



# Análise microscópica do amido extraído de milho (*Zea mays*) convencional e transgênico

## Microscopic analysis of the starch extracted from conventional and transgenic corn (*Zea mays*)

[RIALA6/1718](#)

Juliane dos Santos SOARES<sup>1\*</sup>, Márcia Bittar ATUI<sup>1</sup>, Maria Aparecida Moraes MARCIANO<sup>1</sup>, Irineu LORINI<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Núcleo de Morfologia e Microscopia, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP 01246-902. Tel: 11 3068 2934. E-mail: juliane.ds.soares@gmail.com

<sup>2</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Embrapa Soja), Londrina, PR, Brasil

Recebido: 04.10.2016 - Aceito para publicação: 01.02.2017

### RESUMO

Os programas de melhoramento genético têm desenvolvido uma grande variedade de sementes de milho, com características que conferem maior resistência às adversidades do plantio, e permitem a extensão do seu cultivo nas mais diversas condições climáticas. A análise microscópica de grãos é uma ferramenta de grande relevância na caracterização das matérias primas e modificações do amido. Levando-se em conta o fato do uso de transgênicos em alimentos ser ainda controverso, e principalmente para os consumidores, o considerável aumento de sua utilização como ingrediente em produtos alimentícios, o presente trabalho investigou a possibilidade de detectar, por meio de microscopia, a variação das características dos grãos de amido de milho transgênico em comparação com os grãos de amido de milho convencional. Os resultados indicaram diferenças entre os grãos de amido extraídos de milho convencional e naqueles extraídos de milho transgênico. O amido extraído de milho convencional, em sua maioria, caracterizou-se pela presença de grânulos de formato poliédrico, alguns ligeiramente abaulados, com hilo em formato estrelado. No amido extraído dos grãos de milho transgênico, o hilo apresentou formato linear, pontual ou ausente. Estas propriedades serão úteis para caracterizá-los nos trabalhos de pesquisa e de identificação em produtos alimentícios.

**Palavras-chave.** *Zea mays*, alimentos geneticamente modificados, amido, histologia.

### ABSTRACT

The genetic programs have developed the varieties of maize seed, with features that provide greater resistance to the planting adversity, thus to carry out the extension of their cultivation at varied weather conditions. Microscopic analysis of grain is a relevant tool for characterizing the raw materials and the starch modifications. Taking into account the fact of the use of genetically modified organisms (GMOs) in food being still controversial, especially for consumers, and also owing to their significant increased use as ingredients in food products, the present study investigated the possibility in detecting the characteristics variations of transgenic corn starch grains by microscopy, in comparison with the conventional corn starch grains. The results showed significant differences between the conventional starch grains-extracted maize and those derived from transgenic maize. Conventional corn-extracted starch was characterized mostly by the presence of polyhedral shaped beads, some of them slightly cambered, with Starry format hilum, while the extracted starch from genetically modified maize grain, the hilum showed a linear format, punctual or absent. These findings will be valuable for conducting studies and for performing food products characterization and identification.

**Keywords.** *Zea mays*, genetically modified food, starch, histology.

## INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das maiores fontes de alimento e matéria prima, sendo alimentação básica de várias civilizações ao longo do tempo<sup>1</sup>.

Há uma grande diversidade nas condições de cultivo do milho no Brasil, desde a agricultura tipicamente de subsistência, sem utilização de insumos modernos, até lavouras que utilizam o mais alto nível tecnológico e alcançam produtividades equivalentes às obtidas em países de agricultura mais avançada<sup>2,3</sup>.

Aproximadamente 70 % do milho cultivado no mundo é destinado a cadeia produtiva de suínos e aves, na produção de ração. No Brasil, o consumo neste tipo de atividade corresponde a, respectivamente, 70 e 80 % e, em ambos os casos, algum tipo de transformação industrial ou no campo pode ser necessária<sup>2,3</sup>.

Os maiores produtores mundiais de milho são os Estados Unidos, China e Brasil que, na safra 2014/15, produziram 361,1; 215,6; e 85,0 milhões de toneladas, respectivamente<sup>2,3</sup>. Grande parte da produção é utilizada para a extração do amido, para atender a demanda das indústrias<sup>4</sup>.

