido, 9,5% proteínas, 4% de óleo e 9% fibra, sendo essa em maioria resíduo detergente neutro (PAES, 2008).

2.1.1- Estrutura anatômica do milho

Conhecido botanicamente como uma cariopse, um tipo de fruto com semente única, em que o pericarpo não se abre na secagem para a liberação da semente (WOLF ET AL., 1952), o grão de milho é formado por quatro principais estruturas físicas: endosperma, representando em média 83% de toda a matéria seca, germe (embrião) em média 11%, pericarpo (~6%) e ponta (0,8%) (Figura 1), as quais diferem em composição química e também na organização dentro do grão. O endosperma e o embrião resultam da dupla-fertilização (DUMAS E MOGESEN, 1993).

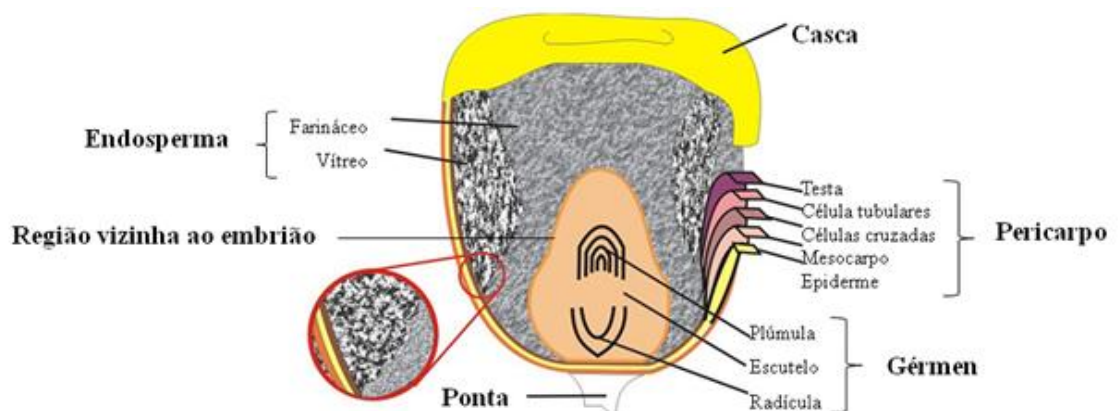


Figura 1. Anatomia do grão de milho e suas partes.

Pericarpo

O pericarpo é a parede celular do gametófito maduro e compreende as camadas celulares externas que envolvem o endosperma e o embrião (WOLF et al., 1952). Esse representa, em média, 5% do peso grão, sendo a estrutura que protege demais da elevada umidade do ambiente, insetos e micro-organismos. As camadas de células que compõem essa fração são constituídas de polissacarídeos do tipo hemicelulose (67%) e celulose (23%), embora também contenha lignina (0.1%) (PAES, 2008).

Endosperma

O endosperma é um tecido triplóide, que se forma como resultado da fusão do núcleo do pólen com dois núcleos femininos (WOLF et al., 1952). Esse tecido é constituído de 88% de amido, organizado na forma de grânulos, e 8% de proteína de reserva. Por apresentarem a maior parte do grão maduro, os componentes do endosperma são essenciais na definição das qualidades físicas e estruturais do grão de milho (GUIMARÃES, 1994).

As proteínas formam os corpos proteicos que compõem a matriz que envolve os grânulos de amido dentro das células no endosperma. Com base na distribuição dos grânulos de amido e da matriz de proteína, o endosperma é classificado em dois tipos: farináceo e vítreo. No primeiro, os grânulos de amido são arredondados e estão dispersos, não havendo matriz proteica circundando essas estruturas, o que resulta em espaços vagos durante o processo de secagem do grão, a partir dos espaços onde antes era ocupado pela água, durante o desenvolvimento do grão. Por outro lado, no endosperma vítreo, a matriz proteica é densa, com corpos proteicos estruturados, que circundam os grânulos de amido de formato poligonal, não permitindo espaços entre estas estruturas. A denominação vítreo: farináceo refere-se ao aspecto dos endospermas nos grãos quando sujeitos à luz. No endosperma farináceo, os espaços vagos permitem a passagem da luz, conferindo opacidade ao material. De forma oposta, a ausência de espaços entre os grânulos de amido e a matriz proteica promove a reflexão da luz, resultando em aspecto vítreo ao endosperma observado nessas condições. Essa propriedade tem sido aplicada para a identificação de materiais duros e farináceos, embora a vitreosidade e a dureza sejam distintas propriedades (PAES, 2008).

O endosperma é formado por quatro tipos de células: a região vizinha ao embrião, as células de transferência, o endosperma amiláceo e a camada de aleurona,

conforme apresentado na Figura 1. A região vizinha ao embrião é constituída por uma linha de células que se distribuem na cavidade do endosperma, onde o embrião se desenvolve. Essas células são caracterizadas por apresentarem um citoplasma denso (KOWLES E PHILLIPS, 1988; OLSEN, 2001; SCHELL et al., 1984), com função de nutrir o embrião e formarem uma barreira física entre ele e o endosperma, durante o desenvolvimento da semente (OLSEN, 2001).

As células de transferência estão na região basal do endosperma. Elas facilitam o transporte de metabólitos dentro do endosperma e fazem uma conexão direta com o tecido materno (OLSEN, 2001). A maior parte da sacarose que chega à base do endosperma a partir das células maternas é clivada em glicose e frutose, que se movimentam, então, para outras partes do endosperma, onde a sacarose é ressintetizada e utilizada (SOAVE E SALAMINI, 1984).

O endosperma amiláceo envolve o embrião e acumula grandes quantidades de substâncias de reserva, que são utilizadas durante a germinação da semente e nas fases iniciais da plântula. Essas reservas são depositadas em estruturas membranosas, no parênquima do endosperma amiláceo (OLSEN et al., 1992). Além de amido e proteína, o endosperma acumula lipídios, compostos orgânicos e inorgânicos em pequenas quantidades (LOPES & LARKINS, 1993).

A camada de aleurona circunda todo o endosperma amiláceo, exceto a área adjacente ao embrião e contém um grande número de corpos proteicos pequenos, oleossomos e antocianina (BECRAFT, 2000; BUTTROSE, 1963; LOPES & LARKINS, 1993; OLSEN et al., 1992).

Germe

O germe representa 11% do grão de milho e concentra quase a totalidade dos lipídios (óleo e vitamina E) (83%) e dos minerais (78%) do grão, além de conter quantidades importantes de proteínas (26%) e açúcares (70%) (PAES, 2008).

Essa fração é a única viva do grão e onde estão presentes as proteínas do tipo albuminas, globulinas e glutelinas, que diferem significativamente, em composição e organização molecular, daquelas encontradas no endosperma e, por conseguinte, diferindo das primeiras em qualidade nutricional e propriedades tecnológicas (PAES, 2008).

Ponta

A ponta é a menor estrutura, 2% do grão, e é responsável pela conexão do grão ao sabugo, sendo a única área do grão não coberta pelo pericarpo. Sua composição é essencialmente de material lignocelulósico (PAES, 2008).

2.1.2- Composição Química do Grão Maduro

A composição da semente de milho fornece valores adequados de nutrientes, pois apresenta de 70-75% de carboidratos, 3-5% de lipídeos, 9% de fibras e ao redor de 8-11% de proteínas (LANDRY et al., 2005). A concentração de minerais no grão é da ordem de 1%. Além dos nutrientes, o milho possui nos grãos várias substâncias de importância biológica, incluindo compostos fenólicos, carotenóides, tocoferóis e fitosteróis (LIU 2007). A Tabela 1 apresenta a porcentagem de cada fração dentro do grão de milho e a concentração dos nutrientes em cada uma dessas frações.

Tabela 1. Porcentagem do constituinte total indicado nas estruturas físicas específicas do grão de milho.

Fração	% grão	Amido	Lipídios	Proteínas	Minerais	Açúcares	Fibras ou conteúdo celular
		% da parte (base seca)					
Endosperma	82	98	15,3	74	17,9	28,9	
Germe	11	1,3	82,6	22,5	78,4	69,3	12
Pericarpo	5	0,6	1,3	2,6	2,7	1,0	54
Ponta	2	0,1	0,8	0,9	1,0	0,8	7,0
	100	100	100	100	100	100	

Fonte: Adaptado de Watson (2003)

Proteínas

O grão de milho é composto de cerca de 10% de proteínas (FUFA *et al.* 2003), sendo estas distribuídas no endosperma (8,5%), embrião (18,5%), pericarpo (5%) e ponta do grão (9%). A soma desses valores é que proporciona um valor médio de proteína, podendo variar com o tipo de grão, grau de germinação, fertilidade do solo e condições climáticas, ou ainda alteradas por genes mutantes (GONÇALVES et al., 2003; BJARNASAN & VASAL, 1992; TOSELLO 1987).

A qualidade da proteína do milho depende da quantidade e do balanço de aminoácidos indispensáveis, mas usualmente a composição de aminoácidos do grão

inteiro reflete a composição das proteínas do endosperma, embora as proteínas do embrião possuam um melhor balanço de aminoácidos (MITTELMANN, 2001). A qualidade da proteína do milho é semelhante à maioria dos cereais, em geral deficientes em alguns aminoácidos indispensáveis (DIAZ, 2003; FAO, 1993), sendo a lisina e o triptofano considerados o primeiro e o segundo aminoácidos limitantes, respectivamente, o que confere à sua proteína valor biológico de aproximadamente 50% em relação a uma proteína de referência, ou seja, são consideradas pobres com relação à qualidade nutricional. Assim, são intensas as pesquisas para isolamento e caracterização dessas e dos genes relacionados às mesmas para a produção de plantas transgênicas com melhor valor nutricional destinada à alimentação humana e animal (BUGS et al, 2004; MANDAL & MANDAL, 2000; YOUNG & PELLETT 1994; BRESSANI, 1991). Por exemplo, a proteína do milho especial de alta qualidade protéica ou QPM (quality protein maize) é resultado de um melhoramento genético a partir do mutante *opaque-2*. Nesse material, as quantidades dos aminoácidos lisina e triptofano encontram-se aumentadas no grão, conferindo uma qualidade nutricional superior à proteína (PAES, 2006).

Seguindo o protocolo descrito por Osborne (1924) e modificado por Landry e Moureaux (1970), as proteínas do milho e dos demais cereais estão classificadas com base na solubilidade em diferentes solventes, sendo:

- Albuminas: solúveis em água. Juntamente com as albuminas são extraídos os aminoácidos livres que estão presentes em pequenas quantidades na maioria das espécies.
- Globulinas: solúveis em soluções salinas diluídas; apresentando uma composição polipeptídica afim às albuminas.
- Prolaminas: solúveis em soluções alcoólicas a 70-80%; se constitui na maior das quatro frações, em termos de quantidade.
- Glutelinas: solúveis em soluções ácidas ou alcalinas diluídas.

As prolaminas são comuns a todos os cereais e são ricas em prolina e glutamina. A maioria das glutelinas torna-se solúveis em álcool após redução das ligações de dissulfeto, e também têm sido classificadas como prolaminas por várias semelhanças de sequência e composição de aminoácidos. Essas proteínas são altamente hidrofóbicas, devido ao seu grande teor de aminoácidos hidrofóbicos leucina, prolina e alanina e possuem baixa qualidade nutricional e por isso possuem várias aplicações

tecnológicas nas áreas agrícola, farmacêutica, de alimentos entre outras (BICUDO *et al*, 2006; SCRAMIN *et al*, 2007).

De acordo com Shewry *et al.* (1995), albuminas, globulinas ou prolaminas representam mais da metade da massa total da proteína dos grãos. As proporções dessas várias classes de proteínas diferem muito entre os diversos cereais. Essas diferenças conferem propriedades químicas, físicas, funcionais e nutricionais bastante diversas para as proteínas dos cereais. As proteínas se distribuem em todas as partes do grão, porém a maior quantidade está no endosperma onde, no milho, estão presentes mais de 75% das proteínas e predominam as prolaminas (BICUDO *et al*, 2006; SGARBIERI, 1996).

2.2- Zeínas

As zeínas são sintetizadas por polirribossomas unidos à membrana celular e são transportados ao lúmen do retículo endoplasmático rugoso das células durante o desenvolvimento do endosperma, formando os corpos proteicos e a matriz protéica, essa última que envolve os grânulos de amido no endosperma vítreo (PAES, 2006).

Constitui uma mistura de proteínas de reserva de família multigênica, encontradas predominantemente, possuindo alto conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos, não polares, que reduz a interação da superfície da água (ASSIS e LEONI, 2009; LAWTON, 2002; WANG e PÁDUA, 2005).

Compreendem quatro grupos estruturalmente distintos: α , β , γ e δ zeínas, que podem ser separadas com base no padrão eletroforético e no peso molecular (COLEMAN ET AL., 1996). A distribuição das diferentes classes de zeínas dentro dos corpos proteicos foi sugerida por LENDING & LARKINS (1989), estudando o endosperma em desenvolvimento. Observou-se que os corpos proteicos apresentam diferentes tamanhos e composição. De modo geral, eles apresentam diâmetro variando entre 1 μm a 2 μm , estando a maioria entre 0,3 μm a 1,3 μm . Nas células mais próximas da camada de aleuroma, os corpos proteicos são pequenos e contêm somente β e γ zeínas. Eles representam os estágios iniciais do desenvolvimento de um corpo proteico com, aproximadamente, 0,2 μm de diâmetro. Os corpos proteicos maiores contêm α -zeínas no centro são encontrados nas camadas de células mais centrais do endosperma. Na sua formação as α -zeínas começam a se acumular, como lóculos discretos, dentro de uma matriz de γ e β -zeínas. Ocasionalmente, os lóculos de α -zeínas fundem-se e

preenchem o centro do corpo proteico, expandindo este para um diâmetro de 1 μm a 2 μm (LENDING & LARKINS, 1989). β e γ zeínas formam uma camada mais ou menos contínua na periferia, mas, manchas pequenas de β e, mais comumente, de γ zeínas permanecem no interior. As δ zeínas são encontradas, principalmente, no centro dos corpos proteicos, junto com as α zeínas, o que indica que nem todas as zeínas ricas em enxofre estão na periferia (ESEN & STELLER, 1992).

As zeínas α são caracterizadas por duas bandas, na eletroforese, em 19KDa e 22KDa e são conhecidas como Z19 e Z22, respectivamente, constituindo de 75 a 85% das zeínas totais. A Z19 e Z22 são similares em sequência e solubilidade, diferindo apenas no tamanho. Apresentam deficiência em aminoácidos indispensáveis, como lisina e triptofano, alto teor de glutamina (25%), leucina (20%), alanina (15%) e prolina (11%) (LOPES E LARKINS, 1993; SHOTWELL & LARKINS, 1989). São proteínas ricas em resíduos de aminoácidos apolares e são, portanto insolúveis em água e solúveis em soluções aquosas de etanol a 70%.

As zeínas β correspondem às bandas de 14 e 16 kDa, representam de 10 a 15% da fração total e são solúveis em álcool hidratado após uso de agentes redutores (BICUDO *et al*, 2006). A proteína madura tem 160 aminoácidos e apresenta menos glutamina (16%), leucina (10%) e prolina (9%) do que as zeínas α , mas, apresenta mais aminoácidos sulfurados, metionina (11%) e cisteína (4%) (LOPES, 1993).

As zeínas γ , apresenta banda em 28 kDa na eletroforese, representa de 5 a 10% das zeínas totais e, para solubilização dessa proteína, tanto em álcool 70% como em água, é necessário o uso de agentes redutores de ligação de dissulfeto (BICUDO *et al*, 2006). Apresentam alto teor de aminoácidos sulfurados, sendo 23% de metionina e 4% de cisteína (LOPES, 1993).

A zeína de 10 kDa, δ zeína, equivale à banda e representa somente traços da fração total de zeínas; assim como as zeínas β , γ , são extraídas somente com redução das ligações de dissulfeto (BICUDO *et al*, 2006; SHEWRY *et al*, 1990). Apresenta 130 aminoácidos de comprimento (KIRIHARA ET AL, 1988).

Segundo a natureza hidrofóbica da zeína está relacionada com o seu alto teor de aminoácidos não-polares que reduz a interação da superfície da água. Com a presença de uma interface não-polar as moléculas de água terão dificuldades em entrar nas sementes. Esta situação pode realmente reduzir a permeabilidade (ASSIS e LEONI, 2009). Dada a esta propriedade, a zeína é considerada um polímero natural biodegradável passível de ser transformado, entre outros produtos, em filmes e películas

de revestimento, atuando como barreiras à umidade e ao oxigênio. Esses filmes vêm sendo usados na cobertura de medicamentos e alimentos *in natura*, em função da sua não toxicidade, biodegradabilidade e por serem oriundos de fontes renováveis (BICUDO *et al.*, 2006; FORATO, 2000).

Diferentes procedimentos, utilizando solventes, para extrair as proteínas dos cereais são relatados na literatura, nos quais fatores como concentração e tipo de solvente, temperatura e tempo da extração variam com o intuito de aumentar a eficiência do processo. O método usado para isolar as proteínas tem efeitos importantes nas suas propriedades (AGBOOLA e MILLS, 2005). O tratamento alcalino das proteínas pode provocar a sua desnaturação pela desestabilização das estruturas terciárias e facilitar sua solubilização. Por outro lado, o pH alcalino pode aumentar as chances de racemização dos aminoácidos e sua destruição, levando à formação de novos compostos que poderiam alterar as propriedades nutricionais e funcionais das proteínas (SGARBIERI, 1996).

Na maioria dos trabalhos sobre a extração química das proteínas de cereais, etanol e solução de hidróxido de sódio são empregados como solventes em concentrações variadas (FAGEER e TINAY, 2004; LANDRY, 1997; LANDRY e MOUREAUX, 1970; NEWMANN e WALL, 1984; PAULIS e WALL, 1977; YOUSIF e TINAY, 2000).

Boas condições de extração da zeína do grão de milho foram determinadas por SHUKLA *et al.* (2000), que extraíram as zeínas com etanol a 70% na proporção 8:1 líquido/sólido por 30-40 min a uma temperatura de 50°C. A recuperação média das zeínas foi 50,6% do total das proteínas do milho. Em outros estudos, além do etanol empregou-se também uma solução de hidróxido de sódio recuperaram 57% das proteínas do milho floculado extraídas com etanol a 45 % e NaOH a 55 % a 0,1M.

Várias enzimas têm sido utilizadas na extração enzimática de proteínas. Entre estas, encontram-se a pancreatina, as proteases alcalina, fúngica ou bacteriana (EUBER *et al.*, 1991); uma endoprotease (alcalase de grau alimentício do *Bacillus liccheniformis*); um complexo de proteases (flavourzima do *Aspergillus oryzae*) seguido de uma preparação de carboidrase do *Aspergillus aculeatus* e do *Humicola insolens* (FISCHER *et al.*, 2001); endoprotease e amilase (TANG *et al.*, 2002); α -amilase (BAN 240 L) e protease (Promozyme 400 L) (AGBOOLA e MILLS, 2005).

Capobiango *et al.*, (2006) determinou em seu trabalho a composição química e a otimização da extração protéica do fubá de milho, por diversos métodos químicos e um

enzimático, utilizando uma protease de *Bacillus licheniformis*. Observou-se que o maior rendimento da extração foi alcançado pelo método alcalino-alcoólico seqüencial (88,2%), uma vez que o emprego de uma solução alcalina, seguido de uma solução alcoólica a 70,0%, mostrou ser mais eficaz para aumentar a solubilidade das proteínas e, conseqüentemente, a porcentagem de rendimento de extração dos métodos testados. Apesar do método alcalino ter apresentado menor rendimento do que o alcalino-alcoólico seqüencial, o emprego de apenas um solvente e a eliminação da etapa de remoção de álcool o torna mais econômico. Comparando entre si os melhores resultados obtidos por dois métodos de extração, observa-se, primeiramente, que o enzimático apresentou rendimento inferior (83,5%) ao alcalino-alcoólico seqüencial (88,2%).

2.3- Biofilmes

Os alimentos, sejam de origem animal ou vegetal, são susceptíveis a alterações, as quais podem ser de ordem física, química, ou, biológica. As de ordem física são decorrentes, principalmente, em razão da ação de agentes mecânicos que causam danos como: quebras, deformações, perfurações e cortes. Além destas, outros agentes como o ar, a luz e o calor podem promover alterações de cor, aparência e sabor dos alimentos (SILVA, 2006).

A conservação de alimentos exige, normalmente, tratamentos físicos e/ou químicos. Além disso, a utilização de embalagem, rígida ou flexível, é imprescindível. Muitas embalagens flexíveis são feitas com plásticos, os quais são materiais sintéticos que, apesar de possuírem excelentes propriedades funcionais, são considerados não-biodegradáveis e estão envolvidos em problemas de gerenciamento de resíduos sólidos em escala mundial. A biodegradação do polietileno, por exemplo, é estimada em 200 anos (TORRES, 1994). As preocupações ambientais associadas à grande disposição de materiais plásticos têm proporcionado a investigação de alternativas solucionadoras em substituição ao plástico comum, principalmente no tocante à biodegradabilidade destes materiais. No Brasil, cerca de 240 mil toneladas de lixo são produzidas por dia, e a maior parte do lixo tem como destino os lixões a céu aberto, constituindo um sério problema sanitário (CEREDA et al., 2003). A adoção de programas de coleta seletiva e reciclagem é uma das alternativas e a produção de materiais biodegradáveis a partir de fontes renováveis é considerada uma forma de reciclagem (POOVARODOM e PRADITDOUNG, 2003).

