

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia
Agroindustrial



Tese

**Respostas bioquímico-fisiológicas e agronômicas em
alface e milho em função da aplicação de 'água de xisto'**

Rafael da Silva Messias

Pelotas, 2011



Respostas bioquímico-fisiológicas e agronômicas em alface e milho em função da aplicação de
'água de xisto'

Rafael da Silva Messias **2011**

RAFAEL DA SILVA MESSIAS

Respostas bioquímico-fisiológicas e agronômicas em alface e milho em função da aplicação de 'água de xisto'

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de conhecimento: Ciência e Tecnologia Agroindustrial).

Comitê de orientação:

Prof. Dr. César Valmor Rombaldi
Pesq. Dr. Clenio Nailto Pillon
Prof. Dr. Manoel Artigas Schirmer
Pesq. Dr. Sérgio Delmar dos Anjos e Silva

Pelotas, 2011.

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

M585r Messias, Rafael da Silva

Respostas bioquímico-fisiológicas e agronômicas em
alface e milho em função da aplicação de 'água de xisto' /
Rafael da Silva Messias; orientador Cesar Valmor Rombaldi;
co-orientadores Clenio Nailto Pillon, Manoel Artigas Schirmer
e Sérgio Delmar dos Anjos e Silva . - Pelotas, 2011.-156f. -
Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência
e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu
Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.

1.Milho 2.Alface 3.Aplicação foliar 4.Água de xisto
5.Nutrição de plantas 6.Metabolismo primário 7.Metabolismo
secundário I.Rombaldi, Cesar Valmor(orientador) II .Título.

CDD 631.811

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi. Universidade Federal de Pelotas. Orientador

Prof. Dr. Éder Antônio Gigliotti. Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa em Agroenergia.

Prof. Dr. João Peterson Pereira Gardin. EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina.

Prof. Dr. Leonardo Nora. Universidade Federal de Pelotas.

Pesq. Dr. Carlos Augusto Posser Silveira. Embrapa Clima Temperado.

AGRADECIMENTOS

Recapitulando... Ao Pillon pela oportunidade e confiança depositados, pela amizade, meu sincero obrigado... Ao Laudemar pelo uso da área experimental e o grande coração, meu respeitoso obrigado... Ao Sérgio pelo apoio profissional e grande amizade, meu recíproco obrigado... Igualmente ao Manoel pelo apoio e amizade que sei durará além desta etapa, meu espiritual obrigado... Ao departamento pela compreensão a minha atípica situação, em especial ao Cesar pela orientação pontual, mas vital, meu compreensivo obrigado... As instituições envolvidas, FAPEG, Petrobras e Embrapa, na figura das pessoas relacionadas, pelo apoio a viabilização dos trabalhos, meu incondicional obrigado... As minhas mães pelo apoio emocional, meu incondicional obrigado... A todos os colegas que ajudaram a construir este trabalho, em especial, Guto, Bagé, Peterson, Mariana, Anderson, Juliana, Ivan., bolsistas que ajudaram a viabilizá-lo, em especial, Isadora, Vanessa, Tiane, Liziane, Esmael., e a tantos outros que colaboraram de diferentes formas, meu reconhecido mais do que obrigado... A minha L., sem a qual o tecido da minha realidade desmoronaria, a totalidade do meu ser... A este mundo maravilhoso, este tempo inacreditável, minha gratidão!

“O saber e a compreensão são duas coisas totalmente distintas. Só a compreensão pode levar ao ser. O saber, por si só, tem presença passageira; um novo saber expulsa o antigo e, no fim de contas, é apenas verter o nada dentro do vazio.”

G. I. Gurdjieff

RESUMO

MESSIAS, Rafael da Silva. **Respostas bioquímico-fisiológicas e agronômicas em alface e milho em função da aplicação de 'água de xisto'**. 2011. 156f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

Historicamente, os objetivos dos esforços agronômicos tem se focado na produtividade, através do uso de fertilizantes que, devido aos processos de produção, tem se tornado cada vez mais livres de micronutrientes e elementos-traço, limitando a demanda para as plantas, causando o empobrecimento dos solos, e conseqüentemente, limitando a qualidade das culturas. Assim, a busca por fertilizantes foliares complementares, capazes de biofortificar culturas e lidar com a deficiência de micronutrientes em plantas, tem sido objeto de vários estudos. Neste contexto, a água extraída do folhelho pirobetuminoso (água de xisto), durante o processo de pirólise para obtenção de óleo combustível e outros produtos, representa uma alternativa segura do ponto de vista ambiental. Neste estudo, a água de xisto foi caracterizada físico-quimicamente e avaliou-se a segurança e potencial de sua utilização na agricultura, com ou sem enriquecimento com micronutrientes. Os resultados mostraram uma grande variedade de compostos orgânicos, nutrientes minerais e elementos-traço neste subproduto, representando uma matriz complexa que poderia ser de interesse para a nutrição e a indução do metabolismo primário e secundário das plantas. A aplicação foliar de diferentes doses de água de xisto em alface mostrou ausência de contaminantes tóxicos, indicando a sua segurança para uso na produção de alimentos. Além disso, o aumento na produtividade e em determinados nutrientes em alface, assim como a melhoria do crescimento de plantas de milho e o incremento na produtividade e qualidade de grãos, incluindo metabólitos primários e secundários, também foram observados devido à aplicação foliar de água de xisto. O enriquecimento com micronutrientes também mostrou incremento na produtividade, teor de aminoácidos, bem como no acúmulo de alguns minerais em grãos de milho. No entanto, a suplementação com micronutrientes não aumentou

o teor de carotenóides, sugerindo que a água de xisto poderia ser utilizada na agricultura, sem necessidade de enriquecimento, o que representa uma alternativa adequada para fornecer nutrientes e biofortificar culturas.

Palavras-chave: milho, alface, aplicação foliar, água de xisto, nutrição de plantas, metabolismo primário, metabolismo secundário.

ABSTRACT

MESSIAS, Rafael da Silva. **Biochemical-physiological and agronomic responses in lettuce and maize according to the application of 'shale water'**. 2011. 156f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

Historically, the aim of agronomic efforts has been focused on yield, using fertilizers that, due to the production processes, have become increasingly free of trace elements and micronutrients, limiting the demand for plants, causing soil depletion, and consequently, limiting the quality of crops. Thus, the search for foliar supplementary fertilizers, able to biofortify crops and to deal with plant micronutrient deficiency, has been the subject of several studies. In this context, the water extracted from shale rock (shale water) throughout the pyrolysis process to obtain fuel oil and other products represent an environment safety alternative. In this study, shale water was characterized physical-chemically and evaluated the security and potential of its use in agriculture delivered with or without micronutrient enrichment. The results showed a great variety of organic compounds, mineral nutrients and trace elements in this by-product, which represent a complex matrix that could be of interest for plant nutrition and induction of primary and secondary metabolisms. The foliar application of different doses of shale water in lettuce showed an absence of toxic contaminants, indicating its security to use in food production. Furthermore, the increase on yield and in certain nutrients in lettuce as well as the improvement of maize plants growth and grains yield and quality, including primary and secondary metabolites, were also observed by the foliar application of shale water. The enrichment with micronutrients also shows improvements on yield, amino acids content as well as of some minerals accumulation in maize grains. However, micronutrient supplementation did not increase carotenoids content, suggesting that shale water could be used in agriculture without the necessity of enrichment, representing an appropriate alternative to provide nutrients and biofortify crops.

Keywords: maize, lettuce, foliar application, shale water, plant nutrition, primary metabolism, secondary metabolism.

Lista de Figuras

Figura 1. Anatomia do grão de milho e intervalo percentual das principais frações.....17

Figura 2. Rota metabólica dos carotenóides e algumas das principais enzimas envolvidas, incluindo fitoeno desaturase (pds), ζ -caroteno desaturase (zds), licopeno ϵ -ciclase (lyc ϵ), licopeno β -ciclase (lyc β), ϵ -caroteno hidroxilase (CYP97C) e β -caroteno hidroxilases (hyd). ABA: síntese de ácido abscísico.....35

Figura 3. Esquematização da biossíntese dos principais compostos fenólicos encontrados no milho. As lignanas apresentadas exemplificam as duas majoritárias encontradas em cereais. As setas pontilhadas indicam a supressão de etapas dos processos de biossíntese.....43

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição química proximal das principais frações de grãos de milho amarelo integral.....18

Tabela 2. Composição química proximal, de vitaminas, minerais e aminoácidos de grãos de milho amarelo comum.....18

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
Estrutura anatômica e composição química geral de grãos de milho	17
Macronutrientes e micronutrientes em grãos de milho	19
Carboidratos e fibras	19
Proteínas e aminoácidos.....	22
Minerais.....	26
Metabólitos funcionais em grãos de milho	32
Carotenóides.....	32
Vitaminas E e C	39
Compostos fenólicos	41
Perspectivas	49
3. HIPÓTESE	52
4. OBJETIVO	52
4.1. Objetivos específicos.....	52
5. ARTIGO 1 – “Physical-chemical characterisation of water from the pyrobituminous shale pyrolysis process and evaluation of its potential use in agriculture”	53
6. ARTIGO 2 – “Isolation of high quality RNA from maize grain (<i>Zea mays</i> L.)”.....	79
7. ARTIGO 3 – “Foliar application of shale water improves yield and quality of maize (<i>Zea mays</i> L.)”	93
8. CONCLUSÕES	125
9. REFERÊNCIAS.....	126
10. ANEXOS	153

1. INTRODUÇÃO GERAL

O estudo desenvolvido nesta tese foi intitulado “Respostas bioquímico-fisiológicas e agronômicas em alface e milho em função da aplicação de ‘água de xisto’” e está inserido no contexto do projeto Xisto Agrícola que teve seu início em 2005 por meio da cooperação entre Embrapa Clima Temperado, FAPEG e Petrobras, visando avaliar a segurança e potencial de uso de subprodutos da mineração do folhelho pirobetuminoso como insumos na agricultura.

O xisto (folhelho pitobetuminoso) é uma rocha de origem sedimentar formada há 250 milhões de anos pela consolidação e deposição de sedimentos, especialmente algas e animais marinhos. Este folhelho pirobetuminoso ocorre desde o Planalto Central Brasileiro até o Uruguai, em faixas estreitas, chegando a aflorar em algumas regiões, como em São Mateus do Sul.

A carência de novos insumos agrícolas, para uso em sistemas de produção de base agroecológica, especialmente fertilizantes, a elevada disponibilidade de produtos do processamento do xisto e a sua composição química, rica em macro, micronutrientes, elementos-traço e compostos orgânicos, pressupõem um potencial uso agronômico destes subprodutos como matéria-prima na formulação de fertilizantes sólidos, líquidos e fitoestimuladores. Subprodutos sólidos, como o calcário de xisto, rico em cálcio e magnésio, o xisto retornado e os finos de xisto, com elevadas concentrações de carbono orgânico, nitrogênio, e enxofre, além de micronutrientes, são de interesse agronômico.

O processamento por pirólise de cerca de 7.800 toneladas de xisto ao dia para obtenção de óleo e gás combustível, GLP, nafta e enxofre inclui ainda a geração de até 300 m³ dia⁻¹ de um subproduto líquido (água de xisto) extraído da rocha pela tecnologia de retortagem, utilizando gás a altas temperaturas, desenvolvida pela Petrobras (Petrosix[®]), o qual apresenta ampla gama de compostos orgânicos dissolvidos e suspensos (emulsificados), além de macro, micronutrientes e elementos traço provenientes da fossilização de algas durante o período Permiano, co posição esta que tem mostrado potencial devido a importância destas substâncias na nutrição de plantas. Este co-produto teve seu licenciamento aprovado pelos órgãos ambientais competentes em maio de 2008, sendo posteriormente registrado no ministério da agricultura, pecuária e

abastecimento (MAPA), primeiramente como matéria-prima para formulação de fertilizantes foliares.

É parte integrante desta tese, uma revisão bibliográfica, abordando as diferentes estratégias de biofortificação na cultura do milho, foco deste trabalho, incluindo aspectos de sua anatomia, fisiologia e composição química, nutricional e funcional, bem como o estado da arte relativo aos conhecimentos e aplicações das técnicas de fertilização, melhoramento convencional, transgenia e mutagênese, com foco especial na biofortificação de micronutrientes e compostos fitoquímicos de metabolismo secundário. A partir desta ênfase, esta revisão foi reestruturada visando sua publicação em periódico especializado sob o título “Biofortification of micronutrients and functional compounds in maize grains”.

Os resultados experimentais obtidos até o momento foram apresentados em três artigos. O artigo intitulado “Physical-chemical characterisation of water from de pyrobituminous shale pyrolysis process and evaluation of its potential use in agriculture”, apresenta a caracterização físico-química da água de xisto, através da sistematização de dados obtidos de diferentes períodos de amostragem, bem como a avaliação do seu potencial e segurança como fertilizante foliar na cultura da alface. Os resultados mostram a segurança tanto ambiental quanto relativa aos alimentos gerados, tendo ainda induzido um maior crescimento foliar das alfaces tratadas nas doses de 6 e 18 L ha⁻¹, bem como incremento no acúmulo de nutrientes minerais correlacionado com a maior produção de matéria seca nestas mesmas doses, sugerindo seu potencial uso na nutrição de plantas. O segundo artigo constante nesta tese é intitulado “Isolation of high quality RNA from maize grain (*Zea mays* L.)” apresenta as adaptações e otimizações metodológicas necessárias ao processo de isolamento de RNA de grãos de milho devido à dificuldade relativa à complexa matriz presente nestes grãos, onde pode-se alcançar excelente qualidade e concentração do RNA extraído através da adaptação de método baseado no uso de CTAB, o qual apesar de mais laborioso apresenta baixos custos em relação aos kits e extratores comerciais disponíveis no mercado para este fim. Os resultados obtidos possibilitaram a avaliação da expressão de genes da via metabólica de carotenóides com alto grau de precisão. O terceiro artigo, intitulado “Foliar application os ‘shale water’ improves yield and quality of maize (*Zea mays* L.)” visou avaliar o efeito da aplicação foliar da água

de xisto, com ou sem enriquecimento com micronutrientes, no crescimento de plantas de milho e na produtividade e qualidade de grãos de milho. Os resultados deste estudo mostraram que a aplicação foliar de água de xisto, ao longo do ciclo da cultura do milho, influenciou o acúmulo de minerais e metabólitos primários, o que resultou em aumento do crescimento vegetativo, da produtividade e de teores de metabólitos secundários, como compostos fenólicos totais e carotenóides.