O grão de milho é uma cariopse que consiste de embrião, endosperma, pericarpo e pedúnculo, conforme **Figura 1**.

O pericarpo (camada externa) é derivado da parede do ovário e pode ser incolor, vermelho, marrom ou variegado. Os embriões do milho não armazenam reservas durante o desenvolvimento da semente, a não ser uma pequena quantidade de

lipídios no escutelo. Observa-se, entretanto, que as reservas de carboidratos são polimerizadas no endosperma na forma de amido e as reservas de proteínas, acumuladas nos corpos proteicos distribuídos em todo o endosperma<sup>5</sup>.

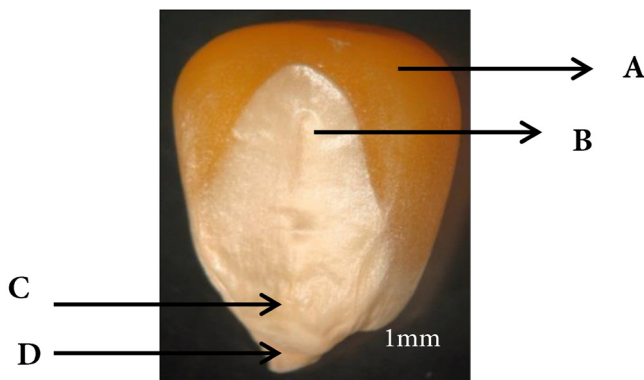
O endosperma é um tecido triploide, que se forma como resultado da fusão do núcleo do pólen com dois núcleos femininos<sup>6</sup>. Esse tecido é responsável por 98 % do amido, 80 % da proteína e 15 % dos lipídios presentes no grão<sup>7</sup>.

Através do processo de moagem úmida do milho, o principal produto obtido é o amido, aproximadamente 72-73 % do total dos grãos. Uma das propriedades do amido é a capacidade de formar uma pasta ou gel viscoso com a água por aquecimento, que o torna adequado para várias utilizações em indústrias alimentares e não-alimentares<sup>8</sup>. O amido de milho é amplamente utilizado na produção de alimentos, principalmente em biscoitos, pães, pós para pudins, fermento em pó, macarrão, melhoradores de farinhas, balas de goma, além de produtos farmacêuticos, dentre outras aplicações industriais<sup>2,3,9,10</sup>.

O amido é um homopolissacarídeo composto por cadeias de amilose (cadeia linear) e amilopectina (cadeia ramificada), cujo percentual de uma para outra varia de acordo com a fonte de amido. O milho possui 25 % a 28 % de amilose com o restante sendo amilopectina. O milho de alta amilose pode atingir até 80 %.

O tamanho e a forma dos grãos de amido permitem identificá-los microscopicamente, podendo ser utilizados corantes, como soluções de iodo, que coram o interior da cadeia de amilose, e formam um composto de coloração azul. Outros detalhes físicos que ajudam na identificação dos amidos são a aparência sob luz polarizada, a posição do hilo e a presença de estrias nos grânulos. As estrias devem-se às camadas que se depositam ao redor de um ponto interno denominado hilo, que pode ser central ou excêntrico. No caso do amido de milho, os grãos são poliédricos e arredondados, medindo geralmente de 10 a 15  $\mu\text{m}$ , com a cruz bem marcada, hilo central e estrelado e ausência de estria<sup>11,12</sup>.

As características morfológicas dos amidos de diferentes origens podem variar em função



**Figura 1.** Estrutura do grão de milho sob aumento de 50x. (A) Pericarpo; (B) Endosperma; (C) Embrião; (D) Pedúnculo

das linhagens e das diferentes práticas de cultivo. A variabilidade do tamanho e forma dos grânulos de amido é atribuída à origem biológica. A morfologia dos grânulos depende da bioquímica do cloroplasto ou amiloplasto, bem como da fisiologia da planta. A média de tamanho de cada grânulo de amido de milho varia de 1 a 7 µm para os pequenos grânulos e de 15 a 20 µm para os grânulos maiores<sup>10,13</sup>.