Sendo assim, existe um grande interesse no desenvolvimento de biofilmes comestíveis ou degradáveis biologicamente, principalmente devido à demanda por alimentos de alta qualidade, tentativa de minimizar, diminuir ou solucionar o problema da poluição e oportunidades para criar novos mercados de matérias-primas formadoras de filme (BENGTSSON et al., 2003; PALMU, 2003). Os biofilmes podem ser utilizados para controlar a migração de água de um sistema alimentício, a permeabilidade ao oxigênio, ao dióxido de carbono, eventualmente à migração lipídica e, ainda, pode conter antioxidantes, antimicrobianos e aditivos, os quais visam retardar a taxa de deterioração quando utilizados no envolvimento de um produto alimentício (CHEN e NUSSINOVITCH, 2000).

O uso desses materiais em embalagens para alimentos vai depender, além de parâmetros como custo e disponibilidade, de suas propriedades funcionais: propriedades mecânicas (resistência e flexibilidade), propriedades ópticas (cor e opacidade), propriedades de barreira (permeabilidades ao vapor de água, ao O₂ e ao CO₂), solubilidade em água e propriedades sensoriais. Essas propriedades dependem do biopolímero usado (conformação, peso molecular, distribuição de cargas, polaridade), das condições de fabricação (pH, concentração de proteínas na solução filmogênica, tratamento térmico da solução, tipo e teor de aditivos, como os plastificantes) e das condições ambientais (temperatura e umidade relativa), importantes por causa da natureza higroscópica dos biopolímeros e do plastificante usados. Outro parâmetro que influencia as propriedades dos biofilmes é a espessura, a qual, geralmente, não é considerada em diversos estudos (CUQ et al., 1996; MAHMOUD e SAVELLO, 1992).

Os principais biopolímeros usados na elaboração de biofilmes são polissacarídeos e proteínas, cujas cadeias são longas e capazes de produzir matrizes contínuas que dão estrutura ao filme. Filmes constituídos por proteínas e polissacarídeos normalmente apresentam alta resistência mecânica e permeabilidade seletiva a gases, mas são sensíveis à umidade, sendo que aqueles elaborados apenas com lipídios são resistentes à passagem de água, mas apresentam-se opacos e quebradiços (MARTINS, 2003; PÉROVAL et al, 2002).

O uso do amido na produção de plásticos iniciou-se nos anos 70 e os primeiros estudos sobre o uso do amido em embalagens biodegradáveis foram baseados na substituição parcial da matriz polimérica sintética pelo amido. O amido é um dos polímeros naturais mais estudados devido à sua disponibilidade, biodegradabilidade e baixa custo. Entretanto, de modo geral, os biofilmes produzidos a partir de proteínas

apresentam propriedades mecânicas melhores que as dos filmes à base de polissacarídeos (BIZZOTTO et al, 2006;CHEN, 1995; MALI et al. 2004).

Filmes de proteínas podem funcionar como excelentes barreiras à umidade, oxigênio, flavors e aromas protegendo a qualidade de alimentos e outros produtos. Além disso, podem também promover proteção mecânica a alimentos e drogas e funcionar como portadores de aditivos, tais como antioxidantes e substâncias antimicrobianas (GENNADIOS, 1997; HAN, 2000; KESTER e FENNEMA, 1986). As aplicações para esses filmes são inúmeras, desde filmes para a agricultura, coberturas comestíveis e ainda podem ser associados com outros materiais para a obtenção de embalagens para alimentos, proporcionando a diminuição na utilização de materiais não biodegradáveis (THARANATHAN 2003; TROPINI et al., 2004).

O biofilme da zeína é formado através do desenvolvimento de interações de hidrogênio, hidrofóbico e limitado pontes dissulfeto entre as cadeias de zeína (GUILBERT, 1986; KROCHTA, 1997). Os filmes de zeína são frágeis e, portanto, plastificantes são necessários para melhorar a sua flexibilidade. Para torná-las mais flexíveis, plastificantes são adicionados às proteínas, e incluem: propilenoglicol, trietilenoglicol, polietilenoglicol, glicerol, ácidos levulínico e oléico, água, entre outros. Esses, no entanto, podem tornar os filmes frágeis demais para serem usados quando usados em excesso. A própria água também pode ser um plastificante para a zeína. A zeína é ainda higroscópica, significando que pode ganhar ou perder água para atingir o equilíbrio com o ar ambiente. A quantidade de água absorvida ou perdida nesses filmes é afetada pela umidade relativa do ar ambiente (LAWTON JUNIOR, 2002).

De acordo com CORRADINI et al (2007), a combinação de amido termoplástico e zeína plastificada poderia ter um grande potencial na área de plásticos biodegradáveis, uma vez que ambos podem ser processados na presença de plastificantes, de forma semelhante à maioria dos polímeros convencionais sintéticos termoplásticos. Além disso, a baixa solubilidade da zeína em água pode aumentar o caráter hidrofóbico das composições correspondentes de amido termoplástico.

Um dos processos mais amplamente utilizados na elaboração de biofilmes, é o casting, que compreende o preparo de uma solução coloidal da macromolécula com aditivos, aplicação dessa solução num suporte adequado, seguida de secagem em condições estritamente controladas. Dessa forma, para a elaboração de biofilmes a partir de novas matérias-primas biológicas, é necessário, inicialmente, a obtenção do biopolímero e o conhecimento de suas propriedades, principalmente da sua solubilidade

em água e sua capacidade de interação intermolecular (MONTERREY-QUINTERO e SOBRAL, 2000).

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Realizar o perfil cromatográfico de diferentes padrões pertencentes ao Banco Germoplasma utilizando um novo método de extração da zeína usando agente redutor não tóxico e avaliar a utilização dessa proteína isolada na produção de filmes e coberturas comestíveis.

3.2- Objetivos Específicos

- Desenvolver novo método de extração de zeína utilizando o ácido ascórbico como agente redutor.
- Comparar o novo método de extração de zeína com os métodos relatados na literatura.
- Isolar as zeínas de diferentes acessos pertencentes ao Banco Germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo.
- Realizar o perfil cromatográfico de diferentes padrões pertencentes ao Banco Germoplasma.
- Caracterizar e quantificar as zeínas isoladas.
- Produzir biofilmes e cobertura comestível a base de zeína e avaliar suas características.
- Avaliar os efeitos da aplicação de cobertura comestível a base de zeína na conservação de milho verde.

4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS C. A.; RINNE, R. M. Moisture content as a controlling factor in seed development and germination. **International Review and Cytology**, New York, v. 68, p. 1-8, 1980.

AGBOOLA, S.; NG, D.; MILLS, D. Characterization and functional properties of Australian rice protein isolates. *J. Cereal Sci.*, v. 41, p. 283-290, 2005.

ASSIS, O. B. G.; LEONI, A. M.. Protein hydrophobic dressing on seeds aiming at the delay of undesirable germination. **Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)**, Piracicaba, v. 66, n. 1, Feb. 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16. ed. Washington, 1995

BECRAFT, P. W et al. Endosperm development. In: BHOJWANI, S. S. (Ed.). **Current trends in the embryology of angiosperms**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic, p. 353-374, 2000.

BENGTSSON, M.; KOCH, K.; GATENHOLM, P. Surface octanoylation of high-amylose potato starch films. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 54, p. 1-11, 2003.

BICUDO, R. C. et al. Análise de zeínas α do milho por LC-ESI-Q/TOF. **Comunicado técnico 77** - EMBRAPA. São Carlos, SP. Novembro, 2006.

BIZZOTTO, C.S.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E.A.R.; SILVA, V.D.M.; JUNQUEIRA, R.G.; SILVESTRE, M.P.C. Hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de fenilalanina, obtidos pela ação da corolase pp e uso do carvão ativado. **Rev. Ciência e Agrotecnologia.**, 2006.

BJARNASON, M. e S.K. VASAL. Breeding of quality protein maize (QPM). **Plant Breeding Reviews**, 9 (2): 181-216, 1992.

- BRESSANI, R. Protein quality of high lysine maize for humans. **Am. Assoc. Cereal Chem.**, 36 (9): 806-811, 1991.
- BUGS, R. et al. Spectroscopic characterization and structural modeling of prolamin from maize and pearl millet. **Eur Biophys J.** 33: 335–343, 2004.
- BUTTROSE, M. Ultrastructure of the developing aleurone cells of wheat grain. **Australian Journal of Biology Science**, East Melbourne, v. 16, p. 768-774, 1963.
- CAPOBIANGO, M. *et al.* Extração química e enzimática das proteínas do fubá de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 884-890, 2006.
- CEREDA, M. P.; CASTRO, T. M. R. de; HENRIQUE, C. M. Embalagens de materiais biodegradáveis. In: WORKSHOP SOBRE TECNOLOGIAS EM AGROINDÚSTRIAS DE TUBEROSAS TROPICAIS, 1., 2003, Botucatu. **Anais...Botucatu: CERAT/UNESP**, 2003. p. 124.
- CHEN, H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 11, p. 2563-2583, 1995.
- CHEN, S.; NUSSINOVITCH, A. The role of xanthan gum in traditional coatings of easy peelers. **Food Hydrocolloids**, v. 14, n. 4, p. 319-326, 2000.
- COELHO, C. M. **Caracterização das proteínas do endosperma do milho visando à alteração das frações que controlam qualidade nutricional.** 98 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 1997.
- COLEMAN, C. E.; et al. The maize γ -zeins sequestres α -zeins and stabilizes its accumulation in protein bodies of transgenic tobacco endosperm. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 12, p. 2335-2345, Dec. 1996.
- CORRADINI E, de MEDEIROS ES, CARVALHO AJF, CURVELO AAS, MATTOSO LHC. Mechanical and morphological characterization of starch/zein blends plasticized with glycerol. **Journal of Applied Polymer Science.** 2006; 101(6):4133-4139
- CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Functional properties of myofibrillar protein-based biopackaging as affected by film thickness. **Journal of Food Science**, Chicago, v.61, n.3, p.580-584, 1996.
- DIAZ, A. M. L. **Food quality and properties of quality protein maize.** Monterrey, México: Texas A & M University, 2003. 150 p.
- DUMAS, C and MOGENSEN, H.L. Gametes and fertilization: Maize as a model system for experimental embryogenesis in flowering plants. **Plant Cell** 5:1337-1348, 1993.
- ESEN, A.; STETLER, D. A. Immunocytochemical localization of delta-zein in the protein bodies of maize endosperm cells. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 79, n. 3, p. 243-248, Mar. 1992.

FAGEER, A.S.M.; TINAY, A.H.E. Effect of genotype, malt pretreatment and cooking on in vitro protein digestibility and protein fractions of corn. **Food Chemistry**, v.84, p. 613-619, 2004.

FAO (Food and Agriculture Organization). **Maize in Human Nutrition**. Rome:FAO, 1992. 168 p.

FORATO, L. A. **Estudo das estruturas das zeínas por RMN, FTIR e MFA**. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

FRIZZI, A.; HUANG, S.; GILBERTSON, L.A.; ARMSTRONG, T.A.; LUETHY, M. Modifying lysine biosynthesis and catabolism in corn with a single bifunctional expression/silencing transgene cassette. **Plant Biotechnology Journal**, New York, v. 6, p. 13-21, 2008.

FUFA, H et al. **Assessment of protein nutritional quality and effects of traditional processes: a comparison between Ethiopian quality protein maize and five Ethiopian adapted normal maize cultivars**. *Nahrung*, 47 (4): 269-273, 2003.

GENNADIOS, A. **Protein-Based Films and Coatings**. CRC Press, 2002. 650p.

GENNADIOS, A.; HANNA, MILFORD A.; KURTH, L. B. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: A review. **Lebensmittel – Wissenschaft Und – Technologie**, v. 30, p. 337-350, 1997.

GONÇALVES, R.A et al. Rendimento e composição química de cultivares de milho em moagem a seco e produção de grifits. **Ciencia e Agrotecnologia**, v 27, p. 643-650, 2003.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. **Boletim do SBCTA**, v.30, n.1, p.3-15, 1996.

GUILBERT, S. Technology and application of edible protective films. In M. Mathlouthi (Ed.), *Food packaging and preservation* (pp. 371–394). London, UK: Elsevier Applied Science, 1986.

GUIMARÃES, C. T. **Caracterização de populações de milho indígenas que apresentam grãos opacos**. 1994. 69 p. 1994 (Tese de Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

GUIMARÃES, P.S. **Desempenho de híbridos simples de milho (*Zea mays* L.) e correlação entre heterose e divergência genética entre as linhagens parentais**. 2007. 111 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical Subtropical) – Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2007.

HAN, J. H. Antimicrobial food packaging. **Food Technology**, v. 54, p. 56-65, 2000

HULSHOF, P.J.M.; KOSMEIJER-SCHUILA, T.; WESTA, C.E.; HOLLMAN, P.C.H. Quick screening of maize kernels for provitamin A content. **Journal of Food Composition and Analysis**, Wageningen, v. 20, p. 655-661, 2007.

KESTER, J. J.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: a review. **Food Technol.**, v. 40, n. 4, p. 47-59, 1986.

KIRIHARA, J. A.; HUNSPERGER, J. P.; MAHONY, W. C.; MESSING, J. W. Differential expression of a gene for a methionine-rich storage protein in maize. **Molecular General Genetics**, New York, v. 211, n. 3, p. 477-487, Mar. 1988.

KLEIN, O. **Posição mundial de milho brasileiro pode ser afetada**. Viçosa: Agrosoft Brasil, 2009.v. 4,p.1.

KOWLES, R. V. and PHILLIPS, R. L. Endosperm development in maize. **International Review Cytology**, New York, v. 112, n. 1, p. 97-136, 1988.

KROCHTA, J. M.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technol.**, v. 51, n. 2, p. 61-74, 1997.

LANDRY J., DAMERVAL C., AZEVEDO R.A., DELHAYE S. Effect of the Opaque and Floury mutations on the accumulation of dry matter and protein fractions in maize endosperm. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, p. 549-556, 2005.

LANDRY, J and MOUREAUX, T. Heterogeneity of the glutelins of the grain corn: Selective extraction and composition in amino acids of the three isolated fractions. **Bull. Soc. Chem. Bio.**, v. 52, p. 1021-1037, 1970.

LANDRY, J. Comparison of extraction methods for evaluating zein content of maize grain. **Cereal Chemistry**, v. 74, p. 188-189, 1997.

LAWTON JW. Zein: A history of processing and use. **Cereal Chemistry**. 79(1):1-18, 2002.

LENDING, D. R., and LARKINS. Changes in zein composition of protein bodies during maize endosperm. **Plant Cell**. 1:1011-1023, 1989.

LIU, R.H. Whole grain phytochemicals and health. **Journal of Cereal Science**. 46:207-219, 2007.

LOPES, M. A and LARKINS, B. Endosperm Origin, development, and function. **The plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 10, p. 1383-1399, Oct. 1993.

MAHMOUD, R.; SAVELLO, P.A. Mechanical properties of water vapor transferability through whey protein films. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.75, n.4, p.942-946, 1992.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCÍA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 56, p. 129-135, 2004.

MANDAL, S. and MANDAL, R.K. Seed storage proteins and approaches for improvement of their nutritional quality by genetic engineering. **Current Science**, 79, 576– 589, 2000.

MARTINS, J. Amigo da prensa. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 196, p. 42-43, ago. 2003.

MITTELMAN, A. **Varição genética para qualidade nutricional em milho com endosperma normal**. 2001. 93 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

MONTERREY-QUINTERO, Ednelí Soraya; SOBRAL, Paulo José do Amaral. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nilo para elaboração de biofilmes. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 35, n. 1, jan. 2000.

NEWMANN, P.E.; WALL, J.S. Chemical and physical properties of proteins in wet-milled corn gluten. **J. Cereal Chem.**, v. 61, p. 353-356, 1984.

OLSEN, O. A et al. Histodifferentiation and molecular biology of developing cereal endosperm. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 2, n. 2, p. 117-131, June 1992.

OLSEN, O. A. Endosperm development: cellularization and cell fate specification. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 233-267, 2001.

ORLIAC O, ROUILLY A, SILVESTRE F, RIGAL L. Effects of various plasticizers on the mechanical properties, water resistance and aging of thermo-moulded films made from sunflower proteins. **Ind Crop Prod** 2003;18(2):91–100.

PAES, M. C. D et al. **Perfil de carotenóides em linhagens elite de milho**. 26º Congresso Nacional de milho e sorgo. Inovando para sistemas integrados de produção., Belo Horizonte, MG. ABMS – 638p, 27 a 31 de agosto de 2006

PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. In: CRUZ, J. C.; KARAM, D.; MONTEIRO, M. A. R.; MAGALHAES, P. C. (Ed.). (Org.). A cultura do milho. 1 ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. v. 1, p. 47-61. 2008

PALMU, P. S. T. **Preparação, propriedades e aplicação de biofilmes comestíveis à base de glúten de trigo**. Campinas, 2003, 244 p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, (UNICAMP).

PAULIS, J.W.; WALL, J.S. Fractionation and characterization of alcohol-soluble reduced corn endosperm glutelin proteins. **Cereal Chemistry**, v. 54, p. 1223-1228, 1977.

PAVLIDOU, S.; PAPASPYRIDES, C.D. A review on polymer-layered silicate nanocomposites. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 12, p. 1119-1198, 2008.

PERDOMO, A and BURRIS, J. S. Histochemical, physiological, and ultrastructural changes in the maize embryo during artificial drying. **Crop Science**, Madison, v. 38, n. 6, p. 1236-1244, Nov./Dec, 1998.

PÉROVAL, C.; DEBEAUFORT, F.; DESPRÉ, D.; VOILLEY, A. Edible arabinoxylan-based films. 1. Effects of lipid type on water vapor permeability, film structure and

other physical characteristics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 14, p. 3977-3983, 2002.

POOVARODOM, N.; PRADITDOUNG, S. **The development of biodegradable packages from Cassava starch**. Thailand: Kasetsart University, 2003.

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

RAGHAVAN, V. **Embryogenesis in angiosperms: a developmental and experimental study**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.

SCHELL, J. H. N et al. Interactions between embryo and endosperm during early developmental stages of maize caryopses (*Zea mays*). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 62, n. 12, p. 2842-2853, 1984.

SCRAMIN, J. A. et al. Caracterização da Ação Protetora de Filmes à Base de Zeínas e Ácido Oléico Aplicados em Maças In Natura. **Circular Técnica** 37, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. São Carlos, SP, Setembro, 2007.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos; propriedades, degradações, modificações**. 1. ed. São Paulo: Varela, 517 p, 1996.

SHEWRY P. R et al. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. **The Plant Cell** v.7, n. 3, p. 945-950, 1995.

SHEWRY, P. R and TATHAM. The prolamin storage proteins of cereal seed: Structure and evolution. **Biochem.** 1. 267: 1-12, 1990.

SHOTWELL, M. A and LARKINS, B. A. **The biochemistry and molecular biology of seed storage proteins**. in: *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*, Vol. 15. A. Marcus, Ed. Academic Press, Inc., New York, Pages 297-345, 1989.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial crops and products**, v. 13, n. 3, p. 171-192, 2001.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M.; DE VOR, R.E. Solvent extraction of zein from dry-milled corn. **Cereal Chemistry**, v. 77, p. 724-730, 2000.

SILVA, L. C. **Processamento de alimentos**. Boletim técnico: SA: UFES – Campus Alegre. Alegre: ES: /2006.

SOAVE, C. and SALMINI, F. Organization and regulation of zein genes in maize. **Phylogical Transations of ht Society of London**, Oxford, v. 304, n. 1120, p. 341-347, 1984.

SORRENTINO, A.; GORRASI, G.; VITTORIA, V. Potential perspectives of biocomposites for food packaging applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 2, p. 84-95, 2007.

SOZER, N.; KOKINI, J.L. Review: Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 82-89, 2009.

TANG, S.; HETTIARACHCHY, S.; SHELLHAMMER, T. H. Protein extraction from heat-stabilized defatted rice bran.1. Physical processing and enzyme treatments. **J. Agric. Food Chem.**, Easton, v. 50, n. 25, p. 7444-7448, dec. 2002.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Food Science e Technology**, v. 14, p. 71-78, 2003.

TORRES, J.A. Edible films and coatings from proteins. In: HETTIARACHY, N.S.; ZIEGLER, G.R. (Ed.). Protein functionality in food systems. New York: M. Dekker, 1994. p.467-507.