No transcorrer do doutoramento foram ainda realizados outros ensaios com a cultura do milho onde se testou e otimizou uma formulação de fertilizante foliar à base de água de xisto e enriquecida com sais de micronutrientes a qual foi requisitado pedido de propriedade intelectual, estando este em processo de redação final em escritório especializado e, portanto, não é constante neste documento. Além disso, diversos outros estudos realizados com a cultura da alface (os quais não são parte integrante desta tese) possibilitaram uma maior compreensão relativa à funcionalidade e mecanismos de ação da água de xisto, acarretando em resultados importantes para a definição das estratégias utilizadas nos experimentos integrantes desta tese. Cabe ainda salientar que o âmbito da proposta de estudo exigiu cuidados experimentais adicionais, bem como uma maior otimização das metodologias analíticas e procedimentos de amostragem devido a natureza dos tratamentos, de forma a possibilitar a confiabilidade e significância dos dados gerados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

BIOFORTIFICAÇÃO EM MILHO

Os três cereais mais cultivados (milho, trigo e arroz) provêem mais da metade da necessidade calórica animal e humana. Milho e trigo são também os grãos mais comumente consumidos por animais (GODWIN et al., 2009). O milho sozinho é responsável por fornecer cerca de 15% das proteínas e 20% das calorias na dieta humana (<http://faostat.fao.org/>), proveniente de uma área cultivada de 159,5 milhões de hectares em 2009 (FAOSTAT, 2011). O Brasil, como terceiro maior produtor mundial de milho, foi responsável por uma produção de 56 milhões de toneladas de grãos na safra 2009/2010 (CONAB, 2011). Sua importância é evidenciada pelos seus múltiplos aproveitamentos, sendo consumido em uma grande variedade de formas, desde o milho em espiga ou enlatado, até o creme de milho, o fubá (farinha de milho) e a polenta, e servindo de insumo para produção de pelo menos uma centena de produtos, além do uso de seus derivados em aplicações que vão da indústria petrolífera e têxtil à farmacêutica.

Os cereais, em geral, possuem uma matriz rica em compostos orgânicos e minerais com potencial benéfico à saúde, atuando diretamente como antioxidantes (vitamina E, carotenóides e fenólicos), como cofatores de enzimas antioxidantes (selênio, manganês e cobre) ou ainda como antioxidantes indiretos (betaína, colina e folatos). Além disso, se consumidos integrais os cereais são uma boa fonte de ácido fítico, lignina, aminoácidos sulfurados, minerais (como ferro e zinco), e fibras, moléculas que podem atuar na melhora da capacidade antioxidante (FARDET et al., 2008).

Estudos epidemiológicos têm mostrado que o consumo de grãos integrais e de produtos baseados nestes grãos resultam em prevenção à ocorrência de doenças cardiovasculares (LIU et al., 1999; ANDERSON et al., 2000;), alguns tipos de câncer (JACOBS et al., 1995, 1998; KIM et al., 2001), diabetes Tipo 2 (LIU et al., 2000) e obesidade (MISRA et al., 2009). Apesar disto, a atenção dada ao consumo de grãos tem sido pequena quando comparada a de outros vegetais,

mesmo que os grãos e seus produtos originados estejam na base das pirâmides nutricionais de forma a enfatizar sua importância na alimentação. A maioria dos trabalhos publicados cita frutas e hortaliças como as fontes principais de compostos fitoquímicos (HALEEM et al, 2008; SOMMERBURGB et al, 1998). Porém, os grãos contêm compostos fitoquímicos que, devido a sua natureza e/ou forma em que se encontram na matri destes grãos, podem complementar aqueles encontrados em frutas e hortaliças (LIU, 2007). Enquanto as frutas e hortaliças contêm a grande maioria de seus compostos fitoquímicos nas formas conjugadas livres ou solúveis como glicosídeos, os fitoquímicos dos grãos podem existir tanto nas formas livre quanto conjugada solúvel ou ainda em formas complexadas insolúveis. Estes últimos encontram-se ligados a materiais principalmente da parede celular, sendo que até 70% dos compostos fenólicos totais presentes no milho encontram-se nesta forma (SERPEN et al., 2007; ADOM et al., 2003; ADOM e LIU, 2002; BUNZEL et al., 2001). Este material de parede celular é de difícil digestão passando pelo trato gastrointestinal e alcançando o cólon, onde estes compostos podem ser absorvidos e terem sua atividade liberada atuando localmente como constatado por Adom e Liu (2002) em estudo sobre os efeitos destes grãos no câncer de cólon.

Existem razões para acreditar que o conteúdo de muitos metabólitos secundários de defesa das plantas na dieta é menor que o ótimo necessário para promover melhoras na saúde humana, mesmo para aqueles onde teores muito altos são considerados prejudiciais (BRANDT e MOLGAARD, 2001). Assim, embora a produtividade permaneça o maior foco para a maioria dos programas de melhoramento e produtores, a qualidade dos grãos é um fator de grande importância para a maioria dos cereais, devido a sua abrangência na dieta. No caso do milho, os teores e o balanço de alguns nutrientes essenciais encontram-se inadequadas, especialmente para populações que tem neste cereal sua principal fonte de alimentação. Deficiências como dos aminoácidos lisina e triptofano, minerais traço e precursores de vitamina A tornam o milho uma cultura de grande interesse em estratégias de biofortificação (NUSS e TANUMIHARDJO, 2010). Biofortificação é um termo que vem sendo utilizado para abranger as quatro estratégias mais utilizadas de fortificação endógena incluindo o

melhoramento genético convencional, a mutagênese, a transgenia, e o uso de fertilizantes (ORTIZ-MONASTERIO et al., 2007; ZHU et al., 2007).

Como consequência, o milho é uma das espécies vegetais mais estudadas do ponto de vista genômico e atualmente, inúmeros de seus caracteres hereditários e o seu genoma são bem conhecidos (SCHNABLE et al., 2009). Dentre as *poaceas*, só o arroz ainda possui um maior detalhamento do seu genoma estrutural e funcional, principalmente em função do menor tamanho deste e da complexidade genômica do milho (SASAKI e BURR, 2000). Atualmente, o germoplasma do milho é constituído por populações adaptadas, por materiais exóticos introduzidos e por variedades crioulas (locais), sendo caracterizado por uma ampla variabilidade genética (ARAÚJO e NASS, 2002), gerando o que se aponta como um excelente potencial para o melhoramento. Na medida em que os mercados consumidores tornam-se mais exigentes em relação ao valor nutritivo e funcional dos alimentos, a variabilidade genética torna-se um fator fundamental para se melhorar o potencial, tanto quantitativo quanto em relação a qualidade, de espécies vegetais que compõem nossa nutrição, direta ou indiretamente (ALTIERI, 2002).

A criação de novas variedades é, portanto, uma ferramenta poderosa para incrementar compostos de interesse nutricional, bem como aumentar a resistência da planta contra patógenos e pragas (FUJIMORI et al., 2004; ORTIZ-MONASTERIO et al., 2007). O melhoramento convencional baseado na variabilidade genética natural do milho tem sido o processo mais utilizado, mas também o mais lento (NAQVI et al., 2009). Por outro lado, técnicas de transgenia e mutagênese tem se tornado cada vez mais comuns por terem uma ação mais direcionada e possibilitarem maior entendimento acerca das rotas biossintéticas (HUANG et al., 2004; NAQVI et al., 2009; WU et al., 2010). Outra estratégia de biofortificação, por meio da fertilização com nutrientes, também tem sido intensivamente utilizada na cultura do milho nos últimos anos, sendo a fertilização foliar complementar uma das técnicas de maior crescimento, contribuindo para isto o desenvolvimento de híbridos com alto potencial nutricional e o uso de fertilizantes com altas concentrações de macronutrientes e baixas de micronutrientes (COELHO & FILHO, 2006). Esta prática torna-se mais adequada em grandes *comodities* e pode ser de baixo custo, uma vez que comumente é

utilizada concomitantemente com a aplicação de herbicidas e/ou inseticidas. Além disso, a pulverização permite a aplicação de minerais no momento certo durante o desenvolvimento da planta, evitando perdas (BRAKEMEIER, 1999).

Com base na grande variabilidade genética, na vulnerabilidade metabólica frente a estresses abióticos e no importante aporte nutricional proporcionado pelo milho, pode-se ter nesta cultura uma das principais fontes de nutrientes e compostos funcionais do reino vegetal. Neste âmbito, esta revisão discute o potencial nutricional e funcional dos grãos de milho, seus principais compostos bioativos em suas diferentes frações, relatando os esforços de biofortificação que vem sendo desenvolvidos para esta cultura.

Estrutura anatômica e composição química geral de grãos de milho

Conhecido botanicamente como cariopses, os grãos de milho são formados por quatro principais estruturas físicas: endosperma, gérmen, pericarpo (casca) e ponta (Figura 1), as quais diferem em composição química e também na organização dentro do grão (Tabelas 1 e 2) (PAES, 2006). Cerca de metade (42%) da massa seca da planta de milho é oriunda da cariopse. Características genéticas, condições edafoclimáticas e estágio de desenvolvimento podem impactar na composição do grão dentro e entre variedades (NUSS e TANUMIHARDJO, 2010).

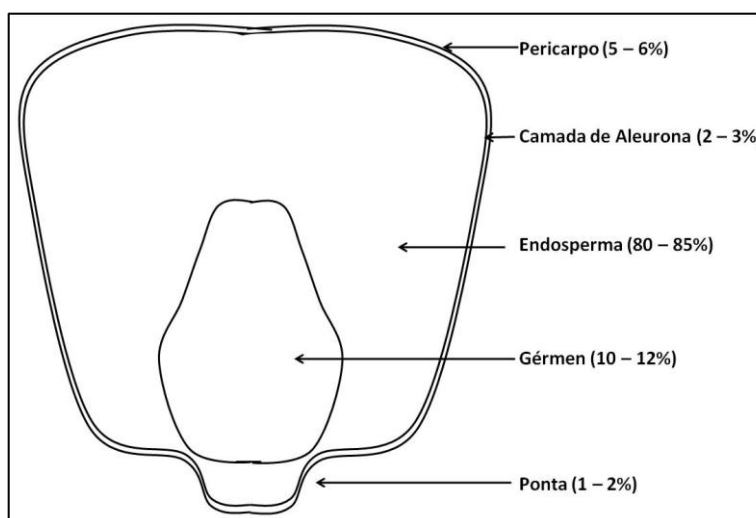


Figura 1. Anatomia do grão de milho e intervalo percentual das principais frações.

O endosperma representa aproximadamente 83% da massa seca do grão, consistindo-se principalmente de amido (88%), organizado na forma de grânulos. No endosperma estão também presentes as proteínas de reserva (8%) do tipo prolamínas. Essas proteínas formam a matriz que envolve os grânulos de amido dentro das células (XU e MESSING, 2008). O gérmen representa 11% do grão de milho e concentra quase a totalidade das moléculas hidrofóbicas (óleo e vitamina E) e dos minerais do grão, além de conter quantidades importantes de proteínas e açúcares (PAES, 2006).

Tabela 1. Composição química proximal das principais frações de grãos de milho amarelo integral¹.

Componente químico	Endosperma	Gérmen	Pericarpo
		g 100g⁻¹	
Amido	87,6	8,30	7,30
Proteína	8,00	18,4	3,70
Extrato etéreo	0,80	33,2	1,00
Cinzas ²	0,30	10,5	0,80
Fibra Bruta	2,70	8,80	86,7
Açúcares	0,62	10,8	0,34

¹Fonte: FAO (1992).

²Cinzas refere-se a minerais totais, nutrientes e elementos tóxicos.

Tabela 2. Composição química proximal, de vitaminas, minerais e aminoácidos de grãos de milho amarelo comum¹.

Composição Proximal		Vitaminas		Minerais		Aminoácidos essenciais	
por 100g							
Umidade (g)	10,4	Tiamina (mg)	0,385	Cácio (mg)	7,00	Triptofano (g)	0,067
Energia (kcal)	365	Riboflavina (mg)	0,201	Fosforo (mg)	210	Lisina (g)	0,265
Carboidratos (g)	74,3	Ácido Pantotênico (mg)	0,424	Ferro (mg)	2,71	Metionina (g)	0,197
		Vitamina B6 (mg)	0,622	Potássio (mg)	287	Fenilalanina (g)	0,463
Proteína (N x 6,25)	9,40	Vitamina B12 (mg)	0	Magnésio (mg)	127	Treonina (g)	0,354
Lipídios Totais (g)	4,70	Niacina (mg)	3,63	Cobre (mg)	0,31	Histidina (g)	0,287
Cinzas (g)	1,20	Folato (µg)	19,0	Zinco (mg)	2,21	Valina (g)	0,477
Fibras Totais (g)	7,30	Ácido Ascórbico (mg)	0	Sódio (mg)	35,0	Isoleucina (g)	0,337
Açúcares Totais (g)	0,64			Manganês (mg)	0,49	Leucina (g)	1,155
				Selênio (µg)	15,5		

¹Todos os valores do National Nutrient Database for Standard Reference, Release 23 (USDA, 2010).