No Brasil, o crescimento da produtividade de milho decorre de modelo já descrito nos Estados Unidos pelo uso de sementes híbridas com maior potencial de rendimento (melhoramento genético), aumento do uso de fertilizantes e defensivos, melhoria no arranjo espacial de plantas (espaçamento e densidade), uso de máquinas agrícolas mais eficientes e adoção do sistema de plantio direto na palha. A adoção conjunta de cultivares melhorados, de insumos e de técnicas de cultivos adequados fez com que o rendimento das lavouras aumentasse progressivamente<sup>2,3</sup>.

A biologia molecular permitiu avanços na compreensão dos mecanismos genéticos e bioquímicos básicos também no setor agrícola, que permitiu o desenvolvimento de novas estratégias de melhoramento por meio da transformação genética. Sendo uma das maiores *commodities* na agricultura mundial e uma fonte importante de nutrientes para homens e animais, o milho tem sido alvo de muitos estudos de manipulação genética<sup>14</sup>, que visam desenvolver grande variedade de sementes de milho, com características que conferem maior resistência às adversidades do plantio, permitindo assim a extensão do seu cultivo nas mais diversas condições climáticas<sup>5</sup>.

As primeiras atividades com germoplasma de milho no Brasil datam de 1937, pela Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, em Piracicaba, SP. Em 1975, a EMBRAPA montou o banco ativo de germoplasma e, a partir daí, foram desenvolvidos diversos melhoramentos genéticos com o objetivo de aumentar a qualidade e quantidade das sementes e minimizar custos por meio de recursos e equipamentos de última geração<sup>15</sup>.

O Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA Milho e Sorgo desenvolve ação multidisciplinar,

com a utilização conjunta de técnicas de melhoramento genético e biologia molecular, para desenvolver novas linhagens de milho tropical com qualidade nutricional melhorada, introduzir genes endógenos com sequências alvo específica por meio da engenharia genética, influenciando na produção do amido<sup>5</sup>.

Os tipos de sementes de milho são identificados como híbridos ou variedades, sendo que os híbridos podem ser simples, triplos ou duplos. Os híbridos simples são resultantes do cruzamento de duas linhagens puras e indicados para sistemas de produção que utilizam alta tecnologia, pois possuem o maior potencial produtivo, são também os de maior valor comercial. O híbrido triplo é o cruzamento entre uma linha pura e um híbrido simples, sendo indicado para média a alta tecnologia, enquanto o híbrido duplo é o resultado do cruzamento entre dois híbridos simples, sendo indicado também para média tecnologia<sup>2,3</sup>.

As sementes das variedades melhoradas apresentam menor custo e são adequadas a regiões onde, devido às condições econômico-sociais e de baixa tecnologia, a utilização de milho híbrido torna-se inviável. São também importantes em sistemas de produção agroecológicos ou orgânicos, pois, embora não restrinjam o uso de híbridos, as variedades são preferidas por permitirem ao produtor produzir sua própria semente a um preço bem menor<sup>2,3</sup>.

Como o milho é uma matéria-prima amplamente utilizada devido às suas características nutricionais e sua aplicabilidade na culinária, o estudo e a caracterização dos seus grãos de amido por meio da análise microscópica, apresenta grande relevância, especialmente considerando que os grãos de amido extraídos de milho transgênico, têm sido cada vez mais utilizados como ingrediente em diversos tipos de produtos alimentícios. Desta maneira, para auxiliar na pesquisa e identificação do amido de milho transgênico presente em produtos alimentícios, foi realizado este estudo com o objetivo de verificar se existem variações nas características microscópicas do grão de amido de milho transgênico, em comparação com o grão de amido de milho convencional.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras utilizadas neste estudo são representativas, uma vez que estes eventos representam 90 % do milho híbrido cultivado no Brasil, abrangendo o milho colhido, comercializado e exportado.