TOSELLO, G.A. Milhos especiais e seu valor nutritivo, In: **Melhoramento e produção do milho**. Ed. Viegas, G.P.; Paterniane, E. Campinas: Fundação Cargill, 2ed., v.1, p.375-409, 1987.

TROPINI, V.; LENS, J.P.; MULDER, W.J.; SILVESTRE, F. Wheat glúten films cross-linked with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and n-hydroxysuccinimide. **Industrial Crops and Products**, v. 20, p. 281-289, 2004.

WANG, Q and PADUA, G.W. Properties of Zein films coated with drying oils. **J. Agric. Food Chem**, v.53, p.3444-3448, 2005.

WOLF, M. J et al. Structure of the mature corn kernel. I. Gross anatomy and structure relationship. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 29, n. 5, p. 321-333, 1952.

YOUNG V. R and PELLETT P. L. Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, 59 (suppl.):1203S-1212S, 1994.

YOUSIF, N. E.; TINAY, A. H. E. I. Effect of fermentation on protein fractions and in vitro protein digestibility of maize. **Food Chem.**, London, v. 70, n. 2, p. 181-184, ago. 2000.

CAPITULO 1

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ZEÍNAS DO GRÃO
DE MILHO UTILIZANDO DIFERENTES SOLVENTES**

RESUMO

Zeínas são proteínas de reserva do grão de milho, solúvel em solução alcoólica que representam mais de 50% das proteínas totais do grão. Sua extração comercial é feita a partir do glúten de milho, um subproduto do processamento da moagem via úmida utilizada na fabricação do amido de milho. Quatro tipos de zeínas, α , β , δ e γ , já foram identificadas, sendo essas distintas na sequência de aminoácidos, solubilidade, ponto isoelétrico e composição polipeptídica. Solução alcoólica 70% é utilizada para extrair α -zeína diretamente de grãos moídos de milho ao passo que a extração das demais frações requer a presença de agente redutor na solução. Isso limita o uso direto de filmes e coberturas de zeínas nos alimentos. Portanto, o objetivo deste estudo foi desenvolver um novo procedimento para isolamento de zeína a partir de grãos moídos de milho utilizando um agente redutor não tóxico. Quatro métodos diferentes de isolamento foram testados, três já publicados na literatura e um método modificado com o agente redutor não tóxico. A caracterização das frações de proteína extraídas foi realizada por meio de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O perfil eletroforético das prolaminas do milho revelou a presença de quatro frações de zeína nos materiais extraídos na presença de agente redutor, sem nenhuma diferença de padrão eletroforético entre os isolados obtidos com agente redutor não tóxico e o tóxico. Sendo assim, a substituição de um agente redutor tóxico pelo ácido ascórbico na extração de zeínas pode ser uma alternativa para estender o uso de zeína diretamente na produção de biofilmes para a finalidade de uso alimentar e revestimento de medicamentos de uso oral.

ABSTRACT

Zeins are storage proteins of maize grains, soluble in alcoholic solution representing more than 50% of total proteins of the grain. Its commercial extraction is made from corn gluten, a byproduct of the wet grinding process used in manufacturing the corn starch. Four types of zein storage, α , β , δ and γ , have been identified, these being different in amino acid sequence, solubility, isoelectric point and polypeptide composition. 70% alcoholic solution is used to extract α -zein directly from ground corn grains while the extraction of other fractions requires the presence of a reducing agent in solution. This limits the direct use of films and coatings from zein storage in food. Therefore, the aim of this study was to develop a new procedure for isolation of zein from corn kernels milled using a non-toxic reducing agent. Four different methods of isolation were tested, three already published in the literature and a new method with non-toxic reducing agent. Characterization of the extracted protein fractions was performed by electrophoresis on denaturing polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). The electrophoretic pattern of prolamins of maize revealed the presence of four fractions of zein in the material extracted in the presence of reducing agent, with no difference in electrophoretic pattern between isolates obtained from non-toxic reducing agent and toxic. Thus, the replacement of a toxic reducing agent ascorbic acid in the extraction of zein storage can be an alternative to the use of zein to extend directly in the production of biofilms for food use and purpose of coating of medicinal products for oral use.

1- INTRODUÇÃO

Prolaminas são proteínas de armazenamento do endosperma, respondendo por cerca de 40% da proteína total na maioria das sementes de cereais (GIUBERTI et al, 2011) e são ricas nos aminoácidos prolina e glutamina (SHEWRY *et al.*, 1999). No milho, as prolaminas são denominadas zeínas e correspondem a cerca de 70% das proteínas do endosperma do milho convencional (BICUDO et al, 2006; SCRAMIN et al, 2007), podendo ser definidas como proteínas de reserva (WANG e PÁDUA, 2005).

Três grupos estruturalmente distintos, nomeados de α , β e γ -zeína, foram classificados de acordo com uma nomenclatura amplamente aceita (ESEN, 1986). Um quarto grupo compreendendo duas proteínas, a δ -zeína de 10 kDa (KIRIHARA et al., 1988) e a δ -zeína de 18 kDa (WOO et al., 2001) foi depois adicionado à família das prolaminas do milho. Tais proteínas zeína diferem entre si pela sequência de aminoácidos, características de solubilidade, ponto isoelétrico e composição polipeptídica (ESEN, 1986; SHEWRY e TATHAM, 1990).

As α -zeínas são caracterizadas por duas bandas 19KDa e 22KDa, na eletroforese em gel contendo dodecil sulfato de sódio (SDS/PAGE); sendo similares em sequência e solubilidade, diferindo apenas no tamanho. Tais proteínas, que constituem de 75 a 85% das zeínas totais, são ricas em resíduos de aminoácidos apolares e são, portanto, insolúveis em água e solúveis em soluções alcoólicas (BICUDO et al, 2006; FORATO, 2000). Por sua vez, β -zeína corresponde às bandas de 14 e 16 kDa, representam de 10 a 15% da fração total e são solúveis em álcool hidratado após uso de agentes redutores. Já a γ -zeína apresenta banda em 28 kDa na eletroforese, representa de

5 a 10% das zeínas totais e, para solubilização dessa proteína, tanto em álcool 70% como em água, é necessário o uso de agentes redutores para rompimento das ligações dissulfeto. Por fim, a δ -zeína equivale à banda de 10 kDa e representa somente traços da fração total de zeínas; assim como as zeínas β , γ , são extraídas somente com redução das ligações de dissulfeto (BICUDO et al, 2006; SHEWRY et al, 1990), sendo usado tradicionalmente o beta mercaptoetanol (ESEN, 1986).

Zeína é uma das proteínas mais hidrofóbicas de cereais, apresentando hidrofobicidade média de 1,365 J/mol. A alta proporção de resíduos de aminoácidos não polar é o responsável pela hidrofobicidade da zeína. A ordem de hidrofobicidade das frações de zeína é maior para γ e δ -zeínas do que α zeína, a qual é apresenta maior hidrofobicidade que β -zeína (HOLDING e LARKINS, 2009).

Esse grupo de proteínas foi isolado pela primeira vez por Gorham (1821) em milho integral usando solução aquosa de etanol e a primeira patente para o método comercial de extração de zeína foi concedida a Osborne (1891). Desde então diferentes procedimentos utilizando diferentes solventes para extrair as proteínas dos cereais são relatados na literatura, apesar da ausência de um método de referência (AGBOOLA e MILLS, 2005; GIUBERTI et al, 2011), nos quais fatores como concentração e tipo de solvente, temperatura e tempo da extração variam com o intuito de aumentar a eficiência do processo. O método usado para isolar as proteínas tem efeitos importantes nas suas propriedades (AGBOOLA e MILLS, 2005).

Atualmente, o ensaio de Landry e Moureaux (1970) é reconhecido por extrair zeína como um método de fracionamento convencional (HAMAKER et al., 1995), mas é raramente usado nos laboratórios porque é considerado trabalhoso e demorado (LANDRY et al., 2000). Modificações no processo do método de extração de Landry e Moureaux (1970) foram avaliadas (WALLACE et al., 1990; HAMAKER et al., 1995; LANDRY et al., 2000).

Das proteínas do milho, 85 a 90 % compõem a fração glutelina e prolamina, solúveis em soluções alcalina e alcoólica, respectivamente (KAMPEN, 1995). Na maioria dos trabalhos encontrados sobre a extração química das proteínas de cereais, o etanol e uma solução de hidróxido de sódio são empregados como solventes em concentrações variadas (LANDRY & MOUREAUX, 1970; PAULIS & WALL, 1977; NEWMANN & WALL, 1984; LANDRY, 1997; YOUSIF & TINAY, 2000; FAGEER & TINAY, 2004). Em alguns casos o etanol é empregado isoladamente com o objetivo de extrair as zeínas do milho. Alguns autores utilizaram o cloreto de sódio com o

hidróxido de sódio e/ou etanol (LANDRY & MOUREAUX, 1970; PAULIS & WALL, 1977; NEWMANN & WALL, 1984; LANDRY, 1997; YOUSIF & TINAY, 2000; FAGEER & TINAY, 2004).

A extração da zeína pode ser feita a partir de todos os co-produtos do milho, mas a zeína comercial é normalmente produzida a partir do glúten de milho. A maioria das extrações da prolamina do milho tem sido baseada em extração por solução aquosa de etanol, mas muitos outros solventes podem solubilizar a zeína. Sistemas de extração de zeína tem sido otimizados para diferentes produtos e co-produtos do milho devido às diferenças nas concentrações de proteína e as condições de processamento (ANDERSON e LAMSAL, 2011).

O ácido ascórbico puro é sólido, branco, cristalino e muito solúvel em água. Plantas e animais podem sintetizá-lo, com exceção de humanos, primatas e cobaias, que não conseguem e necessitam obtê-lo na dieta. A mais impressionante propriedade química do ascorbato é a sua habilidade para agir como agente redutor (doador de elétrons) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989), antioxidante e como agente sequestrador em determinados alimentos (PARDI *et al.*, 1996).

O beta-mercaptoetanol é um agente redutor que promove a redução das pontes de enxofre, formadas pelos grupamentos sulfidrilas de cisteínas, presentes na enzima, promovendo sua inibição (FALKOSKI *et al.* 2006). De acordo com a diretiva Europeia 67/548/CEE e emendas, o beta-mercaptoetanol é tóxico por inalação, em contato com a pele e por ingestão além de ser irritante para a pele. Deste modo, o uso do beta-mercaptoetanol é inadequado para qualquer tipo de extração para fins alimentícios e deve ser substituído por um outro agente redutor não tóxico.

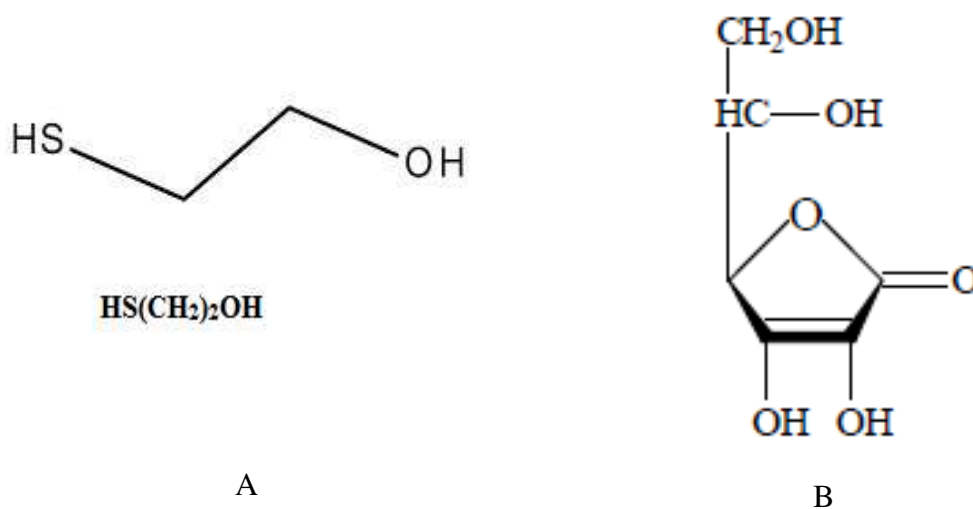


Figura 2: Estrutura química do beta-mercaptoetanol (A) e do ácido ascórbico (B)

Tendo em vista a atuação do ácido ascórbico como agente redutor, além de este ser totalmente seguro para consumo humano, barato e bem aceito pelos consumidores desejou-se fazer uso dessa substância na extração da zeína de milho, visto que eventuais resíduos presentes no produto final (como filmes biodegradáveis fabricados a partir dessa proteína) decorrente do processo de extração não afetaria a saúde humana. Sendo assim, o presente trabalho objetivou comparar uma nova metodologia de isolamento de zeína que se extraia todas as subunidades da zeína substituindo o agente redutor beta mercaptoetanol pelo ácido ascórbico às já existentes na literatura, bem como verificar os perfis eletroforéticos e o teor das prolaminas extraídas.

2- MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Qualidade de Grãos do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo da Embrapa, situado em Sete Lagoas – MG e no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa - MG.

2.1- Preparo da amostra

Para a análise dos métodos de extração de zeínas foi utilizada amostra do cultivar de milho BRS1060. Foram analisadas amostras do milho integral e do endosperma. Para as análises com o milho integral os grãos foram selecionados, moídos em moinho ciclone utilizando peneira de 0,5mm e armazenadas em freezer. Para as análises com o endosperma, os grãos de milho foram selecionados e deixados de molho em água destilada por 3 horas. O endosperma foi retirado manualmente, grão a grão, utilizando bisturi. O endosperma foi seco em estufa seca por 1 hora a 40°C, moído e armazenado em freezer.

Para extração de lipídio, quando necessário, a farinha foi tratada com 1 mL de hexano, à temperatura ambiente durante 15 minutos, com leves agitações, e centrifugadas logo após a 9000 rpm/5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi deixado para secar *overnight*.

2.2- Solventes de extração das zeínas do milho

A extração de zeína foi feita utilizando dois solventes diferentes, etanol 70% e isopropanol 55%, e utilizando amostras integrais ou desengorduradas para verificar em qual dos casos há maior extração proteica.

As extrações foram de acordo com o Quadro 1:

Quadro 1: Amostras utilizadas e os seus respectivos solventes de extração

Amostra	Lipídio	Solvente Extrator
Endosperma	Desengordurado	Isopropanol 55%
		Etanol 70%
	Integral	Isopropanol 55%
		Etanol 70%
Grão Inteiro	Desengordurado	Isopropanol 55%
		Etanol 70%
	Integral	Isopropanol 55%
		Etanol 70%

2.3- Métodos de extração de zeína

Foram utilizados quatro métodos diferentes para isolamento da zeínas, sendo três já conhecidos na literatura e um método modificado a ser testado, descritos a seguir:

2.3.1- Método de Hamaker et al (1995)

As proteínas do milho foram fracionadas em zeínas e não zeínas pelo método descrito por Hamaker (1995). Utilizou-se 100 mg das amostras pesadas em balança analítica em papel manteiga e transferida cuidadosamente para tubos *Eppendorf*. As amostras foram extraídas por 1 hora sob pequena agitação em minishaker à temperatura ambiente com 1mL de tampão borato (12 mM de borato de sódio + 1% SDS, pH 10) e 20µL de β-Mercaptoetanol. A suspensão foi centrifugada a 12000 rpm por 15 min e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo. Este procedimento foi repetido

utilizando o pellet anterior, adicionando da segunda vez apenas o tampão borato. Uma alíquota de 300µL da mistura de sobrenadantes foi adicionado a 700µL de álcool etílico absoluto, deixado por 2 horas sob pequena agitação no minishaker e centrifugada a 12000 rpm por 15 min. Do sobrenadante (não zeína), contendo frações de zeína e nitrogênio não proteico, foi pipetado 200µL, adicionado a 1200µL de acetona P.A. gelada (-20°C), incubado em gelo por 30 min e centrifugado a 14000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet (zeína) foi armazenado em freezer.

2.3.2- Método de Landry et al (2000)

Para a extração seguindo o método de Landry e Damerval (LANDRY et al., 2000) foram utilizados 100 mg da farinha do milho. O processo de extração é sequencial, assim utilizou-se o precipitado da extração anterior como pellet da extração seguinte. Durante toda a extração sequencial a amostra foi frequentemente agitada em vortex, para auxiliar a solubilização das proteínas pelo reagente que estava sendo utilizado. Após o tempo de reação de cada fração protéica, a amostra foi centrifugada a 9.000 g durante 5 minutos.

Para a extração das globulinas, 1 mL de uma solução 0,5 M de NaCl por 30 minutos a 4°C, foi adicionado a farinha seca. Este procedimento foi repetido duas vezes. Os sobrenadantes obtidos após centrifugação foram descartados. Em seguida, a fração albumina foi extraída submetendo o pellet a uma nova extração com água Milli-Q por 15 minutos a 4°C, duas vezes. O sobrenadante da segunda centrifugação foi descartado.

As prolaminas foram obtidas em duas frações, zeínas I e II. As zeínas I foram extraídas misturando-se ao pellet anterior (que se formou da extração da albumina) 1 mL de solução 55% (v/v) 2-propanol e 0,6% (v/v) β-Mercaptoetanol por 30 minutos a temperatura ambiente, este processo foi repetido duas vezes, os sobrenadantes obtidos após centrifugação foram misturados e armazenados a -70°C. As zeínas II foram obtidas pela extração do pellet obtido com 1 mL de solução 0,5M NaCl, pH 10 contendo 0,6% (v/v) β-Mercaptoetanol à temperatura ambiente por 30 minutos, repetindo mais uma vez. Após este período, o extrato foi centrifugado e os sobrenadantes obtidos foram armazenados a -20°C para análise posterior.

2.3.3- Método de Forato et al (2008)

As zeínas foram extraídas do endosperma do milho em pó com solução de etanol a 70% sob agitação por 24 horas. A solução de zeína em etanol 70%, após filtragem, foi colocada em rota-evaporador, a 40°C, para evaporação do álcool e precipitação das proteínas na água restante. Em seguida, as mesmas foram liofilizadas.

2.3.4- Método Modificado

Para extração da zeína, uma solução de etanol 70% contendo ácido ascórbico foi adicionada ao milho integral moído, numa proporção de 10/1 (volume/peso), sob agitação por 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 9000 rpm. O sobrenadante foi liofilizado armazenado em freezer.

2.4- Caracterização das proteínas por SDS-PAGE

A caracterização das frações de proteínas foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foram utilizadas amostras de proteínas liofilizadas. As amostras foram desnaturadas em banho maria a 97°C por cinco minutos em solução de β -mercaptoetanol 5%; Tris-HCl 0,0625M (pH 6,8); glicerol 10%; SDS 2.3% (p/v); azul de bromofenol 0,1% (p/v) e submetida a um choque térmico em banho de gelo. Aplicou-se um volume de 5,0 μ L de cada amostra no gel.

A eletroforese foi conduzida em gel (SDS-PAGE) com gradiente de 6,0-15,0%, imerso em solução tampão Tris 0,025M; glicina 0,192M; SDS 0,1% (pH 8,8). Utilizou-se um sistema descontínuo, constituído por 2 géis, sendo um de resolução (principal) e outro de empacotamento (stacking gel) e conduzida em sistema vertical. As placas de vidro, com espessura de 1mm, contendo os géis foram submetidas à corrente de 15 mA até a entrada das amostras no gel principal e de 30mA até o final, por cerca de 2 horas. A coloração foi feita utilizando nitrato de prata, seguindo protocolo de BLUM et al (1978).

Para a identificação das proteínas presentes nas amostras, foram utilizados padrões de peso molecular fornecido pela Fermentas Life Sciences (Unstained Protein Molecular Weight Marker) contendo 7 proteínas com pesos moleculares de 14.4 a

116.0kDa.. Os géis foram fotodocumentados e as imagens obtidas analisadas.

2.5- Determinação do teor de proteína

A determinação de proteína foi feita pelo método de Dumas que consiste na queima completa da matéria orgânica em temperatura de 700-750°C utilizando como catalisador o óxido cúprico na presença de oxigênio. Todo o nitrogênio presente na amostra é transformado em gás de NO₂, sendo posteriormente reduzidos a N₂, que liberado, é determinado por condutividade térmica (LOPES e SANTANA, 2005).

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Comparação entre os solventes extratores no isolamento da zeína

Diversas metodologias têm sido descritas para a extração química das proteínas do milho, seja diretamente de grãos macerados ou de seus derivados industrialmente processados (LAWTON, 2002). A maioria desses processos tem por base o uso de soluções alcoólicas, de baixa polaridade, empregadas como solventes (KAMPEN, 1995). Segundo determinações de Shukla (2000), as maiores eficiências de extração de zeínas foram obtidas fazendo uso de etanol concentrado como solvente, considerando que a fração solúvel em álcool constitui na maior parte (80-90%) das proteínas presentes no milho, e a restante fracamente solúvel em álcali.

O presente trabalho utilizou como solventes extratores o isopropanol aquoso e o etanol aquoso, baseado no protocolo de Osborne (1924) que classifica as proteínas do milho como com base na solubilidade em diferentes solventes, sendo as prolaminas solúveis em soluções alcoólicas a 70-80%. A Tabela 2 mostra a porcentagem de nitrogênio e proteína das amostras de milho extraídas por isopropanol 55% ou etanol 70% do milho integral ou do endosperma.