Com os recentes progressos no estudo de grãos integrais, a distribuição de fitoquímicos nas diferentes frações do grão (farelo, gérmen, e porção amilolítica do endosperma) é de interesse. Porém, são escassos na literatura os resultados

sobre os teores de fitoquímicos e atividades antioxidantes dessas frações em grãos. Alguns estudos com trigo reportam perfis fitoquímicos e atividade antioxidante de grão integral (ADOM e LIU, 2002; ADOM et al., 2003), enquanto outros avaliam apenas o farelo (YU et al., 2003; RONDINI et al., 2004; ZHOU e YU, 2004) ou a porção amilolítica do endosperma (YU et al., 2004). Resultados obtidos por Adom et al. (2005) mostram que a maioria dos benefícios à saúde, proporcionados pelos fitoquímicos presentes nos grãos integrais, estão presentes na fração farelo/gérmen (Figura 1). O teor de compostos fenólicos (CF) da fração farelo/gérmen, por exemplo, foi 15-18 vezes superior às amostras do endosperma. Em farinha de grãos integrais de trigo, a fração farelo/gérmen contribuiu com 83% do conteúdo de CF total, 79% do conteúdo total de flavonóides, 78% do total de zeaxantina, 51% do total de luteína, e 42% do total de β -criptoxantina (ADOM et al., 2005).

Nos grãos de milho, os carotenóides, substâncias hidrofóbicas que conferem a cor aos grãos, são mais uniformemente distribuídos, com quantidades significativas também na camada de aleurona e no endosperma vítreo, em contraste com outros micronutrientes como minerais, elementos traço e polifenóis (KONOPKA et al., 2004). Já a vitamina E, de maneira geral, localiza-se principalmente no gérmen dos cereais integrais, podendo ser extraída com a fração lipídica ou perdida durante o processo de refino de óleo (CUKELJ et al., 2010).

MACRONUTRIENTES E MICRONUTRIENTES EM GRÃOS DE MILHO

Carboidratos e fibras

Os grãos integrais são fontes ricas de carboidratos, incluindo fibras dietéticas, amido resistente e oligossacarídeos. O endosperma da maioria dos cereais é a porção que contém 60-70% de carboidratos, predominantemente amido, acumulado em amiloplastos.

O amido presente nos grãos de milho é a principal macromolécula do ponto de vista energético. Porém, nem todo amido é digerido, sendo influenciado pelos teores das duas classes de amido existentes em milho, amilopectina e amilose. A

razão amilose/amilopectina, geralmente próxima a 25/75 no grão de milho (ZOBEL, 1988; WILSON et al., 2004), pode afetar a digestibilidade e absorção do amido durante o trânsito intestinal. No entanto, esta razão pode ser alterada por modificações genéticas. O maior determinante na biossíntese de amilose é a enzima amido-sintase-ligada ao grânulo (*granule-bound starch synthase* – GBSS), enquanto que a biossíntese de amilopectina está sob o controle de nove diferentes enzimas. Milhos mutantes com o gene *waxy* (*wx*) apresentam razão amilose/amilopectina reduzida (0/100) e é considerado altamente digerível e fonte útil para manter o controle de glicose em indivíduos insensíveis à insulina (TSAI, 1974; SCHURE et al., 1983; LIU et al., 1999; SEETHARAMAN et al., 2001). Neste mutante não há atividade da enzima GBSS. Por outro lado, milho com o gene mutante *amylose extender* (*ae*) aumenta esta razão para 80/20, originando milho ideal para certos produtos industriais (YUN e MATHESON, 1993). Milhos com altos teores de amilose, tais como o mutante *ae* também tem sido desenvolvidos por melhoramento convencional (MORITA et al., 1998). O mutante recessivo *sugary* (*su*), por sua vez, interfere na síntese de amido, causando altos níveis de polissacarídeos de cadeia curta e sacarose no endosperma maduro (BOYER e LIU, 1983). Já o duplamente recessivo *su2-wx* proporciona alta digestibilidade e palatabilidade (THOMPSON, 2000). Outros genes que regulam o teor de carboidratos no grão incluem *dull* (*du*), *brittle* (*bt*), e *shrunk* (*sh*) (NUSS e TANUMIHARDJO, 2010).

Além da relação amilose/amilopectina, outras características que incluem a forma, tamanho e tipo de grânulo, associação entre o amido e outros componentes, bem como o método de processamento também podem afetar a digestibilidade do amido (EZEUGU et al., 2005) limitando ou facilitando sua absorção. A fração do amido que resiste à digestão enzimática, chamada de amido resistente, correlaciona-se com alta proporção de amilose (BJORCK et al. 1994) e, apesar de não ser absorvido, também apresenta função na saúde humana. No caso dos grãos integrais, o amido resistente, juntamente com a celulose, hemicelulose, lignina, inulina, oligossacarídeos e outros constituintes distribuídos no farelo e em partes do endosperma dos grãos compõem as fibras dietéticas (LIU, 2007). As fibras dietéticas são consideradas como importante componente da dieta para manutenção do bom equilíbrio energético. Nas

variedades mais plantadas de milho, a porcentagem de fibras insolúveis é geralmente 12%, enquanto que das fibras solúveis é menor do que 2% (NUSS e TANUMIHARDJO, 2010). Esses carboidratos indigeríveis chegam ao cólon onde são fermentados pela microflora intestinal até acetatos, butiratos e propionatos, sendo os butiratos preferidos como fonte de calorias pelas células da mucosa. Estas moléculas são os substratos para síntese de ácidos graxos de cadeia curta, que têm sido relacionados com a redução dos níveis de colesterol LDL e com a indução de atividade antineoplásica (TOPPING e CLIFTON, 2001; SLAVIN, 2003).

Além disso, carboidratos não digeríveis aumentam a umidade e o peso seco das fezes e facilitam o trânsito intestinal, diminuindo as oportunidades de mutagênicos fecais interagirem com o epitélio intestinal (OLMO et al., 2007). Diluem ou ligam-se ainda a ácidos biliares secundários, os quais promovem a proliferação celular, diminuindo assim a probabilidade de ocorrerem mutações. Adicionalmente, a fermentação das fibras dietéticas diminui o pH intestinal, inibindo a conversão de ácidos biliares primários a secundários e reduzindo a solubilidade de ácidos biliares livres, diminuindo assim sua disponibilidade para exercer atividade co-carcinogênica (SLAVIN et al., 1999; SLAVIN et al., 2003). Outros mecanismos fisiológicos de ação relacionados são a complexação e eliminação do colesterol, modulação da atividade hormonal, estimulação do sistema imunológico, detoxificação, redução do conteúdo calórico e glicêmico dos alimentos e sequestro de radicais livres (LIU, 2007). Resultados de diversos estudos têm mostrado a ação protetora destas fibras dietéticas contra doenças cardíacas (PIETINEN et al., 1996), alguns tipos de cânceres (KASUM et al., 2002), obesidade e diabetes (MEYER et al., 2000; LIU et al., 2003; KOH-BANERJEE et al., 2004). Milho com alto teor de amilose tem igualmente um maior potencial antioxidante do que as variedades típicas e cerosas, no entanto, as razões deste comportamento ainda são desconhecidas (LI et al., 2007).

As fibras solúveis (arabinoxilanas solúveis e β -glicanas) são conhecidas por promover um baixo índice glicêmico (IG) (FREI et al., 2003; CASIRAGHI et al., 2006), estando relacionadas com redução do risco de diabetes tipo II e doenças cardíacas (PEREIRA et al., 2002; TRUSWELL, 2002). Grãos ricos em fibras

solúveis também tendem a aumentar a viscosidade intraluminal alterando o tempo de absorção de nutrientes no intestino (MISRA et al., 2009).

As características do amido e demais macromoléculas podem afetar o balanço glicêmico. Heaton et al. (1988) compararam a resposta glicêmica quando indivíduos consumiram grãos inteiros integrais, grãos quebrados integrais, farinha de grãos integrais e farinha de grãos polidos de cereais. A resposta à insulina no plasma aumentou na seguinte ordem: grãos integrais < grãos quebrados < farinha grossa < farinha de grãos polidos. O tamanho da partícula influenciou a taxa de digestão no caso de trigo e milho, mas não da aveia. Além disso, o consumo de grãos inteiros ou fracionados proporcionou controle da pressão sanguínea, redução da necessidade de uso de medicação anti-hipertensiva e diminuição nos níveis de colesterol no sangue (KAHLON et al., 1993; BRAATEN et al., 1994; MISRA et al., 2009). Além disso, grãos integrais influenciam as variações de peso corpóreo, numa relação inversa. O aumento do volume de bolo alimentar, a diminuição da densidade e relativamente baixa palatabilidade destes alimentos promove maior saciez, resultando em diminuição do ganho de massa.

Além de fibras dietéticas e do amido resistente, os grãos também contêm quantidades significativas de oligossacarídeos, como oligofrutose e inulina, os quais são compostos de estocagem natural de carboidratos em muitos tipos de plantas. Estes oligossacarídeos apresentam efeito similar ao das fibras solúveis no sistema gastrointestinal, podendo afetar a flora fecal (SLAVIN, 2003). Estudos em humanos indicam que o consumo de frutooligossacarídeos (inulina e oligofrutose) aumenta a concentração de bifidobactéria no intestino e reduz as concentrações de *Escherichia coli*, clostrídios e bacteróides (GIBSON et al., 1995), atuando, desta forma, como um estimulante de bactérias probióticas no intestino (LIU, 2007).

Proteínas e aminoácidos

Embora os cereais (incluindo o milho) não sejam considerados fontes com altos teores de proteínas, possuem teores proteicos suficientes para os requerimentos diários de adultos (CRISPEELS e SADAVA, 2003). Prolaminas são as proteínas majoritárias no milho, sendo as zeínas (α , β , γ e δ -zeínas) as mais abundantes.

A busca por grãos de milho com maiores teores protéicos tem se baseado em diferentes estratégias. O *cluster* gênico de uma classe de prolaminas de sorgo (kafirinas), por exemplo, foi incorporado heterologicamente em milho por transgenia (SONG et al., 2001; 2004), visando aumentar o teor destas proteínas no grão. As gerações F2 e F3 mostraram aumento nos níveis de proteínas kafirinas. Características genômicas, bioquímicas e proteômicas do endosperma de milho tem sido extensivamente discutidas (WOO et al., 2001; CONSONNI et al., 2005), porém a regulação da expressão das proteínas de reserva durante o desenvolvimento do grão permanece não compreendida. Xu et al. (2010) estudou a variação no teor de alguns compostos durante a maturação do grão e observou que sementes imaturas possuem alto teor de proteínas com atividade biológica (albumina e globulina), alta atividade antioxidante, alta concentração de açúcares redutores e baixo teor de amido e de lipídeos totais.

Cereais integrais também são ricos em alguns aminoácidos, como betaína (glicina-betaína, um aminoácido N-metilado) e colina, compostos que têm sido relativamente negligenciados como uma fonte de antioxidantes de cereais. A betaína é um doador metil para a homocisteína durante sua conversão em metionina. Uma alta concentração de homocisteína é um fator de risco para doenças cardiovasculares e pode conduzir ao estresse oxidativo. A betaína é rapidamente disponível no trato digestivo como foi demonstrado *in vivo* em estudo com alimentação de ratos (BARAK et al., 2003). A colina, como um precursor da betaína, está igualmente envolvida na defesa antioxidante do organismo (TESSERAUD et al., 2009). No entanto, a contribuição da betaína e da colina para o sistema antioxidante dos humanos é ainda desconhecida, sendo o milho considerado uma fonte moderada destas moléculas (KHOLLOVA et al., 2010).

Em milho, o acúmulo de betaína, que atua como osmólito no interior da célula vegetal, é associado a níveis adequados de cálcio e potássio e alta atividade antioxidante, e à resposta ao estresse salino (KHOLLOVA et al., 2010). Porém ainda permanece controverso se a síntese e acúmulo de betaína durante estresses abióticos por seca, salinidade, temperatura, radiação UV e metais pesados, bem como a síntese de prolina constituem uma resposta ao estresse ou fator de prevenção aos estresses. No entanto, estudos com aplicação foliar de betaína ou prolina têm demonstrado ganhos, sobre condições de estresse, no

crescimento vegetativo e na produtividade em muitas culturas (ASHRAF e FOOLAD, 2007).

O milho e outros cereais integrais, de forma geral, são também boas fontes de aminoácidos sulfurados, como a metionina (um aminoácido essencial) e a cisteína (um aminoácido não essencial que só pode ser sintetizado a partir da metionina). A ingestão de cisteína contribui para a síntese de glutathione, um dos principais antioxidantes endógenos, particularmente no fígado (MARIOTTI et al., 2004). O milho apresenta um teor de cisteína de 1,6-2,3g 100g⁻¹ de proteína e de metionina de 1,4-2,5g 100g⁻¹ de proteína (SHEWRY, 2007).