Foram analisadas doze amostras de grãos de milho, sendo seis contendo eventos de transgenia e suas respectivas amostras convencionais. Estas amostras foram coletadas de produtores de sementes de milho da região Sul do Brasil, assim especificadas: A1) milho convencional; A2) milho transgênico estaqueado com dois eventos, lagarta e lagarta+herbicida; B1) milho convencional; B2) milho transgênico estaqueado com um evento, lagarta+herbicida; C1) milho convencional; C2) milho transgênico estaqueado com um evento, lagarta+herbicida; D1) milho convencional; D2) milho transgênico estaqueado com um evento, lagarta+herbicida; E1) milho convencional; E2) milho transgênico estaqueado com dois eventos, lagarta e lagarta+herbicida; F1) milho convencional; F2) milho transgênico estaqueado com um evento, lagarta+herbicida. A **Figura 2a** apresenta as amostras de milho; a coloração avermelhada dos grãos é devida ao corante usado para identificar o tratamento com fungicida, sendo retirado facilmente na lavagem do grão, como pode ser observado na **Figura 2a**.

As amostras foram processadas e analisadas no Núcleo de Morfologia e Microscopia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, no período de julho de 2014 a junho de 2015.

Para a obtenção do amido, foi utilizada a técnica desenvolvida no Núcleo de Morfologia e Microscopia do Instituto Adolfo Lutz, descrita a seguir.

Os grãos de milho convencional e transgênico foram previamente amolecidos em água e triturados em gral de porcelana com o auxílio de um pistilo, conforme **Figura 2b**.

Em seguida, o material triturado foi envolto em gaze, formando uma pequena bolsa, que foi suspensa e submersa em água contida em um copo graduado de 1.000 mL, durante 24 horas. A bolsa foi ocasionalmente comprimida manualmente, auxiliando na liberação do amido, como observado

na **Figura 2c**.

Após a sedimentação do amido, o sobrenadante foi descartado e o sedimento obtido filtrado a vácuo e recolhido em papel de filtro, de acordo com a **Figura 2d**.

O amido obtido no papel de filtro foi transferido para uma bandeja e seco em temperatura ambiente antes de seu armazenamento em frasco de vidro com tampa esmerilhada.



**Figura 2.** a. Amostras de milho convencional com o respectivo transgênico; b. Grãos de milho triturados em gral de porcelana com o auxílio de um pistilo; c. Material triturado envolto em gaze e suspenso em copo graduado com água; d. Sedimento obtido retido em papel de filtro

A metodologia utilizada para a análise histológica do amido de milho foi extraída do livro *Métodos de Análise Microscópica de Alimentos: Isolamento de Elementos Histológicos*<sup>16</sup>.

Os ensaios foram realizados por três analistas que elaboraram o registro descritivo e fotográfico dos grãos de amido presentes nas amostras analisadas, para demonstrar como estes podem ser identificados microscopicamente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio para a pesquisa e identificação histológica consiste no reconhecimento de elementos histológicos e/ou amidos de cada vegetal. Assim, o profissional deve ser capaz de diferenciar tais atributos em cada tipo de produto, revelando os ingredientes que fazem parte de sua formulação. Quando o produto



alimentício é composto de vários ingredientes vegetais, o microscopista deve ter conhecimento dos elementos histológicos característicos de cada um deles, pois muitas vezes, em uma mistura, não é possível identificar todos os elementos do vegetal, uma vez que o mesmo passou por etapas de processamento e também pode se apresentar em pequenas quantidades, o que dificulta a sua visualização.

Segundo Menezes<sup>17</sup>, os grãos de amido de milho são sensivelmente poliédricos, quando procedentes da parte externa da semente, e ligeiramente abaulados. Os da zona central branca são quase esféricos e bem menores, apresentam hilo pontuado, emitindo prolongamentos curtos em forma de estrela, e estrias raramente visíveis. Ainda segundo este autor, os grãos de amido de milho não se apresentam agrupados em grãos compostos, medem geralmente 30 µm, e à luz polarizada apresentam cruz bem visível, tanto no campo escuro, como no claro. Singh et al<sup>10</sup> e Li et al<sup>13</sup> observaram a presença de pequenos furos e estrias equatoriais ou sulcos em grânulos de amido maiores.