A zeína extraída do endosperma desgordurado por isopropanol 55% foi a que obteve maior teor proteico (75,25% da amostra extraída) e a zeína extraída pelo isopropanol 55% do grão de milho desgordurado obteve o menor teor protéico (32,14%). Esses resultados mostram que o teor de proteína foi maior quando extraída

diretamente do endosperma, região do milho onde se encontra a maior concentração proteica (WATSON, 2003).

Tabela 2 – Teor de nitrogênio e proteína de amostras de milho extraídas por diferentes solventes.

Amostras	Solvente extrator	%N	% Proteína Extraída*
Grão de milho moído e desengordurado	Isopropanol 55%	5,143	32,14
	Etanol 70%	6,844	42,78
Grão de milho moído integral	Isopropanol 55%	6,179	38,62
	Etanol 70%	6,442	40,26
Endosperma do milho desengordurado	Isopropanol 55%	12,040	75,25
	Etanol 70%	11,330	70,81
Endosperma do milho integral	Isopropanol 55%	11,650	72,81
	Etanol 70%	8,229	51,43

*Teor de proteína convertido pela multiplicação da %N pelo fator 6,25

Comparando-se o atual experimento como o realizado por SHUKLA et al. (2000) onde a recuperação média das zeínas foi de 50,6 % do total das proteínas do milho, utilizando-se o etanol a 70% por 30-40 min a uma temperatura de 50°C, pode-se dizer que obteve-se uma extração proteica relativamente satisfatória, mesmo naquelas feitas no grão do milho integral utilizando etanol 70% (40,26%).

Os perfis proteicos obtidos após extração da fração zeína podem ser observados na Figura 3, que representa a foto do gel com as devidas marcações quanto ao peso molecular das bandas proteicas do padrão utilizado e as bandas correspondentes à cada subunidade da zeína.

A imagem do gel permitiu observar a presença de bandas proteicas variando entre 10kDa e 50kDa, podendo-se identificar quatro frações de zeínas, descritas previamente na literatura. Diferenças no perfil das zeínas não foram observadas para ausência, presença e intensidade de bandas, entre as oito amostras. Entretanto, nota-se que a α -zeína apresentou maior número de bandas, assim como mais intensas, confirmando assim dados relatados na literatura.

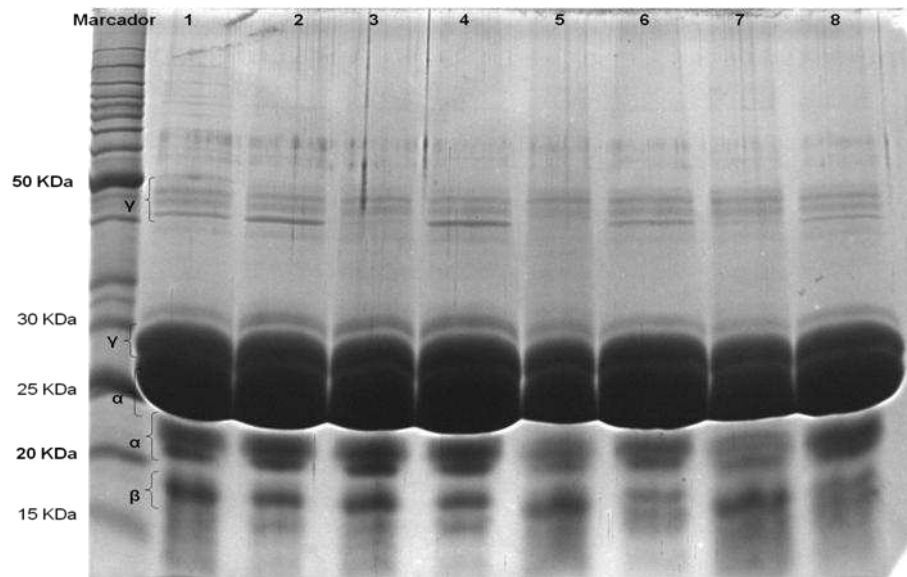


Figura 3: Mini gel (SDS/PAGE) de zeínas extraídas pelo método de Hamaker (1995), onde:
 1- Endosperma desengordurado utilizando o isopropanol 55% como solvente extrator
 2- Endosperma desengordurado utilizando o etanol 70% como solvente extrator
 3- Endosperma integral utilizando o isopropanol 55% como solvente extrator
 4- Endosperma integral utilizando o etanol 70% como solvente extrator
 5- Grão desengordurado utilizando o isopropanol 55% como solvente extrator
 6- Grão desengordurado utilizando o etanol 70% como solvente extrator
 7- Grão integral utilizando o isopropanol 55% como solvente extrator
 8- Grão integral utilizando o etanol 70% como solvente extrator

Apesar do teor de zeínas ter sido maior quando extraídas do endosperma, não houve diferença no perfil eletroforético das mesmas. Deste modo, preferiu-se fazer as extrações subsequentes a partir do grão de milho integral utilizando etanol 70% por ser um processo mais fácil, rápido e menos oneroso.

3.2- Comparação entre os métodos de isolamento de zeína

As zeínas totais, que são extraídas com álcool e agente redutor de ligações de dissulfeto, são compostas de um grande número de proteínas que têm sido caracterizadas principalmente por eletroforese (SDS/PAGE). Nas zeínas são identificadas 6 frações com massas relativas de 10, 14, 16, 19, 22 e 28 KDa (PARRIS e COFFIN, 1997; SHEWRY et al, 1990). Pela nomenclatura de Esen (1986) as zeínas são classificadas em 4 grupos (α , β , γ e δ) que serão apresentados a seguir.

Os perfis protéicos obtidos após extração das zeínas podem ser observados na Figura 4, que representa a foto do gel com as devidas marcações quanto ao peso molecular das bandas protéicas do padrão utilizado e as bandas correspondentes a cada subunidade da zeína.

Foram caracterizadas por eletroforese as zeínas extraídas do milho integral moído por cinco métodos diferentes em comparação com a zeína comercial existente no mercado. Nos poços 1 e 2 da figura 4 foram aplicados 10 μ L do padrão de peso molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas Life Sciences) e 5 μ L de zeína obtidas da Sigma Aldrich, respectivamente. Nos poços 3 à 7 foram aplicados 5 μ L de zeína extraídas por diferentes métodos.

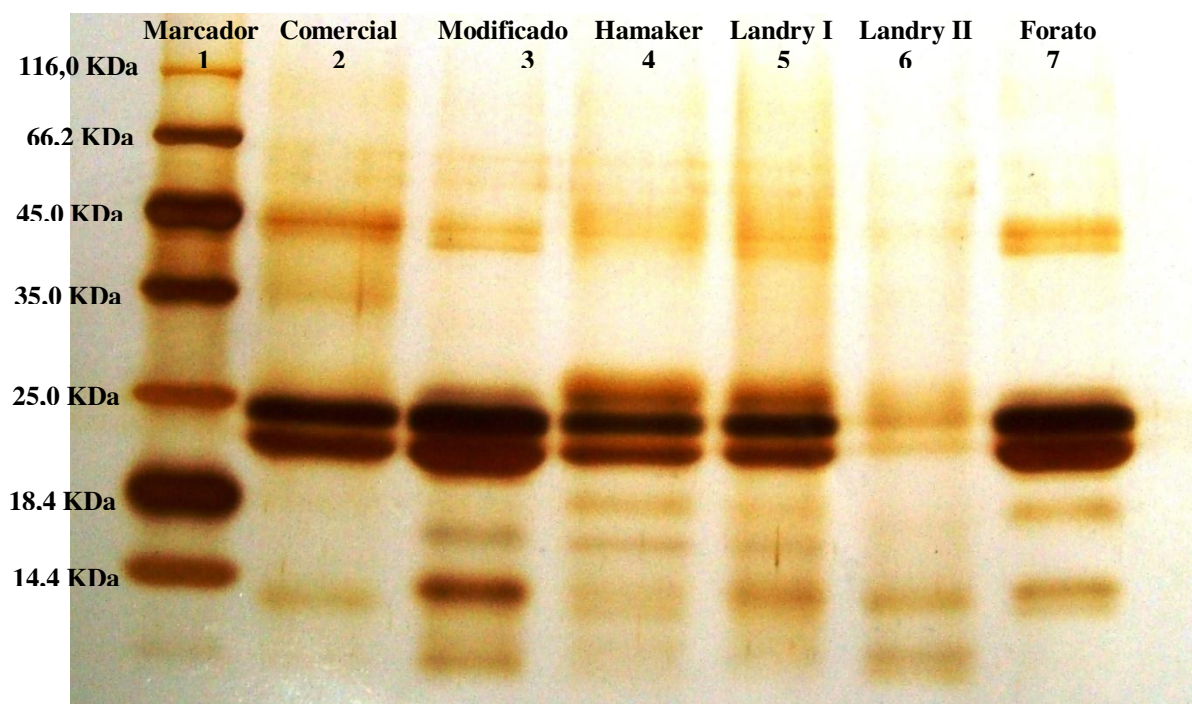


Figura 4: Mini gel (SDS/PAGE) de zeínas extraídas por diferentes métodos. Gel de empilhamento 6% e gel de separação 15% acrilamida - bis acrilamida. Corrida inicial a 20mA (atingir o gel de separação) e depois a 30mA, mantendo a voltagem constante no valor máximo. Volume aplicado/canaleta = 5 μ L. Padrão de peso molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas Life Sciences) = 10 μ L. Coloração com prata.

A imagem do gel permitiu observar que a solução de etanol 70% adicionado do agente redutor não tóxico (Novo Método), assim como os métodos já existentes, permitiu extrair as quatro frações de zeínas presentes no milho, sendo α -zeína (PM = 19 e 22 kDa), β -zeína (PM = 14 kDa), γ -zeína (PM = 27 kDa) e δ -zeína (PM = 10 kDa) (ESEN, 1986). Esse padrão eletroforético não diferiu daqueles das zeínas extraídas com os demais métodos utilizando o agente redutor beta mercaptoetanol. Isso indica que o processo de extração das proteínas foi bem sucedido.

Nota-se que apenas os métodos contendo agente redutor (Modificado, Hamaker e Landry) conseguiram isolar a fração de aproximadamente 10 KDa (δ -zeína), enquanto

a zeína comercial e a extraída pelo método de Forato não apresentaram a δ -zeína. Tal fração representa apenas traços das zeínas totais.

Assim como as zeínas β e γ , as δ -zeínas são extraídas somente com redução das ligações de dissulfeto. As δ -zeínas têm 129 resíduos e não contêm domínios de repetição. Na região central contêm 17 das 29 metioninas, principalmente na forma de duplete M-M, separado por 2 a 3 resíduos. Sendo assim, considera-se a δ -zeína rica em metionina, um aminoácido sulfurado (ALEXANDROV et al, 2009), que pode conferir maior resistência aos biofilmes a base de zeína devido as ligações dissulfeto. Sendo assim, o uso do ácido ascórbico como agente redutor permite extrair a δ -zeína.

4- CONCLUSÕES

Sendo os perfis eletroforéticos de zeínas extraídas com isopropanol e etanol semelhantes para amostras de grãos de milho integrais e endosperma, pode-se observar então que a eficiência de extração de prolaminas do milho não é influenciada pela substituição do isopropanol pelo etanol. Esse resultado é considerado positivo por tornar assim o processo de extração menos oneroso. Com relação à aplicação da etapa de desengorduramento de amostras de milho integral ou endosperma, observou-se não ser necessária para os fins de isolamento de zeínas.

A substituição do agente redutor beta mercaptoetanol pelo ácido ascórbico na extração de prolaminas de milho pode ser uma alternativa para utilização da zeína diretamente na produção de coberturas e biofilmes com finalidade de revestimento de alimentos.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGBOOLA, S.; NG, D.; MILLS, D. Characterization and functional properties of Australian rice protein isolates. **Journal of. Cereal Science**, v. 41, p. 283-290, 2005.

ALEXANDROV N, BROVER V, FREIDIN S, TROUKHAN M, TATARINOVA T, Zhang H, SWALLER T, Lu YP, BOUCK J, FLAVELL R, et al (2009) Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing. **Plant Mol Biol** 69: 179–194

ANDERSON, T. J., and LAMSAL, B. P.. Zein Extraction from Corn, Corn Products, and Coproducts and Modifications for Various Applications: A Review. **Cereal Chemistry**, 88(2), 159-173, 2011.

BICUDO, R. C. et al. Análise de zeínas α do milho por LC-ESI-Q/TOF. **Comunicado técnico 77 - EMBRAPA**. São Carlos, SP. Nov., 2006.

ESEN, A.. Separation of alcohol-soluble proteins (zeins) from maize into three fractions by differential solubility. **Plant Physiology**. 80:623-627, 1986.

FAGEER, A.S.M.; TINAY, A.H.E. Effect of genotype, malt pretreatment and cooking on in vitro protein digestibility and protein fractions of corn. **Food Chem.**, v.84, p. 613-619, 2004.

FALKOSKI, D.L.; GUIMARÃES, V.M.; CALLEGARI, C.M.; REIS, A.P.; BARROS, E.G.; REZENDE, S.T. Processing of Soybean Products by Semipurified Plant and Microbial α -Galactosidases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54: 10184–10190, 2006.

FORATO, L. A. **Estudo das estruturas das zeínas por RMN, FTIR e MFA**. 2000. Tese (Doutorado) Instituto de Química de São Carlos, USP, São Carlos.

FORATO, L. A., BICUDO, T. C., & COLNAGO, L. A. (2003). Conformation of alpha zeins in solid state by Fourier transform IR. **Biopolymers**, 72(6), 421–426.

- GIUBERTI, G.; GALLO, A.; MASOERO, F. A comparison of methods to quantify prolamin contents in cereals. **Italian Journal of Animal Science**; volume 10:e2, 2011.
- GORHAM, J. Analysis of Indian corn. **Quarterly Journal of Science, Literature and the Arts**. 2:206-208, 1821.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989, 543 p.
- HAMAKER, B. R., MOHAMED, A. A., HABBEN, J. E., HUANG, C. P., and LARKINS, B. A. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. **Cereal Chemistry**. 72:583-588, 1995.
- HOLDING, D.R., LARKINS, B.A. Zein storage proteins. In: Kriz, A.L., Larkins, B.A. (Eds.), **Molecular Genetic Approaches to Maize Improvement**, vol. 63. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 269e286, 2009.
- HUKLA, R.; CHERYAN, M.; DE VOR, R. E. - **Cereal Chemistry**., 77, p.724, 2000. <http://dx.doi.org/10.1094/CCHEM.2000.77.6.724>.
- KAMPEN, W. H. Recovery of protein isolate and/or starch from cereal grains, **United States Patent** 5.410.021, 1995.
- KAMPEN, W.H. **Recovery of protein isolate and/or starch from cereal grains**. United States Patent 5.410.021, 1995.
- KIRIHARA, J.A., PETRI, J.B. & MESSING, J. Isolation and sequence of a gene encoding a methionine-rich 10-kDa zein protein from maize. **Gene**, 71, 359-370, 1988.
- LANDRY, J. Comparison of extraction methods for evaluating zein content of maize grain. **Cereal Chem.**, v. 74, p. 188-189, 1997.
- LANDRY, J., DELHAYE, S., DAMERVAL, C. Improved method for isolating and quantitating α -amino nitrogen as non-protein, true protein, salt-soluble proteins, zeins, and true glutelins in maize endosperm. **Cereal Chemistry**. 77:620-626, 2000.
- LANDRY, J., MOUREAUX, T. Heterogenicity of the glutelins of the grain core. Selective extraction and composition in amino acids of the three isolated fractions. **B. Soc. Chim. Biol.** 52: 1021-1037, 1970.
- LAWTON, J.W. - **Cereal Chemistry**, 79, p.1. <http://dx.doi.org/10.1094/CCHEM.2002.79.1.1>, 2002.
- LOPES, D.C.; SANTANA, M.C.A. **Determinação de proteína em alimentos para animais: métodos químicos e físicos**. Viçosa: UFV, 2005. 98p.
- NEWMANN, P.E.; WALL, J.S. Chemical and physical properties of proteins in wet-milled corn gluten. **J. Cereal Chem.**, v. 61, p. 353-356, 1984.
- OSBORNE, T. **Process of extracting zein**. US patent 456,773, 1891.

PARDI, M. C. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 1996. 2 v.

PARRIS, N., COFFIN, D.R. Composition factors affecting the water vapor permeability and tensile properties of hydrophilic zein films. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.45, p.1596-1599, 1997.

PAULIS, J.W.; WALL, J.S. Fractionation and characterization of alcohol-soluble reduced corn endosperm glutelin proteins. **Cereal Chem.**, v. 54, p. 1223-1228, 1977.

SCRAMIN, J. A. et al. **Caracterização da ação protetora de filmes à base de zeínas e ácido oleico aplicados em maçãs in natura**. São Carlos, SP: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007. (Circular Técnica 37).

SHEWRY PR. The synthesis, processing and deposition of gluten proteins in the developing wheat grain. **Cereal Foods World** 44, 587–589, 1999.

SHEWRY, P.R.; MILES, M.J.; TATHAM, A S. The prolamin storage proteins of cereal seeds. Structure and evolution. *Biochemistry Journal*. v.267, p. 1-12, 1990

SHUKLA, R.; CHERYAN, M.; DE VOR, R.E. Solvent extraction of zein from dry-milled corn. **Cereal Chem.**, v. 77, p. 724-730, 2000.

WALLACE, J.C., LOPES, M.A., PAIVA, E., LARKINS, B.A. New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of γ -zein in modified opaque-2 maize. **Plant Physiol**. 92:191-196, 1990.

WANG, Q.; PADUA, G.W. Properties of Zein films coated with drying oils. **The Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p.3444-3448, 2005.

WATSON, S.A. Description, development, structure, and composition of the corn kernel. In: **Corn: Chemistry and Technology**. WHITE, P.J.; JOHNSON, L.A. (Ed). 2. ed. St. Paul, Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, Inc., 2003. p.69-106.

WOO, Y.-M., HU, D.W.-N., LARKINS, B.A.; JUNG, R. Genomics analysis of genes expressed in maize endosperm identifies novel seed proteins and clarifies patterns of zein gene expression. **Plant Cell**, 13, 2297-2317, 2001.

YOUSIF, N.E.; TINAY, A.H.El. Effect of fermentation on protein fractions and in vitro protein digestibility of maize. **Food Chemistry**, v. 70, p. 181-184, 2000.

CAPITULO 2

**PERFIL ELETROFORÉTICO DE ZEÍNAS ISOLADAS DE DIFERENTES
ACESSOS DE GERMOPLASMA TROPICAL DE MILHO**

RESUMO

As zeínas, proteínas de reserva do milho, têm sido bastante estudadas pelo interesse que despertam tanto sob aspecto nutricional quanto tecnológico. Elas constituem uma importante fonte protéica na dieta humana uma vez que apresentam cerca de 80% das proteínas do milho. Estando presentes na alimentação humana, seja pelo consumo direto ou pelo consumo de carne de aves e suínos que têm sua alimentação à base de milho. São polipeptídeos de massa molecular de 10 a 28 KDa classificadas em α , β , γ e δ zeínas. As zeínas α são peptídeos com massa molecular de 19 KDa (Z19) e 22 KDa (Z22), insolúveis em água e solúveis em álcool hidratado e representam de 75-85% da fração de zeínas totais. As zeínas β , Z14 e Z16, são solúveis em álcool hidratado após uso de agentes redutores e representam de 10 a 15% do total das prolaminas. As zeínas γ , Z28 e Z48, são solúveis em álcool e água após redução de pontes de dissulfeto (5-10%) e as zeínas δ (Z10), que são encontradas somente em baixa quantidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes acessos de milho do Banco de Germoplasma de Milho quanto ao perfil eletroforético das zeínas, analisando possíveis distinções entre elas como subsídio para programas de melhoramento genético. Para extração das proteínas os grãos foram, primeiramente, dissecados para isolamento do endosperma. Os endospermas obtidos de sete genótipos individualmente foram moídos por um moinho de martelo utilizando peneira de 2 mm e armazenado a -80°C . A extração das prolaminas foi conduzida utilizando método modificado de extração desenvolvido, utilizando ácido ascórbico como agente redutor. A caracterização das frações de proteínas foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante na

presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), em cuba vertical utilizando-se o sistema de mini-gel. O perfil revelou a presença de seis bandas protéicas variando entre 10kDa e 50kDa, podendo-se verificar as quatro frações de zeínas. A análise do gel demonstrou que os padrões das zeínas diferiram entre os materiais avaliados.