Aveia expressando o gene γ -zein de milho resultou no acúmulo de γ -zeína, a qual equivaleu a aproximadamente 4% da fração total de proteínas, melhorando a disponibilidade de cisteína e metionina (ZHANG et al., 2003). Em soja, a expressão deste mesmo gene aumentou significativamente o conteúdo de cisteína e metionina nas proteínas dos grãos (LI et al., 2005). De modo geral, as proteínas do milho são deficientes em alguns aminoácidos essenciais, como a lisina e o triptofano (WANG, et al., 2008). A lisina é um aminoácido essencial para humanos, e é mais limitante em cereais. Por isso, devido à importância do milho como fonte energético-protéica, têm-se buscado o desenvolvimento de genótipos de milho com teores mais elevados destes aminoácidos. Uma das primeiras tentativas de biofortificação do milho foi a geração de milho com altos teores de lisina (milho *opaque-2*) usando mutagenese (MERTZ et al., 1964). No entanto, a baixa produtividade (8 a 15% menos que o milho comum), baixa densidade e textura macia do grão, o que acarretava em alta suscetibilidade a insetos e fungos, demandaram novas opções. Em 1985, a partir do entendimento dos genes modificadores de textura de endosperma foi possível desenvolver genótipos de milho com teor elevado de lisina e de triptofano e com características agrônômicas desejáveis. Esses genótipos foram denominados "milhos de alta qualidade protéica" ou QPM (*Quality Protein Maize*), tendo sido criados pela introdução de múltiplos genes *o2 modulators (mo2)* no germoplasma *opaque2*, melhorando características negativas no fenótipo *opaque* e mantendo a qualidade (PRASANNA et al., 2001). No Brasil, o Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Milho e Sorgo), tem desenvolvido cultivares de milho QPM com o objetivo de gerar

cultivares comerciais destinadas à alimentação humana com características de produção desejáveis e elevado valor nutricional. Estes milhos QPM apresentam valores protéicos de até 83% superiores à proteína de referência, mostrando-se similar ao da mistura arroz/feijão (considerada como referência) em seu teor de lisina e triptofano (NAVES et al., 2004). Além disso, milho com alto teor de lisina (*high-lysine*) também foi desenvolvido, tendo sido tão digerível, em suínos, quanto às variedades de alto teor de óleo (*high-oil corn*) (O'QUINN et al., 2000).

De forma alternativa, o uso de técnica de transgenia para expressão de genes *sense* e *antisense* de zeínas tem demonstrado avanços na redução do acúmulo de α -zeínas em milho de uma forma mais prática e direta quando comparado ao melhoramento tradicional para desenvolvimento de variedades QPM, possibilitando ainda o desenvolvimento de plantas transgênicas com deficiência em cada classe de zeínas e consequentemente o estudo de suas funções específicas. Como exemplo, a redução sítio-dirigida da 19kDa α -zeína resultou em aumento dos níveis de lisina, triptofano e metionina (HUANG et al., 2004). Outras estratégias baseadas em transgenia têm sido estudadas, incluindo a expressão do gene DHDPS (ácido dihidrodipicolínico sintase). No entanto, apenas apresentou acréscimo significativo de lisina em grãos de milho quando utilizado promotor endosperma-específico (MAZUR et al., 1999). Tecnologia de RNA de interferência foi utilizada para reduzir α -zeínas em milho (SEGAL et al., 2003), tendo sido capaz de eliminar a produção de α -zeínas sem afetar o acúmulo de outras proteínas de reserva. Além disso, proporcionou aumento de lisina no grão e redução de leucina, alanina e glutamina. Fatores de transcrição exógenos também estimularam a transcrição de proteínas heterólogas em arroz e trigo, porém estudos neste âmbito ainda não foram desenvolvidos em milho. Milhos transgênicos com o regulador DZS10, permitiram o acúmulo de altos níveis de metionina nos grãos, resultando em alimento animal útil, sem a necessidade de adição de metionina sintética (LAI e MESSING, 2002).

Novos estudos na biofortificação do milho com proteínas e aminoácidos específicos continuam sendo desenvolvidos, incluindo estudos com uso de fertilização. O acúmulo de proteínas parece ser influenciado pela fertilização mineral, particularmente utilizando nitrogênio (N) (WANG, 2008), zinco (Zn), molibdênio (Mo) (KALA, 2008) e enxofre (S) (LOŠÁK et al., 2008). Ferreira et al.

(2001) demonstraram que fertilização com Zn e Mo aumentaram o teor de proteínas em grãos de milho. Tsai et al. (1992) mostraram aumento na concentração de proteínas em milho suplementado com N, com deposição preferencial de zeína. Porém, como zeínas são pobres em lisina e triptofano, o balanço de aminoácidos nesta situação não foi favorável. No entanto, em alguns casos isto pode ser compensado, pois acréscimo de N pode aumentar o tamanho do gérmen, o qual apresenta melhor balanço de aminoácidos do que o endosperma (TSAI et al., 1992).

Minerais

O aumento crescente na produtividade, e a pureza no processo de produção de fertilizantes industriais, tem resultado na depleção do solo com perda de fitodisponibilidade de minerais (RAUT et al., 2010; LAL, 2009). Assim, a deficiência de minerais tem se tornado um fator limitante na produtividade e qualidade de muitas culturas, incluindo o milho. As plantas absorvem esses minerais principalmente do solo e acumulam em diferentes partes, incluindo o grão, sendo que o teor de minerais e elementos traço varia grandemente de um tipo de cereal para outro, assim como em relação ao solo onde é cultivado (CURTIN et al., 2006; ZHAO et al., 2007). Micronutrientes minerais como Zn e ferro (Fe), assim como selênio (Se), cobre (Cu) e manganês (Mn) apresentam importante função metabólica, agindo como cofatores de diversas enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase, por exemplo, é Zn, Cu e Mn dependente. Já a glutatona peroxidase e a tioredoxina redutase são Se dependentes, e a catalase é Fe dependente (Hänsch e Mendel, 2009).

Apesar da importância destes minerais na saúde humana, a concentração de minerais em plantas é comparativamente menor que em alimentos de origem animal. Isso se deve à dificuldade de absorção de alguns minerais via solo e/ou à perda durante o processamento, principalmente de grãos, o que tem resultado em três bilhões de pessoas com deficiência de nutrição de micronutrientes minerais (WELCH e GRAHAM, 2004), pressupondo a necessidade de viabilizar incrementos no conteúdo de minerais, principalmente em cereais, como o milho. Além disso, alguns minerais são indisponíveis em vegetais por estarem complexados, ou por haver moléculas que dificultem a absorção. Neste âmbito, a

biofortificação de minerais é uma estratégia recente que tem apresentado melhores resultados que a fortificação exógena por suplementação de minerais, requerendo, no entanto, conhecimentos aprofundados de rotas metabólicas, processos de absorção, transporte e acúmulo (WATERS e SANKARAN, 2010).

Uma vez que o ácido fítico (hexafosfato de inositol) apresenta características de antinutriente devido a sua capacidade de quelar elementos traço e minerais, como o Zn e o Fe (GLAHN et al., 2002), tornando-os indisponíveis para absorção, a qual necessitaria de hidrólise com a enzima fitase, ausente em animais não ruminantes (URBANO et al., 2000). Estudos visando a redução de ácido fítico em grãos de cereais, como os de milho, têm sido bastante realizados. Porém, Doria et al. (2009) mostraram que o milho Ipa-1-241, um milho mutante defeituoso na síntese de ácido fítico durante a maturação da semente, apresenta baixa capacidade de germinação em comparação com o tipo selvagem. O grão mutante continha aproximadamente 50% mais Fe livre ou de ligação fraca, e mostrou um alto conteúdo de radicais livres, principalmente concentrados no embrião. Além disso, proteínas da semente mutante eram mais carboniladas e o DNA apresentava mais danos, enquanto que os lipídios pareciam estar mais peroxidados, sugerindo um papel importante do ácido fítico na proteção das sementes contra estresses oxidativos. Neste contexto, a alteração dos complexos de ácido fítico por fitases numa pré-fermentação como a que ocorre no preparo de pães a pH 5-5,5 (LEENHARDT et al., 2005), parece ser uma alternativa razoável. Este procedimento aumenta a biodisponibilidade mineral significativamente, especialmente a de Fe e de Zn (LOPEZ et al., 2003).

O ácido fítico está localizado principalmente no farelo, mais especificamente na camada de aleurona, sendo o maior composto de estoque de fósforo em muitos grãos, cerca de 70%, contribuindo entre 1 e 7% de seu peso seco (DE BOLAND et al., 1975). Se durante muito tempo os fitatos foram tidos como problema (MAZARIEGOS et al., 2006), na atualidade seu potencial antioxidante é bem conhecido (RIMBACH e PALLAUF, 1998). Ele suprime as reações oxidativas catalizadas pelo Fe devido à capacidade quelante, podendo ser um potente antioxidante *in vivo*, por exemplo, suprimindo a peroxidação lipídica (GRAF et al., 1987; GRAF e EATON, 1990). O ácido fítico pode também reduzir a incidência de câncer de cólon e de cálculos renais, assim como proteger

contra doenças inflamatórias do intestino (GRAF e EATON, 1990) além de controlar o teor glicêmico do sangue. Outros mecanismos de ação do ácido fítico também são conhecidos, incluindo ativação de células imunocompetentes, participação na transdução de sinais, bem como na divisão e diferenciação celular (BELAL et al., 2009).

Assim, levando em consideração os efeitos benéficos do ácido fítico na fisiologia vegetal e na saúde humana, mas também a necessidade de melhorar a ingestão de minerais, uma das alternativas para o aumento da biodisponibilização de minerais é a ingestão de grãos integrais, os quais fornecem muito mais minerais que os processados (perdas de 70% de Fe e de 75 a 80% para ambos, Zn e Mn), o suficiente para compensar o efeito deletério do ácido fítico. Entretanto, há necessidade de continuidade destes estudos para averiguar a biodisponibilidade desses minerais e elementos traço dos grãos integrais, os quais podem suprir as necessidades minerais e contribuir no balanço antioxidante do organismo (LIU, 2007).

O Zn é fundamental como cofator de transcrição, na defesa antioxidante e no reparo do DNA e a sua deficiência alimentar pode contribuir para danos e modificações oxidativas do DNA, os quais aumentam o risco de câncer (MAFRA, 2005). O milho apresenta média de $20\mu\text{g g}^{-1}$ de Zn, correspondendo a aproximadamente 40% do necessário as mulheres não grávidas e crianças após fase de amamentação (BROWN et al., 2004). Além disso, aproximadamente metade dos solos agriculturáveis do mundo é deficiente em Zn para produção de alimentos, sendo estes solos associados com a deficiência de Zn em humanos (CAKMAK, 2008). Portanto, vários esforços têm sido realizados visando a biofortificação de Zn.

O melhoramento convencional é a principal estratégia adotada pelo programa HarvestPlus (<http://www.harvestplus.org/>), o qual visa a biofortificação de culturas chaves em países em desenvolvimento, identificando, por exemplo, características relacionadas à alta concentração de minerais (Zn e Fe) em diferentes culturas (trigo, arroz, milho, mandioca, milheto, feijão e batata-doce) e introduzi-las em cultivares locais adaptadas. Este programa objetiva incrementos entre 33 e 100% no conteúdo de minerais, dependendo do mineral e da cultura, sendo que uma cultivar de feijão com altas concentrações de Fe já foi

desenvolvida. De forma similar, variedades de arroz com 4-5 vezes mais Fe no grão após processamento também foi gerado pelo International Rice Research Institute (IRRI) (GREGORIO, 2002).

Nos germoplasmas de milho há grandes variações no teor de Zn nos grãos, sendo esta variabilidade bastante explorada em trabalhos de melhoramento convencional (CAKMAK, 2008; SIMIC et al., 2009). Em nível molecular, no entanto, pouca informação encontra-se disponível acerca do metabolismo de acúmulo de Zn e de outros micronutrientes. Supõe-se que exista uma correlação positiva entre o nível de proteína e os teores de Zn, possivelmente devido a uma co-segregação entre seus fatores genéticos (UAUY et al., 2006). Portanto, esforços para incremento de proteínas poderiam aumentar os níveis de Zn, por consequência. Milho transgênico com baixos teores de fitase também poderia aumentar a biodisponibilidade de Zn, apesar de as evidências serem inconsistentes (MAZARIEGOS et al., 2006; MILLER et al., 2007).

Por outro lado, a fertilização tem sido uma boa estratégia para aumentar o conteúdo de zinco em diferentes culturas de cereais. A aplicação de uréia contendo Zn incrementou os níveis de Zn e de proteínas em grãos. Apesar de outros estudos serem necessários, Martin-Ortiz et al. (2009) mostraram que a aplicação de NPK (nitrogênio, fósforo e potássio) com lignosulfato de Zn pode ser uma fonte adequada de Zn para a cultura do milho. Além disso, o Zn reduz a absorção de fósforo e por fim o acúmulo de fitato no grão, o que tornaria o Zn mais biodisponível no trato digestivo (HOTZ e GIBSON, 2007; HOTZ e MCCLAFFERTY, 2007). De forma complementar, plantas provenientes de sementes com alto teor de Zn apresentam maior capacidade de adaptação a condições ambientais adversas (CAKMAK, 2008). Em geral, fertilização com Zn, tem mostrado melhores resultados em solos pobres em Zn, onde a aplicação foliar deste elemento na cultura do trigo em um estágio de crescimento tardio aumentou sua concentração nos grãos em três vezes. Estes resultados positivos ocorrem possivelmente devido ao fato de que o Zn apresenta absorção relativamente alta (CAKMAK, 2008).

A deficiência de Fe afeta aproximadamente dois bilhões de pessoas no mundo (WHO, 2000), o que torna sua biofortificação no milho importante. O Fe apresenta baixa mobilidade no solo, mas aplicações de fertilizantes foliares (com

FeSO₄ e quelatos -Fe-EDDHA, Fe- EDTA) tem permitido sua absorção foliar (FROSSARD et al., 2000; ZHU et al., 2007). Além disso, o sinergismo/antagonismo observado entre minerais pode-se mostrar uma estratégia eficiente. Aplicação de N, P e/ou K também pode aumentar a absorção de Fe, além de Zn e cálcio (Ca) do solo, exceto quando aplicados excessivamente, pois neste caso resultam em efeito oposto (FROSSARD et al., 2000). Em arroz, a aplicação de N aumentou a concentração de Fe nos grãos, mas apresentou efeito adverso para o Zn (ZHANG, 2008). Por sua vez, em grãos de milho, a fertilização com N aumentou os teores de P, K, Ca, Magnésio (Mg), S, Cu, Fe, Mn e Zn (FERREIRA et al., 2001).