Desta forma, o amido de milho convencional, já estudado e caracterizado, pode ser facilmente identificado em produtos que o contém. Porém, o

amido de milho transgênico, por ser um produto relativamente novo, não havia sido estudado e descrito morfológicamente. Neste estudo foram verificadas as diferenças e semelhanças entre os dois tipos de amido, uma vez que o amido extraído de milho transgênico vem sendo amplamente utilizado. Vale ressaltar que as amostras analisadas neste trabalho são representativas, pois correspondem aos seis eventos mais utilizados na transgenia do milho, representando 90 % do milho plantado no Brasil.

Os resultados das análises histológicas das amostras de milho convencional e transgênico estão apresentados na **Tabela**.

Pelos resultados obtidos, pode-se observar que nas amostras de milho convencional (A1, B1, C1, D1, E1 e F1), os grãos de amido extraídos apresentaram-se em sua maioria de forma poliédrica e alguns ligeiramente abaulados, com o hilo estrelado, concordando com a descrição de Menezes<sup>17</sup>. Nas suas variedades transgênicas (A2, B2, C2, D2, E2 e F2), não houve diferenciação evidente no formato dos grãos. No entanto, o hilo que nas amostras convencionais apresentava-se estrelado, nas amostras transgênicas apresentou-se na maioria das vezes linear, pontual ou sem hilo (**Tabela e Figura 3**).

**Tabela.** Caracterização morfológica dos grãos de amido extraídos de milho convencional e transgênico

Amostra	Forma dos grãos	Forma do hilo nos grãos	Polarização
A1 (convencional)	Maioria poliédricos e alguns abaulados	Maioria estrelado	Presente
A2 (transgênico)	Alguns poliédricos e alguns abaulados	Maioria linear ou sem hilo	Presente
B1 (convencional)	Maioria poliédricos e alguns abaulados	Estrelado	Presente
B2 (transgênico)	Alguns poliédricos e alguns abaulados	Estrelado nos poliédricos e sem hilo nos abaulados	Presente
C1 (convencional)	Maioria poliédricos e alguns abaulados	Estrelado	Presente
C2 (transgênico)	Maioria poliédricos e alguns abaulados	Maioria linear ou pontuado	Presente
D1 (convencional)	Maioria poliédricos e alguns abaulados	Estrelado	Presente
D2 (transgênico)	Maioria poliédricos e alguns abaulados	Maioria linear	Presente
E1 (convencional)	Maioria poliédricos e alguns abaulados	Estrelado	Presente
E2 (transgênico)	Maioria poliédricos e alguns abaulados	Maioria linear, pontuado ou sem hilo	Presente
F1 (convencional)	Maioria poliédricos e alguns abaulados	Maioria estrelado e hilo linear nos abaulados	Presente
F2 (transgênico)	Maioria poliédricos e alguns abaulados	Maioria linear ou pontuado	Presente

O formato do hilo presente nos grânulos de amido é uma característica para a diferenciação entre o amido de milho transgênico e convencional. Em relação ao formato dos grânulos, este não é um parâmetro a ser utilizado, pois não houve diferenciação evidente entre os grãos de amido convencional e transgênico.

Em todas as amostras de milho, tanto convencional como transgênico, foi possível observar a cruz de polarização quando vistos sob luz polarizada, conforme visto na **Figura 4 (a e b)**.