ABSTRACT

Zein, storage proteins of maize, have been extensively studied for the interest they arouse both in technological and nutritional aspects. They are an important source of protein in the human diet since they are about 80% protein corn. Being present in food, either by direct consumption or the consumption of poultry and pigs that have their diet based on corn. Are polypeptides of molecular weight 10-28 kDa classified as α , β , γ and δ zein storage. The zein storage α are peptides with a molecular mass of 19 kDa (Z19) and 22 kDa (Z22), insoluble in water and soluble in ethanol and represent 75-85% of the total fraction of zein storage. The zein storage β , Z14 and Z16 are soluble hydrous after the use of reducing agents and represent 10-15% of prolamine. The zein storage γ , Z28 and Z48 are soluble in alcohol and water after reduction of disulfide bonds (5-10%) and zein storage δ (Z10), which are found only in small amounts. The objective of this study was to evaluate different corn accessions from the genebank Corn on the electrophoretic profile of zein storage, analyzing possible distinctions between them as support for breeding programs. For protein extraction from the grains were first dissected to isolate the endosperm. The endosperm obtained from seven genotypes were individually ground by a hammer mill using a 2 mm sieve and stored at -80°C . The extraction of prolamins was conducted using the new extraction method developed. The characterization of the protein fractions was performed by electrophoresis on denaturing polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) in the vat vertical using the mini gel system. The profile revealed the presence of six protein bands ranging from 10kDa and 50 kDa, and we can check the four fractions of zein

storage. The analysis of the gel showed that the patterns of zein storage differ among the materials evaluated.

1- INTRODUÇÃO

O milho é provavelmente a espécie que conta com maior variabilidade genética entre as plantas cultivadas; já foram identificadas milhares de variedades. Essa cultura também possui ampla adaptação ambiental, pois existem variedades de milho adaptadas a diversas condições climáticas, altitudes e latitudes. O milho ainda possui grande diversidade para caracteres quantitativos e qualitativos, incluindo a composição química dos grãos, a reação a doenças, a capacidade produtiva, a arquitetura de planta e o ciclo, entre outros (PATERNIANI et al., 2000) .

Uma das formas de manter a variabilidade genética do milho é a produção de cultivares antigas, em áreas isoladas de outras lavouras de milho, por produtores rurais (TEIXEIRA et al., 2005). Porém, esta manutenção, denominada on farm, tem se tornado cada vez mais restrita, dado o interesse do agricultor em cultivares com maiores potenciais de produtividade. Assim, a variabilidade genética do milho pode ser adequadamente mantida em coleções denominadas bancos de germoplasma.

O trabalho pioneiro de manutenção do germoplasma de milho no Brasil foi realizado pela ESALQ (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz) em 1952, quando se efetuou estudo das raças existentes no Brasil e coletas de variedades crioulas e indígenas. Essas coletas englobaram mais de 3000 amostras, que foram armazenadas no banco de germoplasma do Departamento de Genética da Esalq, cultivadas e avaliadas quanto a algumas de suas características morfológicas e agronômicas. A partir do final da década de 70, o Banco de Germoplasma de Milho vem sendo mantido pela Embrapa (PATERNIANI et al., 2000). A coleção é classificada em coleção base e

coleção ativa, que são mantidas pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e pela Embrapa Milho e Sorgo, respectivamente. No caso do Banco de Germoplasma de Milho, as coleções base e ativa, salvo casos de introduções recentes.

As zeínas, proteínas de reserva do milho, têm sido bastante estudadas pelo interesse que despertam tanto sob aspecto nutricional quanto tecnológico. Elas constituem uma importante fonte proteica na dieta humana uma vez que apresentam cerca de 80% das proteínas do milho. Estando presentes na alimentação humana, seja pelo consumo direto ou pelo consumo de carne de aves e suínos que têm sua alimentação à base de milho (BICUDO et al, 2006).

São polipeptídeos de massa molecular de 10 a 28 KDa classificadas em α , β , γ e δ zeínas. As zeínas α são peptídeos com massa molecular de 19 KDa (Z19) e 22 KDa (Z22), insolúveis em água e solúveis em álcool hidratado e representam de 75-85% da fração de zeínas totais. As zeínas β , Z14 e Z16, são solúveis em álcool hidratado após uso de agentes redutores e representam de 10 a 15% do total das prolaminas. As zeínas γ , Z28 e Z48, são solúveis em álcool e água após redução de pontes de dissulfeto (5-10%) e as zeínas δ (Z10), que são encontradas somente em baixa quantidade (FORATO, 2000; SHEWRY et al, 1990).

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes acessos de milho pertencente ao Banco de Germoplasma de Milho da Embrapa Milho e Sorgo quanto ao perfil eletroforético das zeínas, analisando possíveis distinções entre elas como subsídio para programas de melhoramento genético.

2- MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Qualidade de Grãos do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo da Embrapa, situado em Sete Lagoas – MG e no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa - MG.

2.1- Preparo da amostra

Foram analisados 74 acessos pertencentes ao Banco Germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo. Para as análises com o milho integral os grãos foram selecionados, moídos em moinho ciclone utilizando peneira de 0,5mm e as amostras obtidas foram armazenadas em freezer (-20°C).

2.2- Métodos de extração de zeína

Foi utilizado o Método Modificado para isolamento da zeínas de todos os acessos do Banco Germoplasma, onde uma solução de etanol 70% contendo ácido ascórbico foi adicionada ao milho integral moído, numa proporção de 10/1 (volume/peso), sob agitação por 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 9000 rpm. O sobrenadante foi liofilizado e armazenado em freezer (-20°C).

2.3- Caracterização das proteínas por SDS-PAGE

Para comparar se havia diferença entre as subunidades da zeína extraída de cada amostra de milho, a caracterização das frações proteicas foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foram utilizadas amostras de proteínas liofilizadas para o método X. As amostras foram desnaturadas em banho maria a 97°C por cinco minutos em solução de β -mercaptoetanol 5%; Tris-HCl 0,0625M (pH 6,8); glicerol 10%; SDS 2.3% (p/v); azul de bromofenol 0,1% (p/v) e submetida a um choque térmico em banho de gelo. Aplicou-se um volume de 5,0 μ L de cada amostra no gel.

A eletroforese foi conduzida em gel (SDS-PAGE) com gradiente de 6,0-15%, imerso em solução tampão Tris 0,025M; glicina 0,192M; SDS 0,1% (pH 8,8). Utilizou-se um sistema descontínuo, constituído por 2 géis, sendo um de resolução (principal) e outro de empilhamento (stacking gel) e conduzida em sistema vertical. As placas de vidro, com espessura de 1mm, contendo os géis foram submetidas à corrente de 15 mA até a entrada das amostras no gel principal e de 30mA até o final, por cerca de 2 horas. A coloração foi feita utilizando nitrato de prata, seguindo protocolo de BLUM et al (1978).

Para a identificação das proteínas presentes nas amostras, foram utilizados padrões de peso molecular fornecido pela Fermentas Life Sciences (Unstained Protein Molecular Weight Marker) contendo 7 proteínas com pesos moleculares de 14.4 a 116.0kDa.. Os géis foram fotodocumentados e as imagens obtidas analisadas.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após extração da zeína de cada acesso do Banco Germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo extraídas pelo Novo Método, utilizando etanol 70% e ácido ascórbico como agente redutor, as mesmas foram caracterizadas por eletroforese. Para isto foram aplicados 5,0 µg de cada amostra em cada poço. Os perfis proteicos das frações de zeína podem ser observados nas Figuras 5 à 10 que representa fotos dos géis com suas diferentes amostras aplicadas.

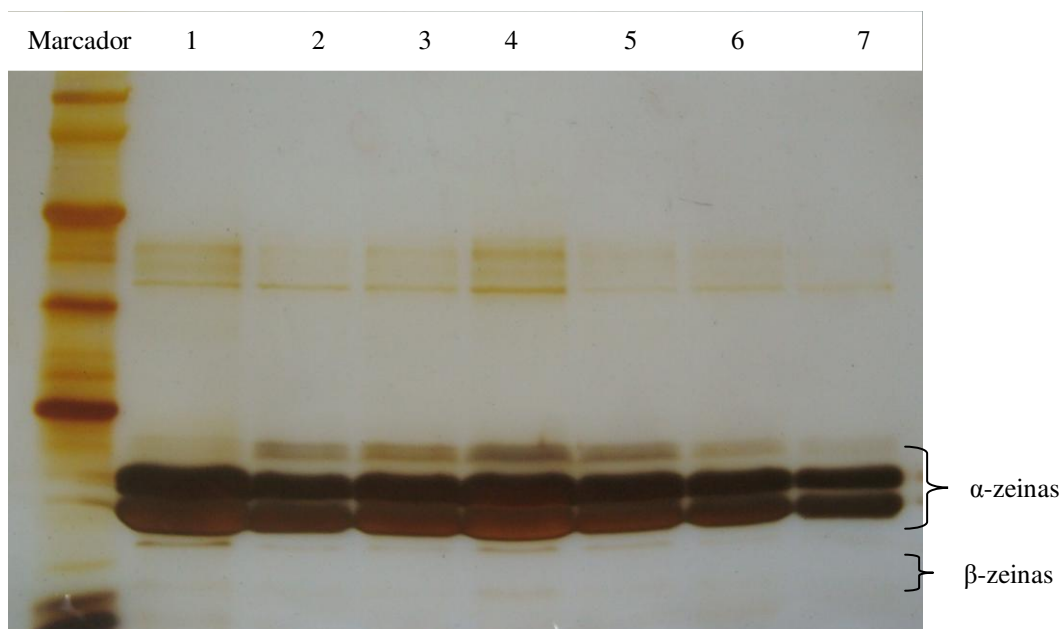


Figura 5: Mini geis (SDS/PAGE) de zeínas extraídas pelo Novo Método. Gel de empilhamento 6% e gel de separação 15% acrilamida - bis acrilamida. Corrida inicial a 20mA (atingir o gel de separação) e depois a 30mA, mantendo a voltagem constante no valor máximo. Volume aplicado/canaleta = 5µL. Padrão de peso molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas Life Sciences) = 10µL. Coloração com prata.

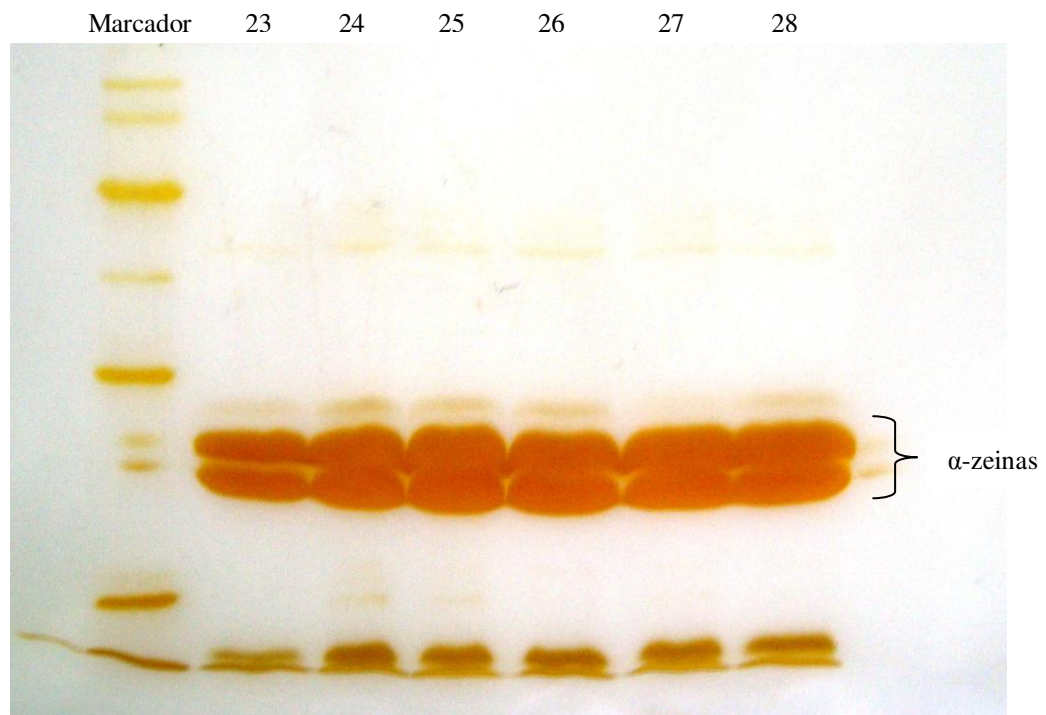


Figura 6: Mini geis (SDS/PAGE) de zeínas extraídas pelo Novo Método. Gel de empilhamento 6% e gel de separação 15% acrilamida - bis acrilamida. Corrida inicial a 20mA (atingir o gel de separação) e depois a 30mA, mantendo a voltagem constante no valor máximo. Volume aplicado/canaleta = 5µL. Padrão de peso molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas Life Sciences) = 10µL. Coloração com prata.

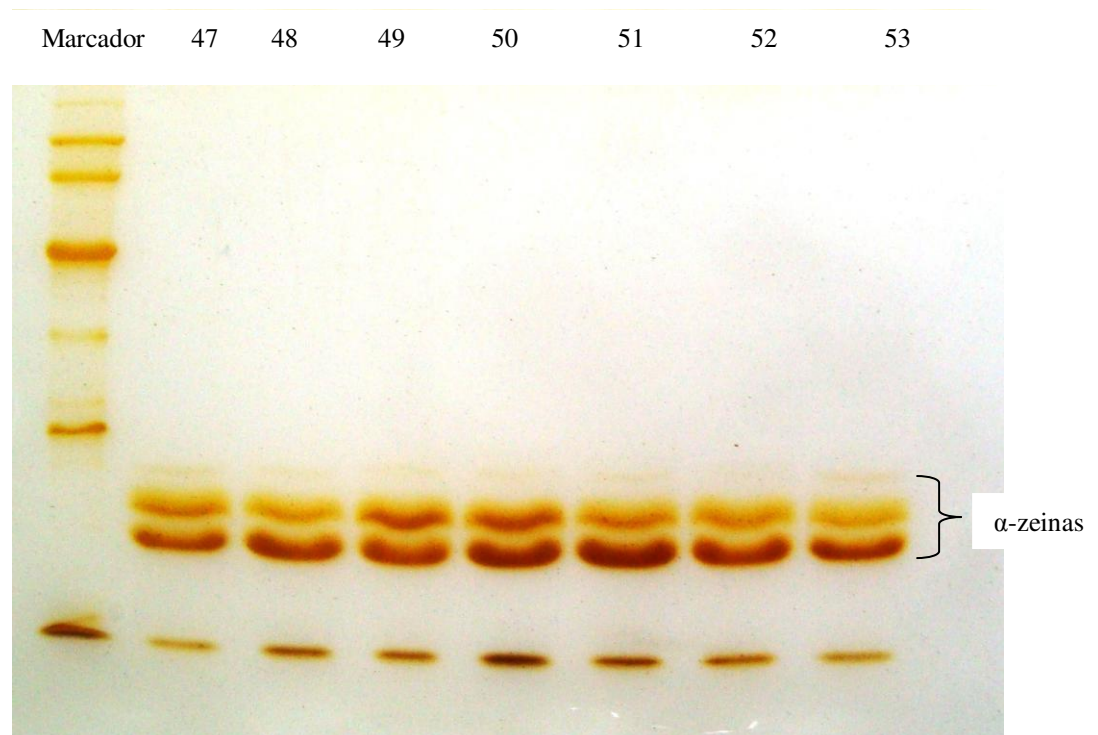


Figura 7: Mini geis (SDS/PAGE) de zeínas extraídas pelo Novo Método. Gel de empilhamento 6% e gel de separação 15% acrilamida - bis acrilamida. Corrida inicial a 20mA (atingir o gel de separação) e depois a 30mA, mantendo a voltagem constante no valor máximo. Volume aplicado/canaleta = 5µL. Padrão de peso molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas Life Sciences) = 10µL. Coloração com prata.

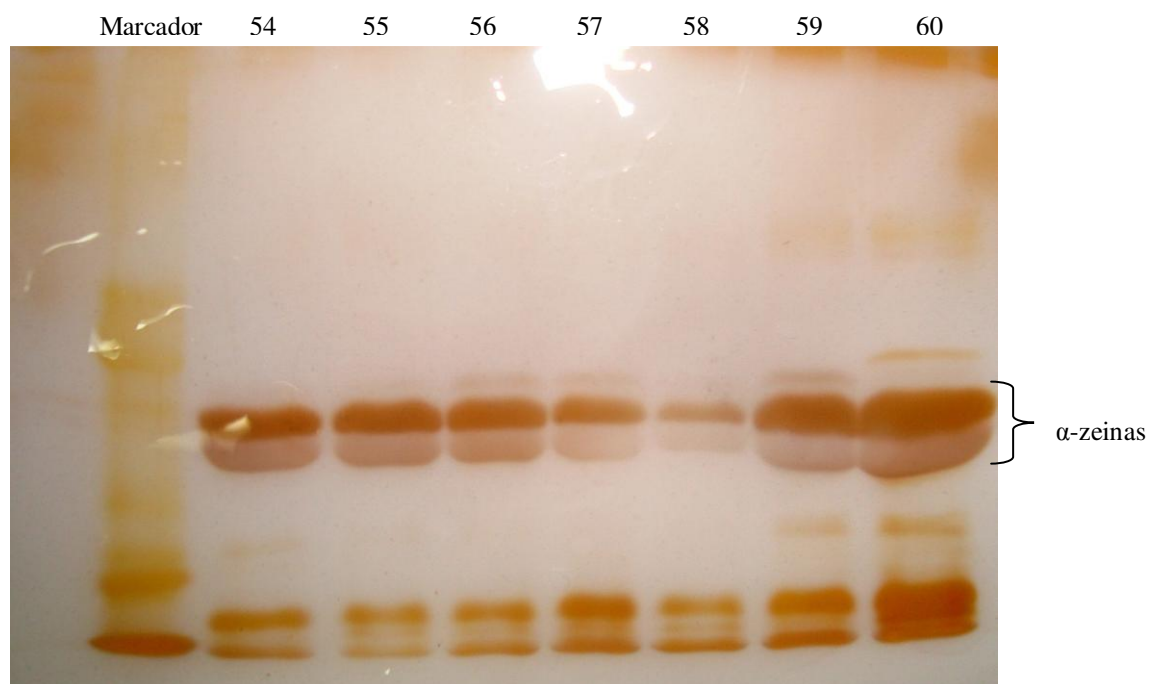


Figura 8: Mini geis (SDS/PAGE) de zeínas extraídas pelo Novo Método. Gel de empilhamento 6% e gel de separação 15% acrilamida - bis acrilamida. Corrida inicial a 20mA (atingir o gel de separação) e depois a 30mA, mantendo a voltagem constante no valor máximo. Volume aplicado/canaleta = 5 μ L. Padrão de peso molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas Life Sciences) = 10 μ L. Coloração com prata.

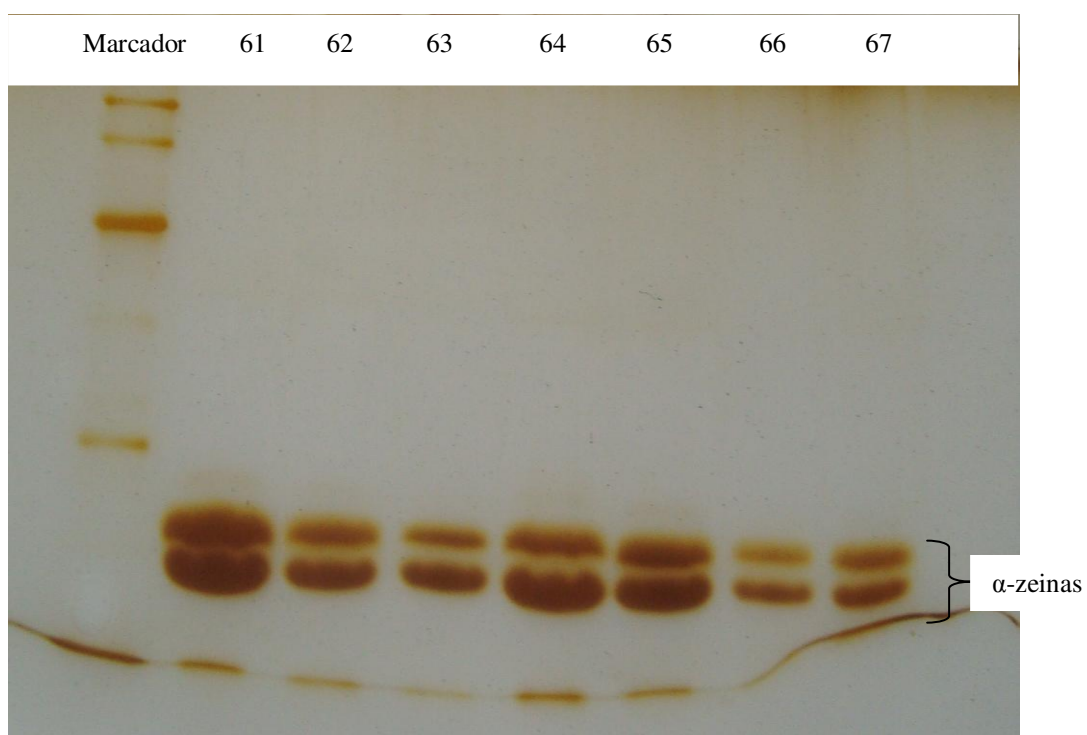


Figura 9: Mini geis (SDS/PAGE) de zeínas extraídas pelo Novo Método. Gel de empilhamento 6% e gel de separação 15% acrilamida - bis acrilamida. Corrida inicial a 20mA (atingir o gel de separação) e depois a 30mA, mantendo a voltagem constante no valor máximo. Volume aplicado/canaleta = 5 μ L. Padrão de peso molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas Life Sciences) = 10 μ L. Coloração com prata.