Locus de características quantitativas (QTLs – *quantitative trait loci*) para acúmulo de minerais em grãos tem sido mapeados em diversas culturas (STANGOULIS et al., 2007; NORTON et al., 2010), o que facilita o melhoramento assistido utilizando marcadores moleculares. Estudo relativamente recente divulgou uma fonte útil de marcadores SSRs e SNP em genes que codificam para transportadores de Zn e Fe em milho, a qual pode ser utilizada para mapeamento genético e de associação, seleção assistida e desenvolvimento de plantas transgênicas com incremento de micronutrientes em milho (SHARMA e CHAUHAN, 2008). O aumento da expressão de proteínas transportadoras de Zn e Fe, por exemplo, mostrou o incremento simultâneo de ambos micronutrientes. Expressão de genes codificando proteínas de transporte de Zn (família de proteínas ZIP) de *Arabidopsis thaliana* em cevada proporcionou o aumento das concentrações de Zn (RAMESH et al., 2004). No entanto, uma vez que a absorção de elementos tóxicos como o cádmio (Cd) pode ocorrer concomitantemente com a absorção de nutrientes essenciais como Fe e Zn, por utilizarem os mesmos transportadores, esforços para incrementar a absorção destes nutrientes devem evitar possíveis consequências indesejáveis como o aumento no acúmulo de metais pesados (PALMGREN et al., 2008).

Estudos com os fatores de transcrição NAC de *Triticum diccoides* (NAM-B1) também mostraram aumento na concentração de Zn e Fe nos grãos, possivelmente pelo estímulo da senescência foliar e remobilização destes minerais para os grãos (UAUY et al., 2006). Além disso, a superexpressão do gene *Yellow stripe 1* (Ys1), codificando para nicotianamina aminotransferases

permitiu o aumento no acúmulo de Fe (CURIE et al., 2001). *Ys1* pode também atuar na absorção de Zn e Cu (DIDONATO et al., 2004). Superexpressão do gene para fitase de *Aspergillus* (*PhyA*), usando promotor endosperma específico de arroz *glutelin-1* (*Gt-1*), em combinação com o aumento de ferritina ligadora de Fe de soja, a proteína de estoque de Fe, aumenta os níveis de Fe e sua biodisponibilidade em milho (DRAKAKAKI et al., 2005). O aumento de ferritina no grão resulta em proteção contra quelatos de metais durante o processo de digestão em humanos, aumentando a absorção de Fe (LONNERDAL et al., 2006). Adicionalmente, a recente observação da influência do conteúdo de β -caroteno no aumento da bioacessibilidade destes minerais deve gerar novas estratégias de aumento na biodisponibilidade de minerais traço (GAUTAMA et al., 2010).

O Ca, assim como o Zn, é um importante cofator e sinalizador molecular, sendo essencial na cascata de coagulação sanguínea. Sua deficiência tem profundo impacto na saúde óssea podendo resultar em raquitismo ou osteoporose, dependendo da idade (WHO/FAO, 1998). Estratégias de transgenia para aumento de Ca em vegetais têm focado em aumentar a expressão de transportadores secundários de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ localizados na membrana do vacúolo. O transportador secundário de *Arabidopsis* CAX1, importante na homeostase de Ca em células vegetais, aumentou a biodisponibilidade de Ca em tubérculos de batata transgênica (PARK et al., 2005), e mais recentemente os mesmos autores observaram um aumento de 25-32% na concentração de Ca em alface transgênica em relação ao controle não transgênico sem ter afetado parâmetros de qualidade sensorial como sabor e crocância (PARK et al., 2009).

Da mesma forma, o Se, do qual os cereais são excelentes fontes, é um elemento traço essencial para a regulação do metabolismo antioxidante, tanto em plantas quanto em animais. Ele funciona como um cofator para glutathione peroxidase, uma enzima que protege contra danos oxidativos teciduais. Este mecanismo tem uma ação supressora na proliferação celular quando em altos níveis (SLAVIN, 2003). Em estudo com alimentação de ratos utilizando duas variedades de trigo, uma pobre em Se (23mg kg^{-1}) e outra rica em Se (800mg kg^{-1}), a atividade da glutathione peroxidase no plasma, fígado e hemáceas foi diretamente correlacionada ao conteúdo de Se (CIAPPELLANO et al., 1989). A biodisponibilidade de Se de várias frações de cereais em alimentação de ratos

também foi bastante positiva (60% para o farelo de trigo e 100% para a farinha de trigo), além de constatar-se um aumento na atividade da glutathione peroxidase no fígado e nas células vermelhas com uma dieta de Se em torno de 20mg kg^{-1} (REEVES et al., 2007).

A seleção de variedades de milho com um maior teor de Se, bem como seu incremento utilizando adubação suplementar poderiam proporcionar melhoras no potencial antioxidante do organismo. Fertilização com Se talvez seja a intervenção com minerais com melhores resultados, já que selenatos de sódio são altamente móveis, de fácil absorção e acumulam em uma forma biodisponível, selenometionina, inclusive no grão (BROADLEY et al., 2006; FANG et al., 2008; LI et al., 2010). A adição de Se em fertilizantes a base de NPK tem sido largamente utilizado na Finlândia e na Nova Zelândia (países com solos naturalmente pobres em Se) onde tal prática tem proporcionado o acúmulo de Se nos grãos de diferentes culturas (COMBS, 2001; GOMEZ-GALERA et al., 2010).

Até o momento não há relatos de milhos transgênicos modificados para aumentar o acúmulo de Se. No entanto, devido a sua similaridade química com o S, vários genes da rota metabólica do S têm sido identificados como possíveis candidatos. Nesta mesma rota metabólica o Se é absorvido, acumulado e volatilizado, sendo uma estratégia de interesse a inibição desta etapa de volatilização, o que promoveria seu acúmulo sem afetar o metabolismo do S (SORS et al., 2005).

METABÓLITOS FUNCIONAIS EM GRÃOS DE MILHO

Carotenóides

Os carotenóides constituem o maior grupo de pigmentos sintetizados pelo metabolismo secundário, com mais de 600 estruturas já caracterizadas. São sintetizados por organismos fotossintéticos, algumas bactérias e fungos, sendo responsáveis, através da dieta, pelas características de cor de muitos pássaros, insetos e invertebrados marinhos (FRASER e BRAMLEY, 2004). Nas plantas, são essenciais para seu crescimento e desenvolvimento, no processo de fotossíntese, na proteção contra danos fotooxidativos e como precursores do ácido abscísico. A

presença de carotenóides em grãos acrescenta ainda valor nutricional na dieta atuando como precursores de vitamina A e de compostos retinóicos essenciais (GALLAGHER, 2004).

Nos grãos de milho, os carotenóides estão uniformemente distribuídos, com quantidades significativas na camada de aleurona e no endosperma (Figura 1), ao contrário de outros minerais, elementos traço e polifenóis (KONOPKA et al., 2004).

Os cereais são uma importante fonte de carotenóides, sendo o milho o que apresenta os maiores teores com cerca de 11mg de carotenóides por quilograma de massa seca (PANFILI et al., 2004). Os carotenóides incluem o α e β -caroteno, criptoxantinas, zeinoxantina, luteína e zeaxantina (Figura 2), sendo estes dois últimos xantofilas encontradas majoritariamente no milho (6-18mg g⁻¹ de zeaxantina e 4-8mg g⁻¹ de luteína) (DE OLIVEIRA e RODRIGUEZ-AMAYA, 2007). Essas xantofilas têm ganhado interesse devido a sua associação com a saúde ocular (MOZAFFARIEHET al., 2003; MRCOPHTH et al., 2008), uma vez que são os únicos carotenóides encontrados na mácula, com função de proteção contra os radicais livres e os comprimentos de luz azul do ultravioleta próximo (SEMBA e DAGNELIE, 2003; EICHLER et al., 2002).

Estudos têm igualmente mostrado que a ingestão de luteína e zeaxantina na dieta podem reduzir o risco de cataratas e degeneração macular relacionada à idade, causa principal de cegueira entre os idosos (SEDDON et al., 1994; BROWN et al., 1999). Além disso, tanto a luteína e a zeaxantina, como a astaxantina (com estrutura similar aos dois primeiros), mostraram-se igualmente eficazes frente a células epiteliais da traquéia de ratos, em relação a sua capacidade antioxidante em combater os danos causados ao DNA pela exposição à radiação ultravioleta A (UVA), além de influenciar na sua cinética de reparação. Por outro lado, efeito adverso foi observado em cultivo celular de linhagem de neuroblastoma humano que, cultivadas na presença destes três carotenóides durante um período de irradiação de trinta minutos, causou aumento dos danos no DNA, sugerindo que a efetividade destes carotenóides depende de uma série de fatores como concentração, tipo de célula relacionado, tempo de exposição à irradiação, além do local na célula e interação com outros antioxidantes (SANTOCONO et al., 2006). Já em estudo *in vivo*, utilizando ratos como modelo

experimental, observou-se um efeito supressor da luteína, quando administrada durante a fase promotora da hepatocarcinogênese, em níveis que seriam similares aos observados em humanos (MORENO et al., 2007).

Outros carotenóides, como α -caroteno, β -caroteno e β -criptoxantina apresentam atividade pró-vitamina A, sendo que o β -caroteno apresenta duas vezes a atividade dos demais por apresentar dois anéis β não substituíveis. Estes carotenóides são clivados no lúmen intestinal para produzir retinol (vitamina A), um micronutriente essencial para saúde humana e para o qual a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2011) estima que haja mais de 100 milhões de crianças no mundo com deficiência. A maioria dos casos em países em desenvolvimento. Devido a isso, a biofortificação através de engenharia metabólica tem sido de grande interesse, especialmente visando incrementos de carotenóides pró-vitamina A, sendo o milho uma cultura alvo por representar grande fração da dieta nestes países. No entanto, para ser bem sucedida, esta estratégia requer um aumento controlado dos níveis totais de carotenóides através do aumento do fluxo biossintético, minimização da degradação e otimização do sequestro, além da necessidade de promover um incremento controlado de compostos específicos, como o β -caroteno, o que requer amplo conhecimento destas vias metabólicas.

Em plantas, as enzimas envolvidas na biossíntese de carotenóides são codificadas no núcleo e enviadas às membranas de cloroplastos, cromoplastos e amiloplastos, onde ocorre a síntese destes compostos. A rota metabólica simplificada da biossíntese de carotenóides (Figura 2) começa com a formação de fitoeno a partir de geranilgeranilpifosfato, um passo mediado pela fitoene sintase (PSY), a qual, por ser a primeira enzima desta via é de vital importância na síntese de carotenóides. No milho, são atualmente conhecidos três genes que codificam para essa enzima (*psy1*, *psy2* e *psy3*), sendo que a carotenogênese no endosperma está relacionada predominantemente com o gene *psy1* (GALLAGHER et al, 2004; LI et al., 2008), sendo que sua expressão correlaciona-se com os teores de carotenóides no endosperma de grãos de milho (GALLAGHER et al, 2004). Em variedades brancas de milho, assim como em arroz, observou-se que o fenótipo se deve a um alelo *psy1* com perda de função, resultando em ausência de acúmulo de carotenóides no endosperma (ALURU et al., 2008; GALLAGHER et al., 2004). O gene *psy2*, por outro lado, apresenta altos

níveis de mRNA em folhas mas parece ter pouca influência nos níveis de carotenóides no endosperma (PALLAISA et al, 2003; GALLAGHER et al, 2004), enquanto que a expressão de *psy3* foi observada predominantemente na raiz e no embrião, tecidos com baixa concentração de carotenóides (LI et al, 2009).

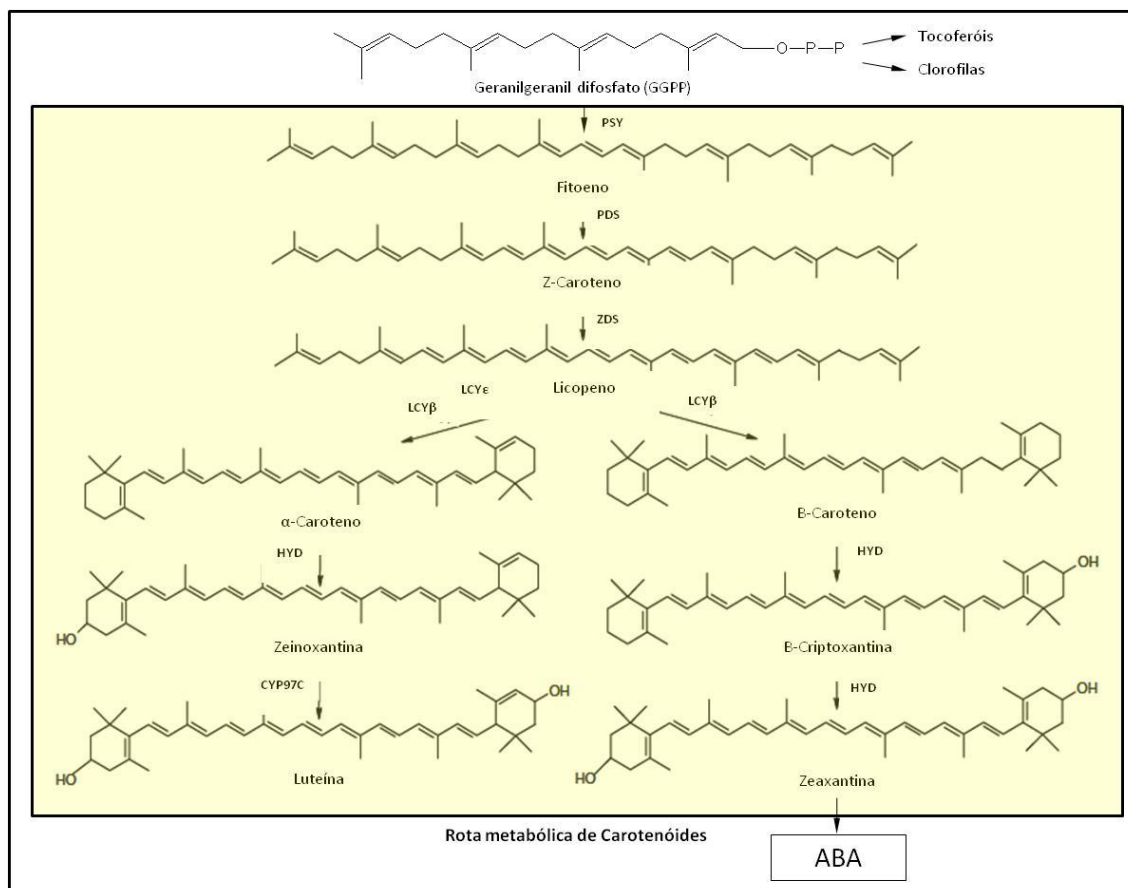


Figura 2. Rota metabólica dos carotenóides e algumas das principais enzimas envolvidas, incluindo fitoeno desaturase (pds), ζ-caroteno desaturase (zds), licopeno ε-ciclase (lycε), licopeno β-ciclase (lycβ), ε-caroteno hidroxilase (CYP97C) e β-caroteno hidroxilases (hyd). ABA: síntese de ácido abscísico.