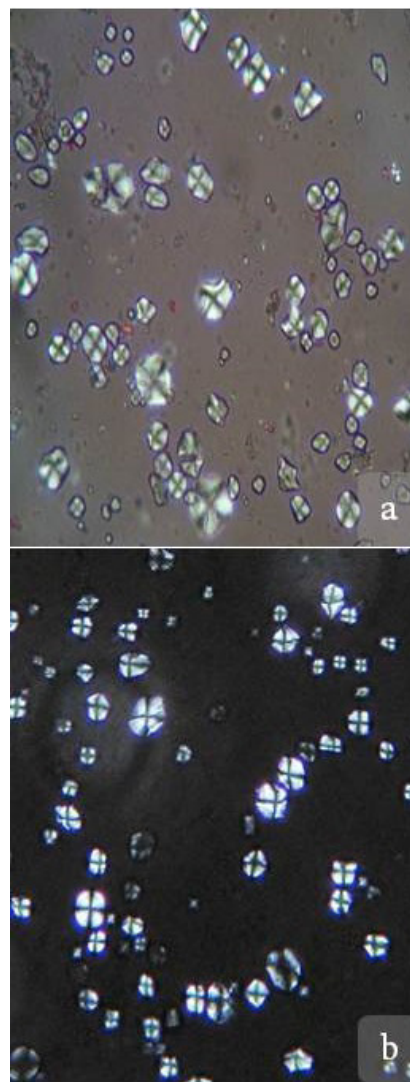
### CONCLUSÃO

O presente estudo vem a contribuir para o ensaio microscópico, ao demonstrar as diferenças morfológicas entre os grãos de amido extraídos de milho convencional e os grãos de amido extraídos de milho transgênico e auxiliar na análise de controle de qualidade de alimentos.

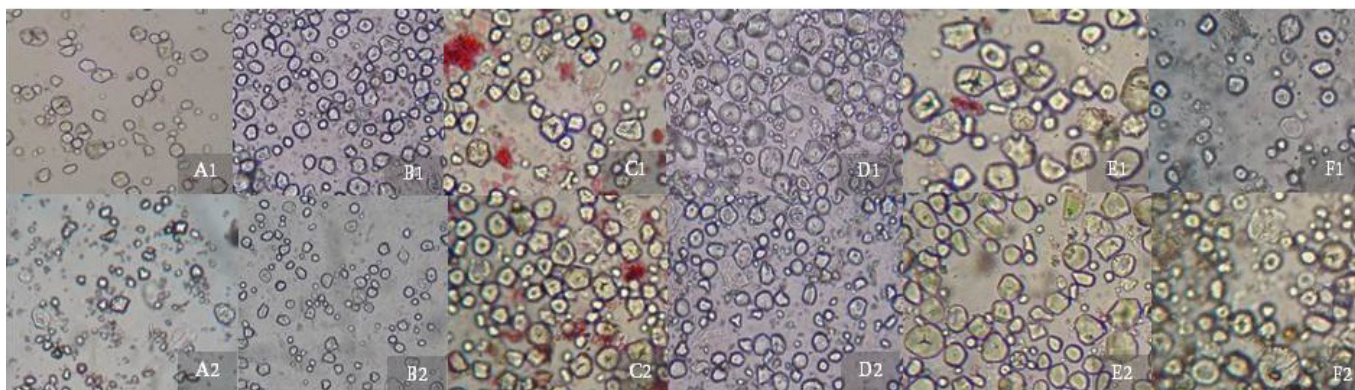
O formato do hilo presente nos grãos de amido demonstrou ser uma característica para a diferenciação entre o amido de milho transgênico e o convencional.

A luz polarizada é um recurso que auxilia na pesquisa e identificação de grãos de amido de milho, tanto convencional como transgênico.

Os resultados obtidos nesse estudo servirão como referência para a pesquisa e identificação microscópica dos grãos de amido de milho geneticamente modificado em produtos alimentícios, para o controle da qualidade e identidade dos mesmos.



**Figura 4.** a. Grânulos de amido de milho convencional sob aumento de 40x, e b. Grânulos de amido de milho transgênico sob aumento de 40x, ambos evidenciando a cruz de polarização quando vistos sob luz polarizada



**Figura 3.** A1, B1, C1, D1, E1 e F1. Grãos de amido de milho convencional, sob aumento de 40x em microscopia óptica, em sua maioria de forma poliédrica, com hilo estrelado; A2, B2, C2, D2, E2 e F2. Grãos de amido de milho transgênico, em sua maioria de forma poliédrica, com hilo linear ou pontuado, ou com ausência de hilo sob aumento de 40x em microscopia óptica.