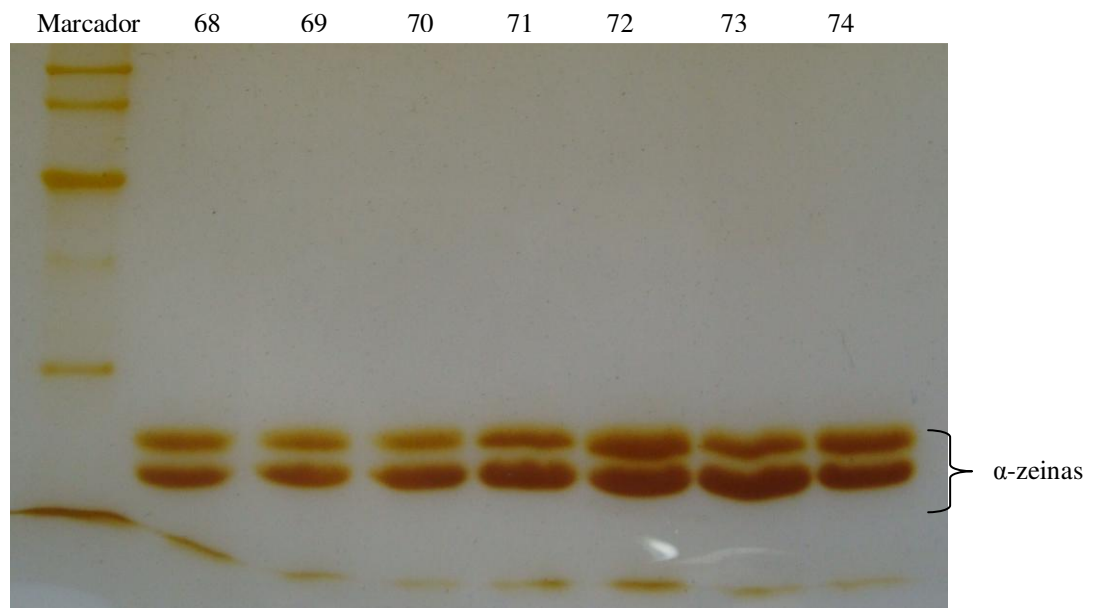


Figura 10: Mini geis (SDS/PAGE) de zeínas extraídas pelo Novo Método. Gel de empilhamento 6% e gel de separação 15% acrilamida - bis acrilamida. Corrida inicial a 20mA (atingir o gel de separação) e depois a 30mA, mantendo a voltagem constante no valor máximo. Volume aplicado/canaleta = 5 μ L. Padrão de peso molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas Life Sciences) = 10 μ L. Coloração com prata.

A importância de se analisar as frações de zeína de cada acesso do Banco Germoplasma é que a diferença dessas pode gerar características distintas no produto final após a aplicação dessas zeínas. As frações das zeínas observadas foram a α , β , γ e δ .

As zeínas α compreendem as proteínas de 19 KDa (Z19) e 22 KDa (Z22) constituindo de 75 a 85% das zeínas totais. A eletroforese (SDS/PAGE) da fração solúvel em álcool apresenta bandas variando de 19-22 KDa (Z19) e de 22-26 KDa (Z22). A análise dos DNA complementares (cDNA) e genes revelaram que essas proteínas continham 210-220 e 240-245 aminoácidos, e apresentaram estruturas muito similares. Os aminoácidos apolares alanina (A), glicina (G), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), fenilalanina (F), prolina (P) e valina (V) somam 60% dos resíduos totais nesta seqüência da Z19 e 65% na Z22. Os teores de glutamina nestas sequências da Z19, e Z22 são 18 e 19%, respectivamente (LASZTITY, 1996; SHEWRY et al, 1994).

As zeínas β correspondem aos grupos protéicos de 14 e 16 KDa, representam de 10 a 15 % das zeínas totais e são extraídas somente na presença de agentes redutores. As proteínas contêm cerca de 160 aminoácidos e são ricas em metionina (18 resíduos) e cisteína (7 resíduos). Não têm similaridade estrutural com as zeínas α e não apresentam repetições homólogas o que não é comum nas prolaminas. As metioninas estão reunidas

principalmente entre os resíduos 121 a 132. Estudos realizados em frações purificadas de zeínas β demonstraram que têm pouco conteúdo de α hélices, sendo a maior parte de folhas β (33 e 55 % com dois métodos de desconvolução) e estruturas não periódicas (voltas β e desordenadas) (LASZTITY, 1996; SHEWRY et al, 1994; WU et al, 1983).

A zeína γ apresenta banda em 28 KDa no gel de SDS/PAGE e é conhecida como glutelina 2. Para a solubilização dessa proteína, tanto em álcool 70% quanto em água, é necessário o uso de agentes redutores de ligação de dissulfeto. Elas representam de 5 a 10% das zeínas totais. Essa proteína tem 65 % de resíduos apolares, 15% de resíduos de glutamina e 7 resíduos de cisteína. Análises das zeínas γ indicaram que quando estão juntas com as zeínas β têm alto teor de estruturas hélices α (51%) e baixo teor de folhas β (14%), quando separadas, as zeínas γ apresentaram 26% de hélices α e 23% de folhas β (LASZTITY, 1996; SHEWRY et al, 1994; LARKINS et al, 1993; WU et al, 1983).

As zeínas δ correspondem à banda de 10 KDa na SDS/PAGE. Representam apenas traços das zeínas totais. Assim como as zeínas β e γ são extraídas somente com redução das ligações de dissulfeto. As zeínas δ têm 129 resíduos e não contêm domínios de repetição. Na região central contêm 17 das 29 metioninas, principalmente na forma de dublete M-M, separado por 2 a 3 resíduos (LASZTITY, 1996; SHEWRY et al, 1994).

Pode-se observar pela Figura 5 que aparentemente as amostras 1 e 4 apresentam maior teor de α -zeínas pela maior intensidade nas bandas e essas mesmas amostras foram as únicas que apresentaram traços de β -zeína. Na Figura 6 todas as amostras apresentaram grande intensidade nas bandas de α -zeínas e todas as amostras apresentaram β -zeína em um intensidade considerável. Na Figura 7 todas as amostras apresentaram menor intensidade nas bandas de α -zeínas e todas as amostras também apresentaram β -zeína em um intensidade considerável. Aparentemente na Figura 8 todas as amostras obtiveram as frações de α , β e γ zeínas. As amostras das Figuras 9 e 10 apresentaram apenas α -zeínas. Deste modo os perfis revelaram a presença de bandas proteicas variando entre 10kDa e 50kDa. Diferenças no perfil das proteínas foram observadas, entre as amostras distintas, para ausência, presença e intensidade de bandas.

Nota-se que a α -zeína apresentou maior número de bandas, assim como mais intensas em todos os géis. Sendo assim, pode-se afirmar que existem nessas amostras um teor considerável dos aminoácidos apolares alanina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina e valina. Em algumas amostras foram notadas

consideráveis bandas de β -zeínas, o que indica que essas amostras do Banco Germoplasma são ricas em metionina e cisteína.

4- CONCLUSÕES

A análise dos géis demonstrou que os padrões das zeínas diferiram entre os materiais avaliados. Tais diferenças no perfil eletroforético das zeínas extraídas dos diferentes acessos do Banco Germoplasma pode levar a uma alteração nas propriedades dos biofilmes elaborados a partir deles, o que seria útil para a melhoria dos mesmos.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BICUDO, R. C. et al. **Análise de zeínas α do milho por LC-ESI-Q/TOF**. Comunicado técnico 77 - EMBRAPA. São Carlos, SP. Nov., 2006.

BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p. 93-99, 1987

FORATO, L. A. **Estudo das estruturas das zeínas por RMN, FTIR e MFA**. 2000. Tese (Doutorado) Instituto de Química de São Carlos, USP, São Carlos.

LARKINS, B.A, LENDING, C.R., WALLACE, J.C. Modification of Maize- Seed-Protein Quality. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.58, n.2, p.S264-S269, 1993.

LASZTITY, R **The Chemistry of Cereal Proteins**. 2.ed. New York: CRC Press, 1996.

PATERNIANI, E.; NASS, E.; SANTOS, M. X. O valor dos recursos genéticos de milho para o Brasil – uma abordagem histórica da utilização do germoplasma. In: UDRY, C. V.; DUARTE, W. (Org.) **Uma história brasileira do milho – o valor dos recursos genéticos**. Brasília: Paralelo 15, 2000. p. 11- 42

SHEWRY, P.R.; MILES, M.J.; TATHAM, A S. The prolamin storage proteins of wheat and related cereais. **Progress in Biophysical Molecular Biology**, v. 61, p.37, 1994.

SHEWRY, P.R.; MILES, M.J.; TATHAM, A.S. The prolamin storage proteins of Wheat and related cereais. **Biochemistry Journal**. v.267, p.1-12, 1990.

TEIXEIRA, F. F.; SOUZA, B. O.; ANDRADE, R. V.; PADILHA, L. **Boas Práticas na Manutenção de Germoplasma e Variedades Crioulas de Milho**. Comunicado Técnico 113. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. 2005

WU, vv.. PAULIS, J.W.; SEXSON, K.R.; WALL, J.S. Conformation of corn zein and glutelin fractions with unusual amino acid sequence. **Cereal Chemistry**. v.60, n.5, p. 342, 1983.

CAPITULO 3

**COMPARAÇÃO ENTRE BIOFILMES PRODUZIDOS A PARTIR DE ZEÍNA
COMERCIAL E ZEÍNA EXTRAÍDA PELO MÉTODO MODIFICADO**

RESUMO

Filmes biodegradáveis que são produzidos a partir de fontes renováveis tem sido foco de estudos na área de embalagem de alimentos durante muitos anos. Filmes a base de biopolímeros podem ser produzidos a partir de proteínas, polissacarídeos, lipídios ou combinações destes. A zeína, proteína de armazenamento do milho (*Zea mays*), é adequada para a formulação de revestimentos comestíveis. Devido à presença de resíduos de aminoácidos apolares, a zeína é uma proteína hidrofóbica e é solúvel em álcool. Quando misturado com um plastificante, a zeína pode ser transformada em filmes flexíveis, selável pelo calor. As propriedades funcionais de filmes, tais como propriedades de barreira e de estabilidade estão relacionadas com a organização molecular de biopolímeros utilizados durante a formação da película. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar as características físicas de um filme produzido a partir de zeína pura. Os filmes foram produzidos através da utilização de zeína pura. Formulações com zeína em concentração de 20%, em peso, solubilizado em etanol 70%, e glicerol (12%) foram preparadas. Os filmes foram submetidos a análises instrumentais de cor, opacidade e espessura. Os resultados mostraram que o filme com maior espessura, possui coloração mais intensa e é mais opaco. A análise mostrou que o filme mais espesso parece ser mais maleável e menos quebradiço. Portanto, mais estudos têm de ser feitos para melhorar as características desejáveis, tais como flexibilidade e transparência, uma vez que são características essenciais para aplicação do filme em produtos alimentícios.

ABSTRACT

Biodegradable films which are produced from renewable sources have been the core of food packaging studies for many years. Biopolymer based films can be produced from proteins, polysaccharides, lipids or combinations of these. The maize (*Zea mays*) storage-protein zein is suitable for formulating shiny edible coatings. Because of the presence of apolar amino acid residue, zein is a hydrophobic protein and is soluble in alcohol. When blended with a plasticizer, zein can be transformed in flexible, heat-sealable films. The functional properties of films such as barrier properties and stability are related to the molecular organization of biopolymers used during film formation. Therefore, the aim of this study was to assess the physical characteristics of a film produced from purified zein. Films were produced by the use of purified zein. Formulations with zein concentration of 20% by weight, solubilized in a 70% ethanol, and glycerol (12%) was prepared. The films were subjected to colorimetry, opacity, thickness and subjective analysis. Results showed that the thickness greater, more intense staining and more opaque is the film. Subjective analysis showed that the film thicker seems to be more malleable and less brittle. Therefore, more studies need to be made to improve desirable characteristics such as flexibility and transparency, since they are essential characteristics of the film for application in food products.

1- INTRODUÇÃO

O uso de filmes e coberturas comestíveis em produtos alimentícios parece uma técnica recente, no entanto, a aplicação de ceras em frutas cítricas vem sendo utilizada desde os séculos XII e XIII na China, para retardar a desidratação e melhorar a aparência das mesmas (DEBEAUFORT et al., 1998).

Embora os termos filmes e coberturas comestíveis sejam muitas vezes utilizados indiscriminadamente, a diferença básica é que os filmes são pré-formados, separadamente, e aplicados posteriormente sobre o produto. Já as coberturas são formadas sobre a própria superfície do alimento, o que pode ser efetuado, por exemplo, por imersão ou aspersão (KESTER e FENNEMA, 1986; KROCHTA; MULDER-JOHNSTON, 1997). Filmes e coberturas podem ser classificados em comestíveis e/ou biodegradáveis, dependendo dos constituintes utilizados para sua produção e da quantidade das substâncias empregadas (SHIH, 1996).

Existe um grande interesse no desenvolvimento de biofilmes comestíveis ou degradáveis biologicamente, principalmente devido à demanda por alimentos de alta qualidade, preocupações ambientais sobre o descarte de materiais não renováveis (utilizados como embalagem para alimentos) e oportunidades para criar novos mercados de matérias-primas formadoras de filme, como hidrocolóides e lipídios (PALMU, 2003).

Os filmes e coberturas possuem a função de inibir ou reduzir a migração de umidade, oxigênio, dióxido de carbono, lipídios, aromas, dentre outros, pois promovem barreiras semipermeáveis. Além disso, podem transportar ingredientes alimentícios

como: antioxidantes, antimicrobianos e flavorizantes, e/ou melhorar a integridade mecânica ou as características de manuseio do alimento (KROCHTA e MULDER-JOHNSTON, 1997). A utilização de filmes e coberturas comestíveis está relacionada com sua capacidade de agir como um adjunto para promover maior qualidade, estendendo a vida de prateleira e possibilitando a economia com materiais de embalagem final (KESTER e FENNEMA, 1986).

Os biopolímeros mais utilizados na elaboração de filmes e coberturas comestíveis são as proteínas (gelatina, caseína, ovoalbumina, glúten de trigo, zeína e proteínas miofibrilares), os polissacarídeos (amido e seus derivados, pectina, celulose e seus derivados, alginato e carragena) e os lipídios (monoglicerídeos acetilados, ácido esteárico, ceras e ésteres de ácido graxo) ou a combinação dos mesmos (CUB et al, 1995).

As aplicações para os filmes de proteínas são inúmeras, desde filmes para a agricultura, coberturas comestíveis e ainda podem ser associados com outros materiais para a obtenção de embalagens para alimentos, proporcionando a diminuição na utilização de materiais não biodegradáveis (TROPINI *et al.*, 2004; THARANATHAN 2003). Filmes de proteínas podem funcionar como excelentes barreiras à umidade, oxigênio, *flavors* e aromas protegendo a qualidade de alimentos e outros produtos. Além disso, podem também promover proteção mecânica a alimentos e drogas e funcionar como portadores de aditivos, tais como antioxidantes e substâncias antimicrobianas. (KESTER e FENNEMA, 1986; GENNADIOS, 1997; HAN, 2000). Quando um filme de proteínas previne a troca de umidade, oxigênio e aromas entre o alimento e o meio ambiente, a qualidade e a vida de prateleira deste alimento são significativamente melhoradas. Além disso, após a embalagem ser aberta, um filme biodegradável pode continuar a proteger o alimento (NAYAK, 1999).

As proteínas do milho são ricas em resíduos de aminoácidos apolares como leucina, alanina e prolina e são, portanto insolúveis em água e solúveis em soluções aquosas de etanol a 70%. Essa característica confere as zeínas um caráter fortemente hidrofóbico, sendo capazes de formar filmes biodegradáveis que atuam como barreiras à umidade e ao oxigênio. Esses filmes são usados na cobertura de medicamentos e alimentos *in natura*, em função da sua não toxicidade, biodegradabilidade e por serem oriundos de fontes renováveis (FORATO, 2000).

Os revestimentos à base de zeína de milho formam cobertura insípida, dura e transparente e apresentam estabilidade em alta umidade e calor, sendo normalmente

usados para cobertura de doces, frutas secas, nozes, arroz, sementes e tabletes farmacêuticos. Um benefício adicional da zeína é sua resistência natural ao ataque bacteriano e de alguns insetos (KLAHORST, 1999).

O biofilme da zeína é formado através do desenvolvimento de interações de hidrogênio, hidrofóbico e limitado pontes dissulfeto entre as cadeias de zeína (GUILBERT, 1986; KROCHTA, 1997). Os filmes de zeína são frágeis e, portanto, plastificantes são necessários para melhorar a sua flexibilidade. Para torná-las mais flexíveis, plastificantes são adicionados às proteínas, e incluem: propilenoglicol, trietilenoglicol, polietilenoglicol, glicerol, ácidos levulínico e oléico, água, entre outros. Esses, no entanto, podem tornar os filmes frágeis demais para serem usados quando usados em excesso. A própria água também pode ser um plastificante para a zeína. A zeína é ainda higroscópica, significando que pode ganhar ou perder água para atingir o equilíbrio com o ar ambiente. A quantidade de água absorvida ou perdida nesses filmes é afetada pela umidade relativa do ar ambiente (LAWTON JUNIOR, 2004).

Neste sentido, o objetivo do trabalho foi primeiramente produzir filmes biodegradáveis a partir de zeína comercial e a partir daí, com base nos melhores resultados a partir de zeína isolada de pelo Método Modificado de extração.

2- MATERIAL E MÉTODOS

O Trabalho foi conduzido no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG e no Laboratório de Qualidade de Grãos Embrapa Milho e Sorgo Sete Lagoas – MG

2.1- Elaboração dos biofilmes

Para a formação dos filmes controle, foi utilizada a zeína comercial SIGMA onde a mesma foi solubilizada em solução aquosa de etanol em banho maria a 50°C por 5 minutos. Em seguida foram lentamente acrescentados glicerol, como coadjuvante do agente plastificante e o emulsificante. Essa solução foi agitada a temperatura de 50°C durante 5 minutos. A solução foi então despejada sobre placas de polietileno com espessura de 0,380 mm, aproximadamente, e o material mantido à temperatura ambiente (25°C) sobre superfície nivelada durante 24 horas para secagem seguindo procedimento. Após a secagem, os filmes foram retirados e armazenados em dessecadores para análises posteriores (TIHMINLIOGLU et al. 2010 adaptado e KLEEN et al. 2002 adaptados).

Diferentes combinações foram realizadas com zeína comercial (2g), etanol 70% (10mL), glicerol (15% ou 30%) e um emulsificante (25% ou 50%).

2.2- Caracterização dos biofilmes

Aspecto visual

Após a secagem dos filmes foram realizadas análises visuais e táteis visando separar somente aqueles com boa homogeneidade. Os parâmetros considerados nessa verificação foram: coloração, espessura, presença de partículas insolúveis, continuidade dos filmes, isto é, sem apresentar rupturas ou zonas quebradiças, a facilidade na sua retirada da superfície, filmes com boa manuseabilidade quando retirado do suporte. Os filmes e formulações que não apresentaram essas características foram descartados uma vez que poderiam comprometer os resultados.

Espessura

A análise de espessura foi feita com o auxílio de um micrômetro digital 0-25mm modelo DIGIMESS, realizando-se a média aritmética de cinco medições aleatórias feitas nos filmes produzidos.

Cor

A análise de cor foi feita com o auxílio de um colorímetro da KONICA MINOLTA modelo CR 400. O sistema de cor CIELAB funciona como um tradutor universal de línguas entre os dispositivos, permitindo controlar as cores que passam de um dispositivo para outro, correlacionando os valores em RGB ou CMYK com os valores em L^* a^* b^* . A Figura 11 representa o modelo de CIELAB.

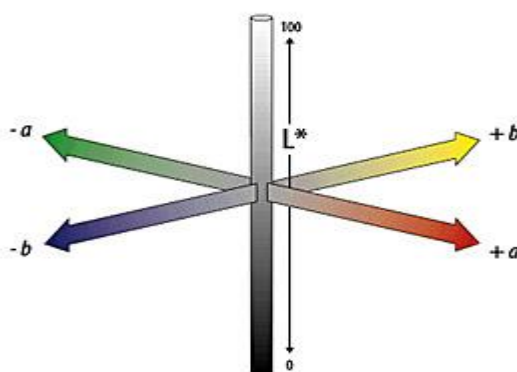


Figura 11 : Representação tridimensional da cor CIELAB

Ângulo de contato

Análises de ângulo de contato foram feitas com um STANDARD GONIOMETER modelo número 200 - F1.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os filmes utilizados para as análises foram previamente classificados visualmente em relação à homogeneidade das amostras (livre de partículas insolúveis – não interação com a matriz), espessura uniforme e boa maleabilidade.