Estudos mostram que o gene *psy1* apresenta-se polimórfico em diferentes variedades de milho (PALAISA et al., 2003). A clonagem do gene *psy1* em milho através de transposon resultou no produto gênico “Yellow1” (Y1), o qual proporcionou aumento do acúmulo de carotenóides no endosperma. A análise por QTL mostrou que *psy1* e *Zds* (zetacaroteno-desaturase) estão associados com variações no teor individual e total de carotenóides. O uso do promotor 27kDa γ-zein ou o promotor modificado “super 27kDa γ-zein” igualmente aumentou o

acúmulo de carotenóides, preferencialmente para β -caroteno, no endosperma (MARKS et al., 1985; MARZABAL et al., 1998; WU et al., 2010). Mais de 34 vezes de aumento nos carotenóides do endosperma, relativo a variedades brancas, foi obtido usando “super zein promoter” com a superexpressão de *crtB* (gene de *Escherichia coli* cuja função relaciona-se com a do gene *psy*) e *crtl* (gene de *Escherichia coli* responsável por quatro reações de desaturação, convertendo fitoeno a licopeno)(ALURU et al., 2008). Além disso, os níveis de carotenóides e a sua composição no gérmen e no endosperma são dramaticamente afetados pelos níveis de expressão dos genes *lcy β* (licopeno β -ciclase) e *lcy ϵ* (licopeno ϵ -ciclase) (HARJES et al., 2008). Fraser e Bramley (2004) mostraram que o gene *lcy ϵ* controla a razão zeaxantina/luteína, sendo que codifica para uma enzima-chave no teor de pro-vitamina A em milho (Figura 2). Através de análise de mapas de associação, análise de expressão gênica e mutagênese, Harjes et al. (2008) mostraram que a variação no *locus* para o gene *lcy ϵ* diminui o fluxo do ramo de α -caroteno aumentando no de β -caroteno na rota metabólica de carotenóides. Quatro polimorfismos naturais de *lcy ϵ* explicaram 58% da variação nestes ramos e uma diferença de três vezes nos compostos pro-vitamina A.

Vallabhaneni et al. (2009) mostraram que a abundância de mRNA para os seis genes funcionais que codificam para caroteno hidroxilase (HYD) e dos genes CYP97C (β -caroteno hidroxilase - P450) e CYP97A (ϵ -caroteno hidroxilase - P450) em milho variou entre diferentes tecidos da planta de milho e também durante o desenvolvimento do endosperma. A variabilidade natural no gene para β -hidroxilase 1 (*hydb1*) foi capaz de explicar 23% dos teores de β -caroteno no grão e 37% da razão de β -caroteno para carotenóides totais. Já a análise combinada dos genes *hydb1* e *lcy ϵ* , explicou 43% e 56% da variação de fenótipo de β -caroteno e da razão β -caroteno/carotenoides totais, respectivamente (YAN et al., 2008). De forma similar, a descoberta do *locus* para hidroxilase3 (*hyd3*), mapeado por QTL, mostrou que três alelos naturais em variedades de milho podem explicar mais de 80% da variação e aproximadamente 11 vezes a diferença em β -caroteno relativo à β -criptoxantina em milho (VALLABHANENI et al., 2009b). Recentemente, a expressão de outros genes relacionados à rota metabólica de síntese de carotenóides também foi estudada ao longo do desenvolvimento do grão em germoplasmas geneticamente variáveis de milho,

mostrando que a correlação com o acúmulo de carotenóides pode ser positiva ou negativa, dependendo do período pós-polinização em que é feita esta análise de correlação (VALLABHANENI et al., 2009a).

Esforços para implantar melhorias no teor ou composição de carotenóides em milho, baseados na variabilidade de carotenóides individuais em populações crioulas, através do desenvolvimento de novas variedades, tem conduzido a resultados interessantes (GALLAGHER, 2004). Algumas das variedades encontradas apresentaram níveis de zeaxantina de até 12 mg kg⁻¹ em peso fresco, com teores de carotenóides totais em torno de 30 mg kg⁻¹ em peso fresco, sendo promissoras candidatas para programas de melhoramento, visando inclusive o aumento dos níveis de β -caroteno, por estarem no mesmo ramo da rota metabólica de síntese de zeaxantina (FANNING et al., 2010). Em outros estudos de caracterização de germoplasmas de milho crioulo tem sido observada alta variabilidade de carotenóides, possibilitando a seleção conjunta de algumas variedades que também apresentaram alto teor de proteínas e lipídios, além de características fenotípicas como textura vítrea para programas de melhoramento (Berardo et al., 2009).

Visando especificamente a biofortificação de carotenóides pró-vitamina A, as estratégias de melhoramento convencional proporcionaram a seleção de cultivares com altos teores de carotenóides totais (66,6 μ g g⁻¹ de peso seco) e β -caroteno (13,6 μ g g⁻¹ de peso seco) (HARJES et al., 2008). Menkir et al. (2008), avaliando diferentes linhagens de milho amarelo adaptadas a clima tropical, observaram grandes diferenças nos teores dos principais carotenóides (luteína, zeaxantina, β -caroteno, β -cryptoxantina, α -caroteno), além de correlações significativas entre os carotenóides que partilham um único dos dois ramos principais da via biossintética dos carotenóides, o que tornaria viável o aumento, por engenharia genética, dos níveis de múltiplos carotenóides simultaneamente.

Variedades de milho doce também mostraram potencial para desenvolvimento de variedades com altos teores de zeaxantina (FANNING et al., 2010). A cor destas variedades apresentou correlação com os níveis de carotenóides (0,59–0,70 para zeaxantina, β -criptoxantina, β -caroteno e carotenóides totais) (FANNING et al., 2010), o que contrasta, no entanto, com os resultados obtidos por Harjes et al. (2005), os quais não observaram correlação

destes compostos com a cor das variedades avaliadas. Complementarmente, em estudo realizado na Embrapa Clima Temperado (MESSIAS et al., 2011) foi demonstrado a expressão diferenciada dos genes *psy1* e *lut1* (o qual codifica para a enzima caroteno ϵ - ciclase) (Figura 2) entre variedades de milho crioulo do sul do Brasil.

Locus de características quantitativas (QTL) (VALLABHANENI e WURTZEL, 2009) também têm sido estudados em genes que codificam enzimas da rota metabólica de carotenóides, incluindo a fitoene sintase (*psy*), fitoeno desaturase (*crtI*), licopeno ϵ -ciclase (*lyc ϵ*), e licopeno β -ciclase (*lyc β*).

Atualmente, pesquisadores têm estudado a biofortificação de múltiplos nutrientes em milho (ALTPETER et al., 2005). Por meio de estratégias de transgenia, recente sucesso foi obtido no incremento de multivitaminas em milho, chegando a 169 vezes mais β -carotene, 6 vezes mais ácido L-ascórbico, e o dobro de folato no endosperma comparado com o tipo selvagem (NAQVI et al., 2009). Este milho foi criado usando transferência dos cDNA que codificam para os genes *psy1* e *crtI*, relativo a biossíntese de β -caroteno, cDNA de dehidroascorbato redutase de arroz (*dhar*) para síntese de vitamina C, e gene para *folE* de *E. coli* para síntese de folato (ZHU et al., 2008).

Estratégias de biofortificação por fertilização, na cultura do milho, visando incremento no teor de carotenóides, por outro lado, não tem sido muito estudada. Alguns avanços em outras culturas, porém mostram resultados promissores. A fertilização com Ca^{2+} e NO_3^- , por exemplo, proporcionou o aumento do teor de licopeno e β -caroteno em pimenta (FLORES, 2004). A fertilização com N aumentou carotenóides totais e peso seco de couve (KOPSELL et al, 2007), sendo que em ambos os casos os resultados variaram entre cultivares distintas.

Apesar do fato de que mais estudos acerca da toxicidade e influência em outros compostos nutricionais são necessários, o uso de estresses abióticos moderados indicam que a irrigação de longo prazo (durante 15 dias antes da colheita) com 5 mM de NaCl pode aumentar o valor nutricional em alface romana, particularmente em relação aos conteúdos de luteína e β -caroteno, sem acarretar em perda na produtividade ou na aparência (Kim et al., 2008). Estresses hídricos moderados também resultam em alterações no acúmulo destes compostos em

brócolis (COGO et al., 2011). Porém, até onde sabemos não há dados relativos a esses efeitos em milho.

Assim, apesar dos estudos apontarem o milho como uma fonte importante de diversos compostos funcionais de metabolismo secundário, os quais promovem benefícios à saúde, por sua ação como antioxidantes, os esforços de biofortificação têm priorizado incrementos de compostos pró-vitamina A através de engenharia metabólica e melhoramento convencional. Embora intervenções agrônômicas com o uso de fertilização e hormônios terem apresentado resultados promissores, especialmente em culturas suscetíveis a estresses abióticos, tais práticas não tem sido especialmente utilizadas com foco na biofortificação de carotenóides em milho.

Vitaminas E e C

Como mostrado na Figura 2, o composto geranilgeranil difosfato pode ser convertido a fitoeno, culminando na síntese de carotenóides (α e β carotenes e xantofilas), ou ser direcionado à rota metabólica de síntese de tocoferóis. Vitamina E é o termo genérico para descrever o grupo de oito antioxidantes lipossolúveis com dois tipos diferentes de estruturas, os tocoferóis e os tocotrienóis (LIU, 2007). A vitamina E, de maneira geral, localiza-se principalmente no gérmen dos cereais integrais (Figura 1), podendo ser extraída com a fração lipídica ou até mesmo perdida durante o processo de refino de óleo (CUKELJ et al., 2010). Neste caso, o processamento do milho é um fator que influencia diretamente nos níveis de vitamina E (FARDET et al., 2008).

No milho os teores de vitamina E variam de 0,3 a 0,7mg 100g⁻¹ para a maioria das variedades, sendo α - e γ -tocoferóis os únicos compostos de vitamina E encontrados em quantidades significativas (0,005% e 0,009% do óleo total, respectivamente). Há relatos de grãos que chegam a 45mg kg⁻¹ em peso seco de tocoferol (PANFILI et al., 2004). Variedades de milho verde apresentam conteúdos de 2,4 a 63,3 μ g de γ -tocoferol g⁻¹ de peso seco. A alta variabilidade observada na regulação da síntese de carotenóides e tocoferóis sugere tratarem-se de alvos promissores para biofortificação (KURILICH e JUVIK, 1999).

O potencial antioxidante da vitamina E é, atualmente, amplamente aceito, sendo responsável pela manutenção da integridade das membranas lipídicas,

além de atuar na reparação do DNA e em outros processos metabólicos. Os tocoferóis e tocotrienóis agem doando o átomo de hidrogênio do seu grupo hidroxila livre para os radicais livres, resultando em uma estabilização por ressonância do radical de vitamina E, prevenindo desta forma a oxidação dos lipídios polinsaturados das membranas celulares (TRABER, 2007). Estudos *in vivo* mostram que a vitamina E melhora vários parâmetros do estresse oxidativo em animais (GOLESTANI et al., 2006) e em humanos (MARTIN et al., 1996).

Outro possível mecanismo utilizado pela vitamina E refere-se à capacidade de manter o selênio no estado reduzido, além de inibir a formação de nitrosaminas, especialmente em pH baixo (SLAVIN, 2003). Em ratos pré-tratados com vitamina E, observou-se um aumento na proteção contra os efeitos da N-nitrosodietilamina, um carcinógeno hepático que causa estresse oxidativo (BANSAL et al., 2005). Outro estudo mostrou redução de 8-epi-prostaglandina F2a no plasma de ratos Zucker obesos, após estes terem recebido uma dieta suplementada com vitamina E (LAIGHT et al., 1999). Além disso, estudo com ratos alimentados com uma dieta de cereais matinais a base de milho mostrou uma biodisponibilidade de vitamina E bastante satisfatória (MITCHELL et al., 1996).