## AGRADECIMENTOS

A Fernando Augusto Henning, Pesquisador da Embrapa Soja, pela coleta e envio das amostras de milho convencional e transgênico usadas neste trabalho.

A Antônio Roberto Ferreira, do Centro de Alimentos, pelas fotomicrografias contidas neste artigo.

## REFERÊNCIAS

1. Associação Brasileira das Indústrias de Milho – ABIMILHO. O cereal que enriquece a alimentação humana. [acesso 2015 Out 7]. Disponível em: [http://www.abimilho.com.br/milho/cereal].
2. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Milho e Sorgo. Cultivo do milho. [acesso 2015 Out 21]. Disponível em: [http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho\_5\_ed/index.htm].
3. Federação das Indústrias do Estado de São Paulo - FIESP. Informativo DEAGRO, SAFRA mundial de milho 2015/16, 9º Levantamento do USDA. [acesso 2016 Jan 15]. Disponível em: [http://az545403.vo.msecnd.net/uploads/2016/01/boletim\_milho\_janeiro2016.pdf].
4. Peter M, Paraginski RT, Santos RF, Rockenbach BA, Villanova FA, Oliveira M. Propriedades tecnológicas e de cristalinidade de amido extraído de grãos de milho armazenados em diferentes temperaturas. VI Conferência Brasileira de Pós-Colheita; outubro de 2014; Maringá: Anais. p. 692-9.
5. Carneiro AA, Carneiro NP, Carvalho CHS, Vasconcelos MJV, Paiva E, Lopes MA. Milho transgênico. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*. 2000;3(15):42-6. [acesso 2015 Jan 15]. Disponível em: [https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/67512/1/Milho-transgenico.pdf].
6. Wolf MJ, Buzan CL, Macmasters MM, Rist CE. Structure of the mature corn kernel. 1. Gross anatomy and structural relationships. *Cereal Chem*. 1952;29(5):321-33.
7. Glover DV, Mertz ET. *In*: Olson RA, Frey KJ. *Corn. Nutritional quality of cereal grains: genetic and agronomic improvement*. Madison: ASA; 1987. p. 183-336.
8. Nguyen QD, Jensen CTB, Kristensen PG. Experimental and modelling studies of the flow properties of maize and waxy maize starch pastes. *Chem Eng J*. 1998;70:165-71.
9. Sandhu KS, Singh N, Lim ST. A comparison of native and acid thinned normal and waxy corn starches: Physicochemical, thermal, morphological and pasting properties. *LWT-Food Sci Technol*. 2007;40(9):1527-36.
10. Singh N, Singh J, Kaur L, Sodhi NS, Gill BS. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chem*. 2003;81(2):219-31.
11. Flint O. *Microscopía de los alimentos: manual de métodos prácticos utilizando la microscopía óptica*. Zaragoza: Acribia; 1996.
12. Sahai D, Jackson DS. Structural and chemical properties of native corn starch granules. *Starch/Starke*. 1996;48(7/8):249-55. [DOI: http://dx.doi.org/10.1002/star.19960480703].
13. Li JH, Vasanthan T, Rossnagel B, Hoover R. Starch from hull-less barley: I. Granule morphology, composition and amylopectin structure. *Food Chem*. 2001;74(4):395-405.
14. Barcelo P, Lazzeri PA. Transformation of cereals by microprojectile bombardment of immature inflorescence and scutellum tissues. *In*: Jones H. *Plant gene transfer and expression protocols*. New York: Springer; 1995. p.113-23.
15. Netto DAM, Andrade RV. Recursos fitogenéticos de milho, sorgo e milheto. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo; 2000. [acesso 2015 Jan 15]. Disponível em: [https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/30832/1/doc-2.pdf].
16. Rodrigues RMM, Atui MB, Correia M. Métodos de análise microscópica de alimentos: Isolamento de Elementos Histológicos. Vol. I. São Paulo: Letras & Letras; 1999.
17. Menezes Junior JBF. Investigação sobre o exame microscópico de algumas substâncias alimentícias. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1949;9(1/2):28-32.