Filmes feitos apenas com zeína comercial e etanol 70%, sem a adição de plastificante e emulsificante (CONTROLE) se apresentaram bastante quebradiços. Já os filmes que receberam essas duas substâncias apresentaram-se com melhor maleabilidade. Aqueles que receberam maior quantidade do emulsificante exibiram maior maleabilidade do que os que receberam menor quantidade deste, entretanto mostraram relativamente maior oleosidade que estes. Aparentemente o uso do emulsificante melhorou, além da maleabilidade, a resistência dos filmes. A utilização da zeína isolada em substituição à zeína comercial não foi capaz de formar filme.

A adição de plastificante influenciou a molhabilidade dos filmes. Este fato pode ser explicado pela ação do plastificante em uma matriz polimérica, que pode ser entendida como moléculas que se ligam às cadeias principais enfraquecendo predominantemente as ligações de hidrogênio que conferem estabilidade entre as cadeias. Essas interações com as moléculas de plastificante reduzem as forças intermoleculares facilitando o deslocamento relativo das cadeias (SHAW et al, 2002). Com o aumento da concentração de plastificante o espaço entre as cadeias aumenta, nestas condições a difusão é facilitada, elevando a penetração de moléculas de água para o interior do filme (PARAMAWATI et al, 2001).

Formulações que mostraram resultados melhores com relação à cor, espessura e ângulo de contato estão na Tabela 3:

Tabela 3: Valores obtidos pela análise de espessura, cor e angulo de contato de acordo com a formulação dos biofilmes a base de zeína comercial ou isolada

Formulações	Espessura (µm)	Cor	Ângulo de Contato
Zeína Comercial (2,0g) + etanol 70% (10mL) sem adição de plastificante (CONTROLE)	215	L = 28,95 ^c a* = -1,04 ^c b* = 10,57 ^c	-
Zeína Comercial (2,0g) + etanol 70% (10mL) + 15% de glicerol + 25% de emulsificante	272	L = 26,03 ^c a* = -0,49 ^e b* = 8,56 ^d	18,68 ^b
Zeína Comercial (2,0g) + etanol 70% (10mL) + 15% de glicerol + 50% de emulsificante	301	L = 30,95 ^b a* = -0,89 ^d b* = 14,06 ^b	8,57 ^d
Zeína Comercial (2,0g) + etanol 70% (10mL) + 30% de glicerol + 25% de emulsificante	333	L = 47,41 ^a a* = -1,36 ^a b* = 29,86 ^a	24,82 ^a
Zeína Comercial (2,0g) + etanol 70% (10mL) + 30% de glicerol + 50% de emulsificante	377	L = 44,05 ^a a* = -1,24 ^b b* = 29,11 ^a	11,74 ^c
Zeína isolada pelo Novo Método (2,0g) + etanol 70% (10mL) + 15% de glicerol + 50% de emulsificante)	**	L = 30,10 ^b a* = 0,08 ^f b* = 14,34 ^b	**

**Não houve resultado por não ter havido formação de filme nessas condições.

Não houve formação de filme utilizando a zeína isolada provavelmente pela presença do agente redutor ácido ascórbico na solução filmogênica que impediu a interação molecular. A análise de cor neste material foi feita com a amostra na placa de Petri e, provavelmente foi por essa razão que foi encontrado um valor positivo para a*.

Para avaliação da cor do material foi realizada leitura direta de reflectância das coordenadas **L**, **a** e **b**, sendo **L** relativo ao branco e negro (luminância); **a**, ao vermelho e verde, e **b**, ao amarelo e azul. Os filmes processados a partir de zeína com combinações de etanol, glicerol e emulsificante apresentaram coloração amarelada, transparência e brilho irregular. Os filmes que apresentaram coloração mais amarela foram aqueles elaborados a partir de zeína comercial e com maior teor de glicerol (30%). O filme com menor coloração amarela foi o filme elaborado a partir de zeína comercial com 15% de glicerol e 25% de emulsificante. A coloração amarela predominante no filme curado deve-se a presença de carotenoides na proteína, predominantemente β -caroteno, zeaxantina e luteína em maior quantidade. Em aplicações comerciais as zeínas podem ser descoloridas para a geração de membranas incolores (SESSA et al, 2003).

Com respeito ao aspecto topográfico dos filmes, vemos na fotografia da Figura 12, duas imagens representativas do filme à base de zeína comercial com a adição de plastificante onde observa-se a formação de irregularidades topográficas em escala microscópica, porém com ausência de trincas. A formação de trincas no filme inviabilizaria qualquer tipo de emprego e mesmo o seu manuseio

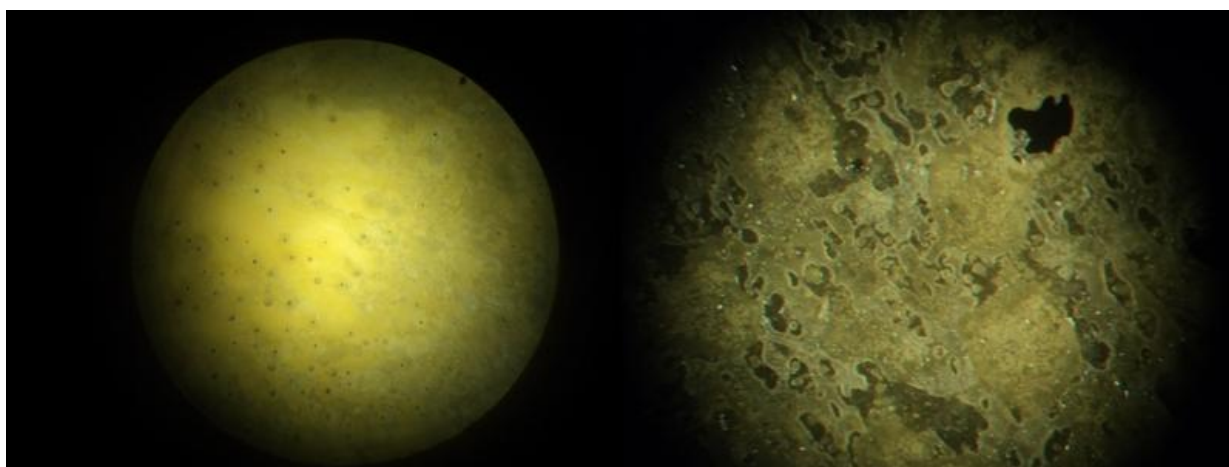


Figura 12: Fotografia do biofilme a base de zeína utilizando lente de aumento.

Com relação ao ângulo de contato observou-se que após os primeiros segundos de contato da gota com a superfície, há um comportamento de recuo do ângulo medido com tendência a estabilização após aproximadamente alguns minutos. Este comportamento, denominado *receding* (ou ângulo de recuo), ocorre em todos os filmes independentes do teor de plastificante e é um aspecto comum na maioria das superfícies biopoliméricas (XINPING et al, 2005).

Todas as combinações zeínas-plastificantes ensaiadas resultaram em películas com deficiente solubilização das proteínas adicionadas, não gerando uma solução homogênea e, por conseguinte os filmes formados são altamente irregulares, seja na espessura ou na distribuição da fração proteica. Na literatura encontramos descritos processamentos de filmes a partir de zeínas em diversas concentrações de proteínas, embora a maioria esteja acima da solubilidade o que resulta em filmes não homogêneos com clara separação de fases e propriedades mecânicas irregulares (LAI e PADUA, 1997). À medida que foi se acrescentando o plastificante e o emulsificante a espessura do filme foi aumentando.

4- CONCLUSÕES

Bons resultados foram obtidos nas formulações dos biofilmes formados a partir da zeína comercial, mas necessita-se de mais estudos para a diminuição da oleosidade dos mesmos. Faz-se necessário também a investigação do Método Modificado de extração de zeína para que a proteína gerada seja capaz de formar o biofilme, resultado não encontrado nesse trabalho.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Edible film and coating as active layers. In: ROONEY, M. L. (Ed.) **Active food packaging**. London: Blackie Academic & Professional, 1995. p. 111-142.

CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Proteins as agricultural polymer for packaging production. **Cereal Chemistry**, v. 75, p. 1-9, 1998.

DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J. A.; VOILLEY A. Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. **Crit. Rev. Food Sci.**, v. 38, n. 4, p. 299-313, 1998.

FORATO, L. A. **Estudo das estruturas das zeínas por RMN, FTIR e MFA**. 2000. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

GENNADIOS, A.; HANNA, MILFORD A.; KURTH, L. B. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: A review. **Lebensmittel – Wissenschaft Und – Technologie**, v. 30, p. 337-350, 1997.

GUILBERT, S. Technology and application of edible protective films. In M. Mathlouthi (Ed.), **Food packaging and preservation** (pp. 371–394). London, UK: Elsevier Applied Science, 1986.

HAN, J. H. Antimicrobial food packaging. **Food Technology**, v. 54, p. 56-65, 2000.

KESTER, J.J.; FENNEMA, O.R. Edible Films and Coatings: A Review. **Food Technology**, December, p. 47-59, 1986.

KLAHORST, S. J. Applications: Credible Edible Films. **Food Product Design**. p. 1-6. September, 1999.

KROCHTA, J. M.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technology*, v.51, n. 2, p. 61-74, 1997.

LAI, H.-M. e PADUA, G. W. - *Cereal Chem.*, 74, p.77, 1997.

LAWTON JUNIORr, J. W. Plasticizers for zein: their effect on tensile properties and water absorption of zein films. *Cereal Chemistry*, Saint Paul, v. 81, n. 1, p. 1-5, 2004.

NAYAK, P. L. Biodegradable polymers: Opportunities and challenges. *J.M.S. – Rev. Macromol. Chem. Phys*, v. 39 n.3, p. 481-505, 1999.

PALMU, P. S. T. **Preparação, propriedades e aplicação de biofilmes comestíveis à base de glúten de trigo**. Campinas, 2003, 244 p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, (UNICAMP).

PARAMAWATI, R.; YOSHINO, T. & ISOBE, S. - *Food Science Technology Res.*, 7, p.191, 2001.

SESSA, D. J.; ELLER, F.J.; PALMQUIST, D. E. & LAWTON, J. W. - *Ind. Crop. Prod.*, 18, p.55, 2003.

SHAW, N. B.; MONAHAN, F. J.; O'RIORDAN, E. D. & O'SULLVAN, M. – *J. Food Science.*, 67, p.164, 2002.

SHIH, F. F. Edible films from rice protein concentrate and pullulan. *Cereal Chem.*, v. 73, n. 3, p. 406-409, 1996.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Food Science e Technology*, v. 14, p. 71-78, 2003.

TIHMINLIOGLU, F.; ATIK, I. D.; OZEN, B. *J Food Eng* 2010, 96, 342.

TROPINI, V.; LENS, J.P.; MULDER, W.J.; SILVESTRE,F. Wheat glúten films cross-linked with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and n-hydroxysuccinimide. *Industrial Crops and Products*, v. 20, p. 281-289, 2004.

XINPING, W.; ZHIFANG, C. & ZHIQUAN, S. - *Science in China Ser. B Chem.*, 48, p.553, 2005.

CAPITULO 4

**AVALIAÇÃO DE ATRIBUTOS DE QUALIDADE EM COBERTURAS
COMÉSTIVEIS A BASE DE ZEÍNA APLICADOS EM MILHO VERDE**

RESUMO

O milho verde colhido é altamente perecível devido ao seu elevado teor de umidade, o que torna seu período de comercialização bastante restrito exigindo precisão do produtor na colheita, rapidez na comercialização e, para a indústria, curto tempo de utilização das espigas. Um dos desafios neste segmento de mercado é melhorar a eficiência do produtor rural no processo de comercialização de sua produção com redução das perdas pós-colheita. Coberturas de proteínas são alternativas para a conservação de alimentos, podendo funcionar como excelentes barreiras à umidade, oxigênio, *flavors* e aromas protegendo a qualidade de alimentos e outros produtos. Além disso, podem funcionar como portadores de aditivos, tais como antioxidantes e substâncias antimicrobianas. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de cobertura comestível elaborada a partir de zeína, extraída do milho integral moído. Posteriormente, a formulação foi utilizada como cobertura comestível no aumento da vida de prateleira de milho verde, mantidas sob-refrigeração controlada durante 9 dias. As zeínas utilizadas no preparo das soluções filmogênicas foram extraídas dos milhos BRS1060 (milho normal) e BR473 (milho com alto teor protéico) em solução de etanol 70% e ácido ascórbico (agente redutor não tóxico). A solução de zeína obtida foi acrescida do plastificante glicerol para formação da solução filomogênica. A cobertura de zeína foi aplicada aos milhos verdes após atingir temperatura ambiente, e embaladas em bandejas por 9 dias. Foram analisados perda de massa, pH, umidade, acidez titulável, cor e sólidos solúveis totais nas espigas de milho verde. Ficou evidenciado que o armazenamento utilizando a cobertura de zeína foi eficiente para manter a umidade

dos grãos das espigas e aumentar a luminosidade e brilho. Esse aspecto já é positivo levando em consideração que a perda da umidade das espigas gera o murchamento dos grão e, conseqüentemente, diminuição na vida de prateleira dos mesmos, assim como a luminosidade melhora o aspecto visual das espigas. Sendo assim, sugere-se mais estudos com relação à composição da cobertura de zeína para que possa haver melhorias em outros aspectos de conservação.

ABSTRACT

Harvested corn is highly perishable due to its high moisture content, which makes its trading period requiring very limited accuracy of the producer harvest, rapid commercialization, and for the industry, short-time use of spikes. One of the challenges in this market segment is to improve the efficiency of farmers in the marketing process for their production, reducing post harvest losses. Covers proteins are alternatives for preserving food and can act as excellent barrier to moisture, oxygen, aromas and flavors protecting the quality of food and other products. Furthermore, they can function as carriers for additives such as antioxidants and antimicrobial compounds. The objective of this study was the development of edible coating made from zein extracted from the whole corn. Subsequently, the formulation was used as edible coating to increase the shelf life of corn, kept under controlled-cooling for 9 days. The zein storage solutions used in the preparation of film formation were extracted from corns BRS1060 (normal corn) and 473 (corn with high protein) in 70% ethanol solution and ascorbic acid (reducing agent is not toxic). The zein solution obtained was added to the formation of glycerol plastizante solution. The coverage was applied to corn zein green after reaching room temperature, and packaged in trays for 9 days. Were analyzed mass loss, pH, moisture, acidity, color and soluble solids in the ears of corn. It was evident that the storage using the cover of zein was effective to keep the ears of grain moisture and increase the brightness and brilliance. This positive aspect is already taking into account the loss of moisture from the spikes raises the shrinkage of the grain and thus loss of shelf life thereof, and the brightness improved visual appearance of the spikes. Thus, it

is suggested further studies with respect to the composition of zein cover so that there is improvement in other aspects of conservation

1- INTRODUÇÃO

Visando desenvolver e caracterizar biofilmes com o potencial de aplicação nos setores alimentícios e agrícola, vários estudos foram realizados (BATISTA et al., 2005; YU et al., 2006). No setor alimentício, as pesquisas sobre embalagens estão focadas em filmes e revestimentos comestíveis à base de biopolímeros, como proteínas, polissacarídeos e lipídios, que são biodegradados, dentro de um período consideravelmente curto de tempo, contribuindo sobremaneira para a diminuição do impacto ambiental (GONTARD, N. GUILBERT, S. 1995).

A diferença entre cobertura e filme é que a primeira é uma fina camada de material aplicado e formado diretamente na superfície do produto, enquanto que o segundo é pré-formado separadamente e aplicado posteriormente sobre o produto (GONTARD, N.; GUILBERT, S. 1995; KROCHTA, J. M.; MULDER-JOHNSTON, C. 1997). Podem ser classificados em comestíveis e/ou biodegradáveis, dependendo dos constituintes utilizados para sua produção e da quantidade das substâncias empregadas (SHIH, 1996).

Quanto ao preparo, às formulações de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis devem incluir pelo menos um componente capaz de formar uma matriz adequada, contínua, coesa e aderente (GUILBERT e BIQUET, 1995). Entretanto, é necessária a utilização de diversos componentes, sendo cada qual com a sua finalidade específica. As formulações são constituídas de pelo menos um agente formador de filme (macromoléculas), solvente (água, etanol, água/etanol, entre outros), plastificante

(glicerol, sorbitol, etc), agente ajustador de pH (ácido acético, NH₄OH, etc) (BERTAN, 2005).

Os plastificantes tem como função reduzirem as forças de ligação entre moléculas em sistemas de baixa umidade, aumentando a flexibilidade do filme (VEIGA- SANTOS et al., 2005). São componentes de baixa volatibilidade os quais podem ser adicionados para dar flexibilidade a um filme de polímero (KESTER e FENNEMA, 1986). Caracterizam-se por ser um componente muito importante na composição do filme, uma vez que é exigido para superar a fragilidade e melhorar a flexibilidade e extensibilidade dos filmes comestíveis (FAMA et al., 2005). Ou seja, eles permitem a obtenção de filmes menos frágeis, mais flexíveis, mais suaves, e eventualmente mais duros e resistentes. A redução das forças intermoleculares entre as cadeias do polímero e em consequência da coesão do conjunto facilita a alongação do filme e diminui sua temperatura de transição vítrea, porém, pelo contrario, faz com que diminuam as propriedades de barreira frente aos gases, vapores e solutos (GUILBERT e BIQUET, 1995; VEIGA SANTOS et al., 2005).

Por promoverem barreiras semipermeáveis, filmes e coberturas têm como principal função inibir ou reduzir a migração de umidade, oxigênio, dióxido de carbono, lipídios, aromas dentre outros. Podem também transportar ingredientes alimentícios como: antioxidantes, antimicrobianos e flavorizantes, e/ou melhorar a integridade mecânica ou as características de manuseio do alimento (PALMU, 2003). Os filmes e revestimentos demonstram ser uma técnica persuasiva de preservação de frutas e hortaliças mantendo a aparência fresca, a firmeza e o brilho, aumentando, assim, o valor comercial (SOTERO, 2000).

A comercialização de hortaliças tem como limitante a rápida perda de qualidade pós-colheita (DEL-VALLE, 2005; CIA et al., 2007). A eliminação ou minimização destas perdas apresenta diversas vantagens, como: aumento no abastecimento de produtos sem aumento da área de cultivo, economia energética relacionada à fração de sua produção e comercialização, redução da poluição e satisfação das necessidades do consumidor com a mesma quantidade de energia, terra, água e trabalho (CHITARRA, 2005).

Um dos fatores considerados mais importante na conservação de hortaliças é a temperatura, a qual afeta diretamente os processos naturais de respiração, transpiração e outros aspectos fisiológicos (CORTEZ; HONORIO; MORETTI, 2002; PIZARRO, 2009). À medida que a temperatura ambiente aumenta a velocidade de deteriorização

dos produtos alimentícios também aumenta, e conseqüentemente há uma redução do período de conservação do alimento. Portanto, sem o uso da refrigeração, as deteriorações são mais rápidas devido à alta taxa metabólica, com perdas de aroma, sabor, textura, cor e demais atributos de qualidade. A taxa metabólica deve ser mantida em nível mínimo e suficiente para manter as células vivas, de forma a preservar a qualidade dos produtos durante todo o período de armazenamento (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Entretanto, para o armazenamento prolongado, somente a redução da temperatura não é suficiente para manter a qualidade das hortaliças, sendo necessário utilizar técnicas complementares, visando ao prolongamento da sua vida útil (MALGARIM et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de cobertura comestível elaborada a partir de zeína, extraída do milho integral moído. Posteriormente, a formulação foi utilizada como cobertura comestível no aumento da vida de prateleira de espigas de milho verde, mantidas sob-refrigeração controlada durante 9 dias.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Milho verde

Foi utilizado o híbrido de milho (*Zea mays*) Doce Vivi, da Embrapa Milho e Sorgo. Os híbridos foram plantados em maio de 2012 e o ponto de colheita de cada um foi definido através de testes manuais (método prático utilizado pelos colhedores de milho verde). As colheitas foram realizadas manualmente nas primeiras horas da manhã, sendo armazenados em caixas de isopor e imediatamente transportados ao Laboratório Qualidade de Grão da Embrapa Milho e Sorgo.

As espigas ainda com palha foram submergidas em solução aquosa com 100 ppm de cloro livre (50 mL de hipoclorito de sódio a 2% para 10 L de água) por 15 minutos. Em seguida as espigas foram despalhadas e selecionadas de acordo com o grau de maturação e o tamanho (ideal para comercialização igual ou maior que 18 cm). As espigas despalhadas foram higienizadas com solução de hipoclorito de sódio 20 ppm (10 mL de hipoclorito de sódio a 2% para 10 L de água). As sanitizações foram realizadas, conforme proposto pelo Programa Alimento Seguro (PAS) do SENAI (Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial) para desinfecção de vegetais que são destinados a processos térmicos, a exemplo do milho verde em conserva (GUIA, 2000).