O cDNA codificando para o ácido homogentísico geranylgeranyl transferase (HGGT - homogentisic acid geranylgeranyl transferase), que catalisa uma etapa importante na biossíntese de tocotrienol, também foi isolado de grãos de cevada, trigo e arroz. A expressão transgênica de HGGT de cevada em folhas de *Arabidopsis thaliana* resultou em maior acúmulo de tocotrienóis. Já a indução da expressão de HGGT em grãos de milho resultou em aumento maior de seis vezes no conteúdo de tocotrienóis e tocoferol. Estes resultados mostram a possibilidade de aumentar o conteúdo antioxidante de culturas pela introdução de uma enzima que redireciona o fluxo metabólico (CAHOON et al., 2003).

Outro composto com apelo para biofortificação no milho é o ácido L-ascórbico, precursor de vitamina C. Embora os cereais não sejam considerados uma fonte significativa de ácido ascórbico, por serem alimentos componentes da base da pirâmide alimentar, o incremento nos teores dessa molécula é uma alternativa interessante. Ainda que a localização sub-celular da síntese do ácido L-ascórbico não esteja completamente elucidada, é sabido que deve ocorrer nas mitocôndrias e/ou cloroplastos (BASSAM et al, 2010). Uma vez utilizado, o ácido

L-ascórbico pode ser regenerado para sua forma oxidada em uma reação catalizada pela enzima dehidroascorbato redutase (DHAR). A expressão de DHAR de trigo em tabaco e milho proporcionou aumento de 32 e 100 vezes na expressão de DHAR e 2 a 4 vezes nos níveis de ácido ascórbico, respectivamente. Além disso, os níveis de glutatona, o redutor utilizado pela DHAR também aumentou (CHEN et al, 2003).

Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário das plantas, derivados da rota metabólica do chiquimato, a qual culmina com a síntese de fenilalanina e triptofano. Esses aminoácidos são precursores dos fenilpropanóides e, por fim, de flavonóides, isoflavonas, pterocarpanos, estilbenos, cumarinos, fenolaminas, auronas, chalconas, lignanas e ligninas (TREUTTER, 2010).

Os compostos fenólicos são responsáveis por funções essenciais no crescimento e desenvolvimento das plantas, atuando no mecanismo de defesa contra patógenos, parasitas e predadores, bem como contribuindo para o fenótipo das plantas. Estudos evidenciam ainda sua ação, através da dieta de humanos e animais, na redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas (LIU, 2007). Estes compostos possuem um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxila (Figura 3), responsáveis pelo seu potencial antioxidante (RICE-EVANS et al., 1997). Por outro lado, esses compostos polifenólicos podem igualmente atuar como pró-oxidantes, podendo induzir apoptose, e desta forma prevenir o crescimento de tumores (SCALBERT et al., 2005).

No entanto, seus mecanismos de ação *in vivo* ainda não foram elucidados completamente. Acredita-se que atuem principalmente como sequestradores de radicais livres e/ou quelantes de metais de transição (minerais ou elementos traços). Porém, não se sabe se sua capacidade de capturar radicais livres é suficiente para explicar sua atividade antioxidante *in vivo*, devido a sua disponibilidade relativamente baixa no trato digestivo (0,3 – 2,6%) (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000). É possível que este conceito seja uma simplificação do seu modo de ação. O mais provável é que as células respondam aos polifenóis principalmente por interações diretas com os receptores ou enzimas envolvidas

na transdução de sinal, o que pode resultar em modificação do *status* redox da célula, gerando uma série de reações redox-dependentes (SCALBERT et al., 2005).

Sabe-se que a digestão aumenta a capacidade antioxidante dos cereais e seus produtos (LIYANA-PATHIRANA e SHAHIDI, 2005). As condições ácidas do estômago e a hidrólise enzimática no duodeno são capazes de aumentar a solubilidade e a atividade dos polifenóis presentes no cereal através de uma hidrólise parcial. Assim, a digestão *in vitro* com extratos enzimáticos simulando as condições do trato gastrointestinal mostrou que a quantidade de antioxidantes liberados pela matriz dos cereais para o intestino humano pode ser mais elevada do que o esperado a partir de medições feitas com os extratos aquo-orgânicos usuais (PEREZ-JIMENEZ e SAURA-CALIXTO, 2005). Nagah e Seal (2005) igualmente demonstraram a influência significativa da digestão gastrointestinal *in vitro* no aumento da liberação de antioxidantes dos alimentos à base de cereais integrais. De forma análoga, a digestão do amido e de proteínas pode também aumentar a liberação de polifenóis.

Os ácidos fenólicos ligados covalentemente são ótimos carregadores de radicais livres (SLAVIN, 2003). Células epiteliais do cólon podem absorver estes ácidos fenólicos e adquirir proteção antioxidante, além destes poderem entrar na circulação. Desta forma, alimentos baseados em grãos integrais proporcionariam proteção antioxidante durante um longo período de tempo ao longo do trato digestivo, gerando um ambiente que protegeria o epitélio intestinal de compostos pró-oxidativos. Os ácidos fenólicos apresentam ainda ação anticarcinogênica que envolve a indução dos sistemas de detoxificação, especialmente as reações de conjugação fase II (SLAVIN, 2003). Por exemplo, Wattenberg (1996) classificou os ácidos caféico e ferúlico como agentes anticarcinogênicos que previnem a formação de carcinógenos e bloqueiam sua interação com macromoléculas celulares críticas.

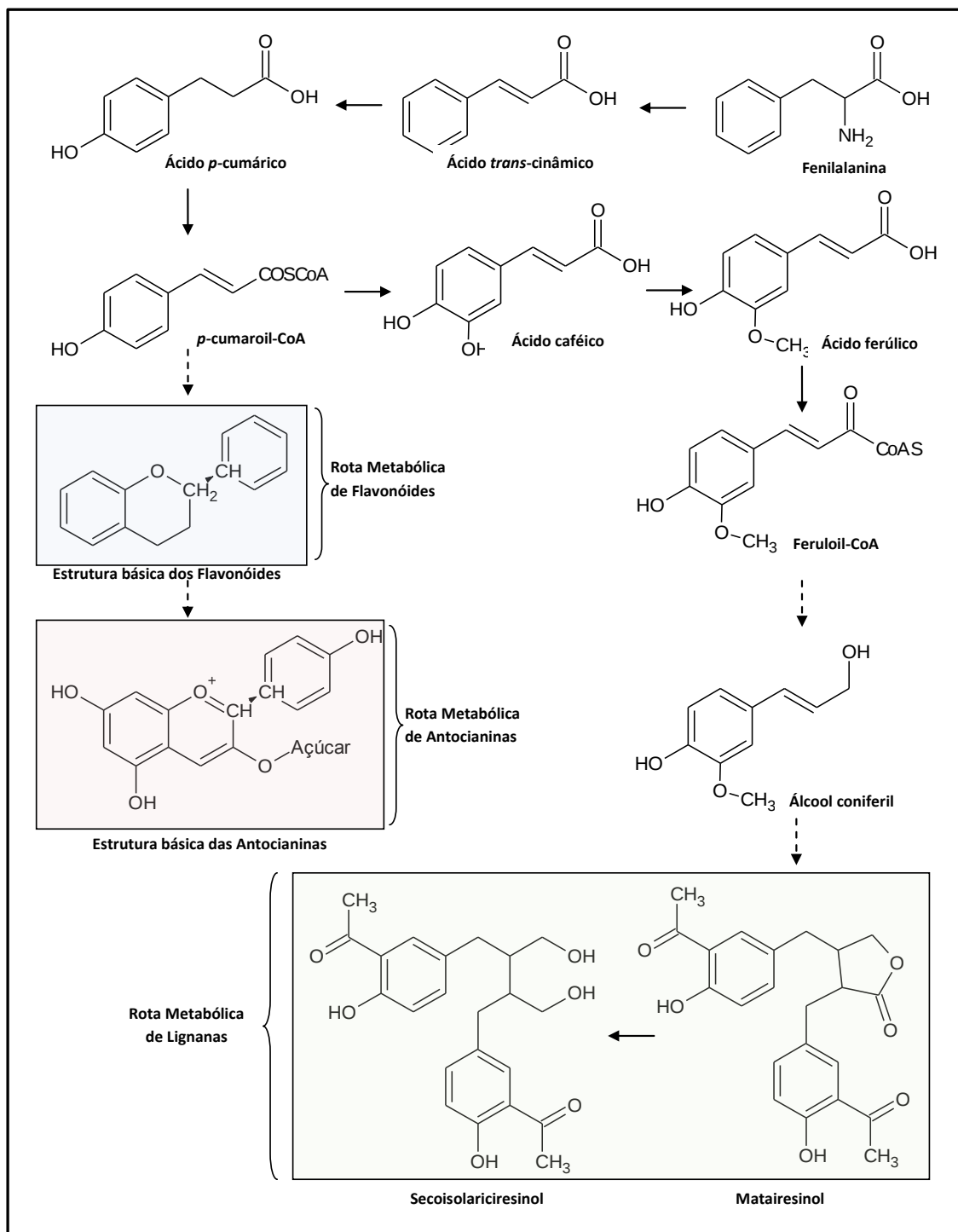


Figura 3. Esquemática da biossíntese dos principais compostos fenólicos encontrados no milho. As lignanas apresentadas exemplificam as duas majoritárias encontradas em cereais. As setas pontilhadas indicam a supressão de etapas dos processos de biossíntese.

Outros mecanismos de ação fisiológica dos grãos integrais estão provavelmente ligados a indução/repressão de genes particulares via sinalização celular através de fatores de transcrição, ativando o Elemento de Resposta a Antioxidante (LEE et al., 2003; NA e SURH, 2006), o que pode levar à síntese de compostos antioxidantes como a glutathiona (GSH), ou enzimas do metabolismo da glutathiona (MYHRSTAD et al., 2002). Além disso, os polifenóis absorvidos são geralmente metabolizados e conjugados (SCALBERT e WILLIAMSON, 2000). Por exemplo, quantidades limitadas de ácidos ferúlico e sináptico são absorvidas e estes se originam apenas de frações livres e solúveis presentes no cereal (KERN et al., 2003). Por outro lado, o ácido ferúlico é esterificado a resíduos de arabinose na parede celular, esta fração ligada do ácido ferúlico e outros polifenólicos pode ser liberada posteriormente no cólon através da fermentação, proporcionando sua ação benéfica de forma localizada (ADOM e LIU, 2002).

O milho, assim como outros cereais, constitui uma boa fonte de polifenóis. A maior parte destes compostos localiza-se no endosperma do grão, sendo as ligninas e lignanas predominantes na parede celular. Adom e Liu (2002) encontraram os maiores teores de compostos fenólicos ($2,12\mu\text{mol g}^{-1}$ de grão, sendo 85% na forma complexada) e atividade antioxidante total ($157\mu\text{mol g}^{-1}$ de grão, sendo 87% na forma complexada). Porém, ao contrário dos demais cereais, a capacidade antioxidante do milho *in vitro* não é significativamente correlacionada com seu conteúdo de polifenóis (FARDET et al., 2008), sendo necessário novos estudos para buscar correlacionar seus efeitos antioxidantes com outros tipos de compostos bioativos presentes. A atividade antioxidante dos cereais integrais é usualmente subestimada *in vitro*, principalmente devido à fração destes compostos associados com fibras, que no caso dos polifenóis do milho chegam a 87% do total (ADOM e LIU, 2002), o que torna estes resultados em apenas uma aproximação do seu real efeito antioxidante *in vivo* devido a fatores como diferenças de solubilidade e/ou biodisponibilidade destes compostos com o trato digestivo e o metabolismo (FARDET et al., 2008). Porém, a fração solúvel em água dos grãos apresenta também grande relevância para a atividade *in vivo*, pela sua maior disponibilidade no trato digestivo, sendo, provavelmente, mais susceptível a efeitos fisiológicos (GALLARDO et al., 2006). Pellegrini et al. (2006) demonstraram que a fração complexada de dezoito cereais apresentavam,

em todos os casos, maiores capacidades antioxidantes que a dos extratos livres (extratos solúveis em solventes orgânicos).

Os compostos fenólicos majoritários no milho são especialmente os ácidos fenólicos como o ácido ferúlico, vanílico, cafeico, siríngico, sinápico e p-cumárico (SOSULSKI et al., 1982). O ácido ferúlico pode existir nos grãos integrais na forma livre, conjugada solúvel e complexada, sendo esta última responsável por até 93% do total deste ácido fenólico. No milho esta relação é de 0,1:1:100 (ADOM e LIU, 2002), podendo chegar a 2-4% em peso seco da casca do grão (HOSNY e ROSAZZA, 1997), ou mais de 26-33g de ácido ferúlico por kg de farelo. Porém, muitos desses estudos têm reportado teores de compostos fenólicos baseados em extrações usando soluções aquosas de metanol, etanol e acetona (VELIOGLU et al., 1998; MILLER et al., 2000; ZIELINSKI e KOZLOWSKA, 2000). Estas metodologias assumem que longos tempos de extração e/ou amostras mais finamente moídas podem maximizar a extração destes compostos dos grãos. No entanto, quando muito extraem os compostos fenólicos solúveis, sendo necessárias técnicas de extração mais exaustivas, como a digestão para extração os fenólicos complexados dos grãos (LIU, 2007).

Como um fator importante a considerar dentro do contexto de biofortificação, o processamento do milho também pode alterar o conteúdo de compostos fenólicos. Dewanto et al. (2002), realizando processamento térmico a 115°C por 25min com a finalidade de enlatamento de milho amarelo comum, observou um aumento na atividade antioxidante de 44% em relação ao milho fresco, de 550% para o conteúdo de ácido ferúlico e de 54% para o conteúdo de fenólicos totais, apesar da perda de 25% da vitamina C. O aumento na concentração de fenólicos totais e na atividade antioxidante foi igualmente relatado por Randhir et al. (2007) durante o processo de esterilização térmica de grãos de milho. Observou-se ainda neste estudo uma inibição da atividade da bactéria *H. pylori* associada à ocorrência de úlcera. Estas mudanças na funcionalidade em decorrência do processamento térmico, segundo os autores, podem ser devido a modificações no conteúdo e perfil dos compostos fenólicos totais pela sua oxidação ou polimerização.