Depois de sanitizadas as espigas foram mergulhadas na solução filmogênica por 10 minutos e em seguida embaladas nas bandejas já identificadas.

2.2- Solução filmogênica

As zeínas utilizadas no preparo das soluções filmogênicas foram extraídas dos milhos BRS1060 (milho normal) e BR473 (milho com alta qualidade proteica) em solução de etanol 70% e ácido ascórbico como agente redutor. A solução de zeína obtida foi acrescida do plastizante glicerol à temperatura de 55°C, sob agitação, por 5 minutos para formação da solução filmogênica. A cobertura de zeína foi aplicada aos milhos verdes após atingir temperatura ambiente.

2.3- Preparo das bandejas

As espigas foram acondicionadas em bandejas de poliestireno, com dimensões de 23,5cm de comprimento e 18,2 cm de largura; sendo três espigas por bandeja, de acordo com os tratamentos listados na Tabela 4. Essas foram envoltas com filme policloreto de vinila (PVC) de 18mm de espessura. Em seguida as bandejas foram pesadas e armazenadas em BOD, marca Fricon, modelo CV1P-55 a temperatura de 5°C±2 , durante um período de 3, 6, ou 9 dias

Para cada dia de análise todas as espigas de cada tempo/tratamento foram debulhadas em debulhador automático marca Mecamau Mod. D032, homogeneizadas, quarteadas e uma parte triturada em moinho marca IKA A11 basic, para posteriores análises do dia.

Tabela 4 – Número de amostras de milho verde para cada tratamento de acordo de acordo com o tempo a serem analisados.

Tratamento	Tempo (dias)			
	Dia 0	Dia 3	Dia 6	Dia 9
Controle (sem cobertura)	9 espigas	3 bandejas	3 bandejas	3 bandejas
Cobertura utilizando zeína extraída do milho BRS 1060 (convencional)	-	3 bandejas	3 bandejas	3 bandejas
Cobertura utilizando zeína extraída do milho BR 473(alto teor proteico)	-	3 bandejas	3 bandejas	3 bandejas

2.4- Determinações físico-químicas

Umidade

Para a análise de umidade foram pesadas 2g da amostra trituradas. Logo após foram colocadas em estufa a temperatura de secagem de 60°C com tempo de secagem de 72 horas. O cálculo de umidade foi realizado de acordo com o método 44-15, da AACC (2000), sendo:

$$\%Umidade = \frac{(cápsula + amostrafresca) - (cápsula + amostraseca)}{amostra\ seca} \times 100$$

Acidez total titulável

A acidez titulável foi determinada como o volume (mililitros) de NaOH 0,1mol/L requerido para titular 10g de amostra desintegrada em processador de alimentos (Moinho IKA A11basic) com 90mL de água, de acordo com Pregnotatto e Pregnotatto (1985). A acidez foi expressa em mL de NaOH 0,1mol/L por 100g da amostra.

pH

A análise de pH foi realizada conforme protocolo da A.O.A.C. (1995), em pHmetro digital (Marconi).

Determinação de perda de massa

A determinação da porcentagem de perda de massa foi calculada pela diferença entre a massa inicial das bandejas de milho doce e aquela obtida em cada dia avaliação.

$$PM = (mi - mf) / (mi) \times 100$$

Em que:

PM = perda de massa (%);

Mi = massa inicial da bandeja com as espigas;

MF = massa final da bandeja com as espigas

Teor de sólidos solúveis totais (SST)

O teor de sólidos solúveis das amostras foi avaliado utilizando-se refratômetro de bancada, marca Atago (modelo PAL-1). Para tanto, centrifugou-se 1mL do extrato triturado, em micro centrifuga por 10 minutos. A leitura foi feita do sobrenadante, obtido após a centrifugação.

Cor

A cor das amostras foi avaliada utilizando-se colorímetro Konica Minolta, modelo CR 400. Foram utilizadas 9 espigas por tratamento, realizando-se 3 leituras por espiga. A avaliação de cor foi efetuada pelo sistema L^* a^* e b^* , por refletância, no qual os valores de L^* (luminosidade ou brilho) variam de zero (preto) a 100 (branco), no eixo a ocorre a variação de $-a^*$ (verde) até $+a^*$ (vermelho) e no eixo b a variação de $-b^*$ (azul) até $+b^*$ (amarelo) (BIBLE; SINGHA, 1993).

O modelo de cor CIELAB funciona como um tradutor universal de línguas entre os dispositivos, permitindo controlar as cores que passam de um dispositivo para outro, correlacionando os valores em RGB ou CMYK com os valores em L^* a^* b^* . A Figura 13 representa o modelo de CIELAB.

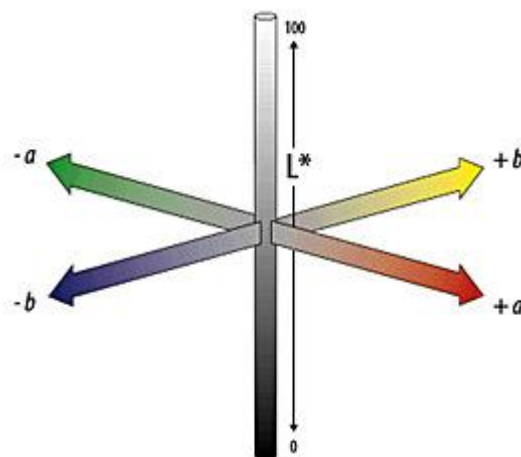


Figura 13: Representação tridimensional da cor CIELAB

2.5- Análise estatística

Para o estudo do armazenamento das espigas de milho dos diferentes híbridos

e seu efeito sobre o produto final, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x4, sendo 3 tratamentos (Controle, Cobertura BRS 1060 e Cobertura BR 473) e 4 períodos de avaliação (0, 3, 6 e 9 dias de armazenamento). Nas análises física e físico-químicas foram utilizadas 3 repetições para cada tratamento, exceto para cor do milho que foram utilizadas 27 repetições.

Os resultados obtidos das avaliações físicas e físico-químicas do milho verde foram primeiramente submetidos à análise exploratória para a verificação de pontos discrepantes, homogeneidade de variância, problema de escala e tamanho da amostra e posteriormente foram feitas a análise de variância pelo Teste F e comparação das médias pelo Teste de Tukey (5%) ajustado para comparações múltiplas, utilizando-se o sistema estatístico SAS (Statistical Analysis System, 1989).

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Aspecto geral das espigas de milho

O armazenamento de vegetais pode resultar em diversas alterações visuais como a perda de cor ou a ocorrência de danos biológicos. A rejeição do produto pode estar também correlacionada com a sensação de sabor e odor ao se detectar níveis de metabólitos associados com a deterioração (McMEEKIN; ROSS, 1996). Além destes aspectos, também constituem alterações frequentemente citadas na literatura a perda de água, com conseqüente murchamento (ALVES et al., 2004).

Considerando o aspecto visual dos híbridos armazenados, o que mais fica evidenciado é a perda de umidade. As espigas recém-colhidas apresentaram grãos túrgidos, entretanto, ao longo do período de armazenamento os híbridos mostraram variabilidade quanto à conservação da umidade, podendo ser encontradas espigas com grãos mais túrgidos e outros mais desidratados, dentro de cada tratamento e tempo. A perda de água resultou em depressões (dentes) no topo dos grãos, com aspecto de endurecimento naquelas espigas que foram armazenadas sem cobertura de zeína (Figuras 14, 15, 16 e 17)



Figura 14: Foto tirada antes do armazenamento das espigas sem cobertura



Figura 15: Foto tirada no 9º dia de armazenamento das espigas sem cobertura



Figura 16: Foto tirada no 9º dia de armazenamento das espigas com cobertura de zeína extraída do milho BR 473



Figura 17: Foto tirada no 9º dia de armazenamento das espigas com cobertura de zeína extraída do milho BRS 1060

Comparando-se as espigas com e sem tratamento aos 12 dias de armazenamento (Figura 18), pode-se observar que apenas as espigas com cobertura de zeína extraída pelo Novo Método (utilizando ácido ascórbico como agente redutor) conservou a cor e a turgidez dos grãos do milho.



Figura 18: Foto tirada no 12º dia de armazenamento das espigas com e sem cobertura de zeína extraída do milho, onde:

Amostra 1: sem tratamento

Amostra 2: cobertura a base de zeína comercial

Amostra 3: cobertura a base de zeína extraída com o uso de ácido ascórbico (10%)

Amostra 4: cobertura a base de zeína extraída com o uso de ácido ascórbico (20%)

3.2- Análises físico-químicas

As alterações da perda de massa, pH, umidade, acidez titulável e sólidos solúveis totais de cada tratamento durante o armazenamento sob condições de refrigeração são mostradas nas Tabelas 5, 6, 7, 8 e 9.

O nível máximo de perda de peso aceitável para produtos hortícolas varia em função da espécie e do nível de exigência do mercado consumidor. Para a maioria dos produtos hortícolas frescos, a perda de peso máxima observada, sem o aparecimento de murcha e enrugamento da superfície, oscila entre 5% e 10% (FINGER; VIEIRA, 1997). A perda máxima de peso permitida para o milho doce comercializado em bandeja é de 7% (KAYS, 1991).

Tabela 5 – Teor da perda de massa nas espigas de milho verde dos diferentes tratamentos em função do tempo de armazenamento.

Análises	Tempo	Tratamentos		
		Sem Cobertura	Cobertura BR473	Cobertura BRS 1060
Perda de massa (g)	Dia 0	-	-	-
	Dia 3	11,47 ^a	8,92 ^a	12,45 ^a
	Dia 6	15,14 ^a	15,98 ^a	18,86 ^a
	Dia 9	28,62 ^a	19,56 ^a	34,05 ^a

Os resultados são médias de triplicatas.

Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 6 – Teor de pH nas espigas de milho verde dos diferentes tratamentos em função do tempo de armazenamento

Análises	Tempo	Tratamentos		
		Sem Cobertura	Cobertura BR473	Cobertura BRS 1060
pH	Dia 0	6,87	-	-
	Dia 3	6,78 ^a	6,84 ^a	6,34 ^a
	Dia 6	6,44 ^a	6,52 ^a	6,45 ^a
	Dia 9	6,42 ^a	6,46 ^a	6,35 ^b

Os resultados são médias de triplicatas.

Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 7 – Teor de umidade nas espigas de milho verde dos diferentes tratamentos em função do tempo de armazenamento.

Análises	Tempo	Tratamentos		
		Sem Cobertura	Cobertura BR473	Cobertura BRS 1060
Umidade (%)	Dia 0	76,16	-	-
	Dia 3	74,02 ^b	78,22 ^a	78,33 ^a
	Dia 6	75,13 ^b	77,71 ^a	76,45 ^{ab}
	Dia 9	76,55 ^a	75,15 ^a	77,90 ^a

Os resultados são médias de triplicatas.

Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 8 – Teor de acidez titulável nas espigas de milho verde dos diferentes tratamentos em função do tempo de armazenamento.

Análises	Tempo	Tratamentos		
		Sem Cobertura	Cobertura BR473	Cobertura BRS 1060
Acidez titulável (mL de NaOH 0,1 mol/L por 100g)	Dia 0	60,93	-	-
	Dia 3 ^a	38,88 ^a	40,49 ^a	37,09 ^a
	Dia 6	36,47 ^a	39,71 ^a	36,51 ^a
	Dia 9	28,67 ^a	27,29 ^a	30,28 ^a

Os resultados são médias de triplicatas.

Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 9 – Teor de sólidos solúveis totais nas espigas de milho verde dos diferentes tratamentos em função do tempo de armazenamento.

Análises	Tempo	Tratamentos		
		Sem Cobertura	Cobertura BR473	Cobertura BRS 1060
Sólidos solúveis totais (°Brix)	Dia 0	15,4	-	-
	Dia 3 ^a	15,3 ^a	14,2 ^a	14,4 ^a
	Dia 6 ^a	14,3 ^a	13,7 ^a	15,0 ^a
	Dia 9 ^a	14,0 ^a	14,6 ^a	13,5 ^a

Os resultados são médias de triplicatas.

Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Segundo Chitarra & Chitarra (2005), o principal fator responsável pela perda de massa durante o armazenamento de frutas e hortaliças é a transpiração, que esta intimamente relacionada com a respiração do produto. Perdas na ordem de 3% a 6% são suficientes para causar um marcante declínio na qualidade.

Apesar de as espigas de milho armazenadas com zeína extraída do milho BR 473 ter tido a menor perda de massa (19,56g), não houve diferença estatística entre aquelas espigas armazenadas sem cobertura (28,62g) e daquelas armazenadas com a cobertura de zeína extraída do milho BRS 1060 (34,05g).

A umidade de um vegetal pode ser definida como a quantidade de água presente no mesmo em sua totalidade, sob diferentes formas (livre e ligada). A perda de água nos vegetais relaciona-se principalmente ao processo de transpiração, respiração e ao tempo de armazenamento e resulta em enrugamento, amolecimento dos tecidos e perda de brilho, tornando os frutos mais susceptíveis às deteriorações. Também pode ocasionar alterações na cor e sabor dos mesmos (KADER, 1992).

O milho verde colhido é altamente perecível devido principalmente ao seu elevado teor de umidade, o que torna seu período de comercialização bastante restrito. No caso específico do milho, há que se considerar que a umidade é um importante fator na manutenção do milho no seu estágio verde (CALBO; MORETTI, 2003).

No presente trabalho, a cobertura a base de zeína foi eficiente para a conservação da umidade dos grãos de milho, tendo os melhores resultados para o terceiro e sexto dia de armazenamento. Com relação as demais parâmetros avaliados, não houve diferença estatística com relação ao uso ou não da cobertura de zeína.

3.3- Cor

A Tabela 10 refere-se à determinação de cor das espigas de milho utilizando colorímetro.

Tabela 10 – Parâmetros de cor das espigas de milho aos 9 dias de armazenamento

Dia de Armazenamento	Parâmetros	Tratamentos		
		Sem Cobertura	Cobertura BR 473	Cobertura BRS 1060
Dia 9	L*	60,16 ^b	62,55 ^{ab}	66,30 ^a
	a*	2,42 ^a	2,34 ^a	2,02 ^a
	b*	40,97 ^a	42,66 ^a	42,36 ^a

Os resultados são médias de triplicatas.

Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observou-se que as espigas de milho envolvidas com cobertura de zeína, tanto pela BR 473 quanto pela BRS 1060, obtiveram uma maior luminosidade ou brilho (L^*) em relação àquelas espigas sem cobertura, diferindo estatisticamente a 5% de significância. Com relação aos parâmetros a^* e b^* , não houve diferença estatística, mas pode-se notar que as espigas envoltas pela cobertura de zeína apresentou uma coloração mais amarela. A coloração amarela predominante deve-se a presença de carotenoides na proteína, predominantemente β -caroteno, zeaxantina e luteína em maior quantidade.

4- CONCLUSÕES

Considerando-se o teste de armazenamento do milho utilizando cobertura ou não ficou evidenciado que o armazenamento utilizando a cobertura de zeína foi eficiente para manter a umidade dos grãos das espigas e aumentar a luminosidade e brilho. Esse aspecto já é positivo levando em consideração que a perda da umidade das espigas gera o murchamento dos grão e, conseqüentemente, perda na vida de prateleira dos mesmos, assim como a luminosidade melhora o aspecto visual das espigas.

Sendo assim, sugere-se mais estudos com relação à composição da cobertura de zeína para que possa haver melhorias em outros aspectos de conservação.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACC. **Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists**, 10 th ed. St. Paul, Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, 2008.

ALVES, S. M. de F.; SILVA, A.E. de; SERAPHIN, J.C.; VERA, R.; SOUZA, E.R.B. de; ROLIM, H.M.V.; XIMENES, P.A. Avaliação de cultivares de milho para o processamento de pamonha. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Brasília, v.34, n.1, p. 39-43, 2004.

BATISTA, J.A.; TANADA-PALMU, P.S.; GROSSO, C.R.F. Efeito da adição de ácidos graxos em filmes à base de pectina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 781-788, 2005.

BERTAN, L.C.; TANADA-PALMU, P.S.; SIANI, A.C.; GROSSO, C.R.F. Effect of fatty acids and “Brazilian elemi” on composite films base don gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 1, p. 73-82, 2005.

BIBLE, B.B.; SINGHA, S. Canopy position influences CIELAB coordinates of peache color. **HortScience**, Alexandria, v.28, n.10, p.992-993, 1993.

CALBO, A.G.; MORETTI, A.L. **Milho verde (*Zea mays* L.)**. Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/laborato/pos_colheita/milho_verde.htm>. Acesso em: 15 out. 2003.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**, 1.edição. Lavras: UFLA, 1990.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós colheita de frutos e hortaliças: fisiologia**

CIA, P.; BRON, I.U.; VALENTINI, S. R. T.; PIO, R.; CHAGAS, E. A. Atmosfera modificada e refrigeração para conservação pós-colheita da amora-preta.**Biosci. J.**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 11-16, 2007.

CORTEZ, L. A.; HONORIO, S. L.; MORETTI, C.L. **Resfriamento de frutas e hortaliças; Embrapa Hortaliças (Brasília, DF)**.- Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 428 p. 2002

DEL-VALLE, V.; MUÑOZ, P.H; GUARDA, A.; GALOTTO, M.J. Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia ficus indica*) and its application to extend strawberry (*Fragaria ananassa*) shelf-life. **Food Chemistry**, v.91, n.4, p. 751-756, 2005.

FAMÁ, L.; ROJASB, A.M.; GOYANESA, S.; GERSCHENSONB, L. **Mechanical properties of taioca-starch edible films containing sorbates**. **LWT**. V. 38, p.631-639, 2005.

FINGER, F. L.; VIEIRA, G. **Controle da perda pós colheita de água em produtos hortícolas**. Viçosa: UFV, 1997. 29p.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v. 29, n. 1-2, p. 10-17, 1995.

GUIA para elaboração do plano APPCC; geral. 2.ed. Brasília: SENAI/ DN, 2000. 301 p. (Série Qualidade e Segurança Alimentar).

GUILBERT, S.; BIQUET, B. Películas y envolturas comestíveis. In. BUREAU, G.; MULTON, J. L. **Embalaje de los alimentos de gran consume**. Zaragoza (España): Editora Acríbia S. A., cap.22. 331-371p. 1995.

KADER, A.A. **Postharvest technology of horticultural crops**. Davis: University of California, 1992. 296p.

KAYS, E. J. **Postharvest physiology of perishable plant products**. New York: AVI Book, 1991. 532p.

KESTER, J. J.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: a review. **Food Technol.**, v. 40, n. 4, p. 47-59, 1986.

KROCHTA, J. M.; MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technol.**, v. 51, n. 2, p. 61-74, 1997.

MALGARIM, M. B; CANTILLANO, R. F. F.; COUTINHO, E. F. Sistemas e condições de colheita e armazenamento na qualidade de morangos cv. Camarosa. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal - SP, v. 28, n. 2, p. 185-189, Agosto 2006.

MCMEEKIN, T.A.; ROSS, T. Shelf life prediction: status and future possibilities. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 65-83, 1996.

PALMU, P. S. T. **Preparação, propriedades e aplicação de biofilmes comestíveis à base de glúten de trigo**. Campinas, 2003, 244 p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, (UNICAMP).

PIZARRO, C.A.C. **Avaliação de morangos submetidos a resfriamento rápido e armazenamento em diferentes embalagens e temperaturas. 2009. 58p.** Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola). Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PREGNOLATTO, W.; PREGNOLATTO, N.P. (Coord.). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed.** São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. v.1, 533p.

SHIH, F. F. Edible films from rice protein concentrate and pullulan. **Cereal Chem.**, v. 73, n. 3, p. 406-409, 1996.

SOTERO, A. P. Plásticos biodegradáveis trazem melhoria ambiental. **Jornal de plásticos.** Unicamp, Agosto/2000.

VEIGA-SANTOS, P. **Elaboração, aditivação e caracterização de biofilmes à base de fécula de mandioca. 252 f.** Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

YU, L.; DEAN, K.; LI, L. Polymer blends and composites from renewable resources. **Progress in Polymer Science.** v. 31, n. 6, p.576-602, 2006.

5- CONCLUSÕES GERAIS

Podemos concluir que o método modificado de extração de zeína utilizando o ácido ascórbico como agente redutor em substituição ao agente redutor tóxico beta-mercaptotanol é uma boa opção para a utilização da zeína em filmes e coberturas comestíveis, uma vez que apresentou alguns resultados satisfatórios na conservação da espiga de milho verde.

Não foi encontrada diferença no perfil eletroforético de diferentes acessos de milho pertencente ao Banco Germoplasma, podendo então ser utilizado qualquer linhagem analisadas de milho na produção dos biofilmes, sem qualquer alteração.