Biopolímeros de lignina, compostos polifenólicos altamente ramificados, constituem 30% da biomassa das plantas e pertencem à classe de polímeros

mais abundante no planeta. As ligninas constituem-se num dos principais componentes dos grãos integrais, correspondendo por 3 a 7% da fração do farelo, tendo sido consideradas por muito tempo como sendo nutricionalmente inertes no trato digestivo. Todavia, sua estrutura polifenólica lhes confere potencial capacidade antioxidante (FARDET et al., 2008).

Lignanas são constituintes secundários de plantas pertencentes ao grupo dos fitoestrogênios. O grupo inclui lariciresinol, pinioresinol e siringaresinol, além de secoisolariciresinol e matairesinol (Figura 3), estas últimas, majoritárias em alimentos de origem vegetal, principalmente em cereais como milho, aveia, trigo e centeio (THOMPSON et al., 1991). Ambas, secoisolariciresinol e matairesinol são convertidas em enterodiol e enterolactona (lignanas presentes em mamíferos) pela microflora intestinal, sendo possível que a perda dos radicais metóxi durante a digestão resulte em redução da capacidade antioxidante observada entre os dois grupos (NIEMEYER e METZLER, 2001). A atividade antioxidante destas lignanas de plantas tem sido observada em diferentes sistemas modelo em meio aquoso e lipídico, apresentando redução da oxidação lipídica (KITTS et al., 1999), embora seus efeitos sejam menos acentuados que as ligninas sobre danos oxidativos genéticos, como mostrado em células humanas do cólon incubadas com enterolactona (POOL-ZOBEL et al., 2000). Begum et al. (2004) mostraram que ratos conseguem metabolizar as ligninas em lignanas. Em outro estudo, ratos diabéticos (nefropatia diabética) receberam injeções administradas por via subcutânea de ácido nordihidroguairético (um antioxidante e inibidor da lipoxigenase da lignina), durante quatro semanas, mostrando menos disfunção renal e estresse oxidativo que os controles (ANJANEYULU e CHOPRA, 2004).

Embora estudos mostrem que ligninas e lignanas têm efeitos antioxidantes *in vivo*, particularmente no cólon, poucos trabalhos têm sido realizados sobre a biodisponibilidade destas no intestino, sendo a maioria dos estudos sobre o seu potencial antioxidante realizados *in vitro*, ou em células isoladas de mamíferos, principalmente sobre a sua influência nos danos em DNA (lesões oxidativas) (COOKE et al., 2002; FARDET et al., 2008).

Buscando incrementos nos níveis de fenólicos em plantas, diversos estudos têm sido realizados relativos à rota metabólica de produção destes compostos. As enzimas chave desta rota são a chalcona sintase (CHS) e

isoflavona sintase (IFS), conhecida como citocromo P450. A partir destas, a diversidade estrutural dos flavonóides é derivada por substituição do esqueleto básico de carbono através de hidroxilação, glicosilação, metilação, acilação, prenilação e polimerização (DIXON e PASINETTI, 2010). Porém, as enzimas que catalizam as reações de substituição são frequentemente codificadas por grandes famílias gênicas com sequências motivo conservadas, o que tem dificultado as tentativas de melhoramento por transgenia. Além disso, muitas destas enzimas são ativas com múltiplas classes de flavonóides (PEEL et al., 2009). A localização subcelular de componentes associados com precursores da fenilalanina também permanece incerta (ZHAO e DIXON, 2010), e pouco é conhecido sobre como são mobilizados para fora do vacúolo (GOMEZ et al., 2009).

Desta forma, apesar do apelo por incremento nos teores de compostos fenólicos em plantas, os relatos na literatura de milho geneticamente modificado para esta característica são escassos. Estudos relativos à utilização de fatores de transcrição para indução de múltiplos genes desta rota metabólica têm gerado os resultados mais promissores (GROTEWOLD et al., 1998; RHEE et al., 2010; HICHRl et al., 2011). A maioria dos genes estruturais codificando enzimas envolvidas na biossíntese de antocianinas parecem ser regulados coordenadamente pelo fator de transcrição bHLH, que inclui B e R, e que interage com o gene MYB C1 (CHANDLER et al., 1989; GOFF et al., 1990). Expressão ectópica em cultivo *in vitro* de R e C1 em células de milho não pigmentadas proporcionou biossíntese e acúmulo de antocianinas devido a expressão coordenada da maioria dos genes estruturais (GROTEWOLD et al., 2000). A expressão de P (um regulador transcricional do tipo MYB) em células de milho também induziu a expressão coordenada de uma série de genes biossintéticos levando ao acúmulo de flavonóides diferentes daqueles regulados por C1/R (BRUCE et al., 2000; GROTEWOLD et al., 2000). Por outro lado, Dias e Grotewold (2003) utilizaram um sistema de cultivo celular de milho para investigar as consequência no acúmulo de metabólitos expressando o fator de transcrição R2R3 MYB (ZmMyb-IF35), onde observaram que ZmMyb-IF35 não induziu o acúmulo de flavonóides, mas induziu o acúmulo de ácidos ferúlico e clorogênico. Em soja, genes da rota metabólica de fenilpropanóides foram ativados pela expressão dos fatores de transcrição C1 e R de milho nas sementes, resultando

em pequeno aumento nos níveis de isoflavonas. Por outro lado, a co-supressão de flavonona 3-hidroxilase para bloquear o braço de síntese de antocianinas nesta rota metabólica, em conjunto com a expressão de C1/R, resultou em altos níveis de isoflavonas (YU et al, 2003), podendo representar uma estratégia promissora para biofortificação de flavonóides em cereais.

Com a mesma finalidade, alguns estudos têm avaliado a diversidade de variedades de milho crioulas buscando por variedades com maiores teores de compostos fenólicos. Del Pozo-Insfran et al. (2006) demonstraram que uma das variedades de milho roxo mexicana apresenta capacidade antioxidante significativamente maior que variedades roxas e brancas americanas, o que foi atribuído a suas antocianinas específicas e/ou sua composição de polifenóis. Lopez-Martinez et al. (2008) avaliando 18 variedades de milhos nativos mexicanos encontraram, da mesma forma, uma variada concentração de compostos fenólicos, antocianinas e ácido ferúlico, identificando três variedades, todas roxas, que se sobressaíram em relação ao conteúdo destes fitoquímicos. Da mesma forma, Pedreschi e Cisneros-Zevallos (2007) observaram maiores teores de antocianinas e compostos fenólicos não antociânicos em uma variedade de milho roxo da região dos Andes Peruanos. Em híbridos de milho, observou-se uma igual variabilidade nos teores de compostos fenólicos, os quais apresentaram moderada digestibilidade no intestino delgado de suínos (KLJAK et al., 2009). Da mesma forma, estratégias de seleção assistida para incrementar os teores de vitamina E em cereais também têm sido utilizadas, baseados na variabilidade natural nos teores de vitamina E neste vegetal (ROCHEFORD et al., 2002).

A fertilização mineral também tem sido utilizada para aumentar o conteúdo de alguns compostos fenólicos, visto que a manutenção de minerais é pré-requisito para prover cofatores para muitas enzimas da rota de fenilpropanóides. Íons de magnésio (Mg^{2+}) e manganês (Mn^{2+}), por exemplo, asseguram o funcionamento de fenilalanina amônia liase (PAL), de CoA-ligases, e de metiltransferases (TREUTTER et al., 2010). Por outro lado, mostrou-se que a deficiência de Ca^{2+} induziu acúmulo de antocianinas em repolho (BASSIM et al., 1975) e fenólicos totais em *Prunus callus* (YURI et al., 1990). Deficiência de fósforo por sua vez aumentou o acúmulo de ácido clorogênico em *Helianthus*

annuus (KOEPE et al., 1976) e de flavononas em frutos de tomate (ZORNOSA et al., 1984). Já a deficiência de boro (B) levou ao acúmulo de compostos fenólicos (SHKOLNIK et al., 1984) em sistema *in vivo* de calos em uvas, e o seu aumento causou declínio de catequinas e proantocianinas, enquanto que o acréscimo de AlCl_3 aumentou os conteúdos destes flavonóides, possivelmente devido ao estresse causado pelo alumínio (FEUCHT et al., 1999). O acúmulo de compostos fenólicos é frequentemente afetado por altos teores de N, como foi descrito para aveia (NORAEK et al. 2003), frutas do alperce (RADI et al., 2003), *Vaccinium myrtillus* (WITZELL et al., 2004), *Pinus elliotti* (SAXON et al., 2004), maçã (LESSER e TREUTTER, 2005) e, recentemente, tabaco (TREUTTER, 2010). Por outro lado, em morangos parece que a fertilização excessiva com N promove o acúmulo de grandes quantidades de fenólicos (HAYNES e GOH, 1987). Resultados conflitantes foram apresentados por Anttonen et al. (2006) que mostrou redução na concentração de fenólicos nesta cultura após aumento de fertilização com N. Em *Solanum carolinense* foi observado aumento de fenólicos com o aumento da demanda de N. Surpreendentemente, em trigo (*Triticum aestivum*) houve aumento de ácidos fenólicos solúveis na palha mas redução no grão quando submetido a doses elevadas de N (TREUTTER, 2010).

O incremento em teores de compostos fenólicos também pode ser obtido por meio do acréscimo de Se. Plantas de manjeriço tratadas com $10\text{-}50\text{mg dm}^{-3}$ de Se e $3\text{-}20\text{mg dm}^{-3}$ de Se aumentaram os teores de antocianinas e compostos fenólicos totais, respectivamente (HAWRYLAK-NOWAK, 2008). Recente estudo também mostrou que a fertilização com K pode aumentar compostos como o ácido ascórbico, beta-caroteno em diversas culturas (LESTER, 2010). Fertilização com S em brócolis influenciou conteúdo de flavonóides e derivados de ácido hidroxicinâmico (derivados de ácido sinápico e ferúlico + derivados de ácido cafeoil-quinico) (VALLEJO et al., 2003).

PERSPECTIVAS

O milho, além de ser a base da alimentação da população em muitos países, é ainda utilizado na produção de centenas de produtos derivados. Sua importância na alimentação humana e na ração animal e, portanto em toda cadeia

alimentar, é indiscutível, tornando-o uma cultura alvo nos esforços atuais de biofortificação. Pelos estudos citados, percebe-se que o milho é considerado uma boa fonte de compostos funcionais antioxidantes, com altas concentrações de xantofilas, principalmente luteína e zeaxantina, relacionadas à prevenção de doenças da retina, bem como compostos fenólicos (em especial o ácido ferúlico), e de diversos outros compostos como a betaína, a colina, e as lignanas, todos com importante atuação no sistema de defesa antioxidante do corpo e, até o momento, grandemente negligenciados. Além disso, apresenta teores consideráveis de minerais traço importantes como o Se e de aminoácidos sulfurados. Por outro lado, deficiências como de alguns aminoácidos essenciais e de carotenóides precursores de vitamina A, e a indisponibilidade de alguns compostos nutricionais como ferro e zinco, tem sido exaustivamente estudados no intuito de biofortificar ainda mais a cultura.

A fortificação e suplementação exógenas, principalmente de minerais e vitaminas, como por exemplo, a adição de ferro e ácido fólico a farinha de milho, têm sido extensivamente utilizadas em muitos países, no entanto, são abordagens caras e de difícil acesso, principalmente em países em desenvolvimento. Por outro lado, a fortificação endógena, baseada em técnicas de fertilização, tem se mostrado mais viável economicamente e bastante eficaz em aumentar não só a produtividade, mas também as concentrações de minerais em grãos (YILMAZ et al., 1997). No entanto, apesar do grande número de pesquisas sobre o processo envolvido no incremento da qualidade dos alimentos, a influência da fertilização nestes parâmetros e os mecanismos pelos quais acontecem continua incerto e controverso. Além disso, esses efeitos são dependentes da cultura, das doses aplicadas e da fonte de fertilizante utilizada (ZHAO et al, 2004).

Outro gargalo destas intervenções agronômicas são o custo e o impacto ambiental destes fertilizantes, uma vez que grande parte destes é lixiviada, acabando por contaminar o solo e os lençóis freáticos (SORS et al., 2005). Portanto, são fundamentais novas investigações de fontes alternativas e naturais de fertilizantes, além de formas de aplicação capazes de lidar com o gradual empobrecimento dos solos, maximizando a absorção pelas plantas e evitando contaminações (CAKMAK, 2008).

Da mesma forma, a mencionada variabilidade genética da concentração de nutrientes nos diferentes germoplasmas de milho torna o melhoramento convencional bastante explorado, apesar do fato de ser uma técnica de longo prazo. O uso de técnicas de transgenia tem igualmente sido extensivamente estudado, obtendo resultados promissores, porém carecendo muitas vezes de uma preocupação maior em correlacionar estes resultados com dados de viabilidade técnica e econômica, como a influência em parâmetros de produtividade, tornando difícil avaliar os ganhos reais obtidos (ABBATE et al. 1998; CALDERINI et al. 2006). Além disso, a interação com outros parâmetros de qualidade desses produtos devido às múltiplas interrelações existentes tornam-se de difícil avaliação.

No entanto, o rápido avanço de novas abordagens que vem sendo desenvolvidas na bioquímica e na biologia molecular, utilizando técnicas como a transcriptômica e a metabolômica, abrem a possibilidade de realização de novos estudos abordando os mecanismos que regulam a síntese de compostos nutricionais e funcionais. Estas novas técnicas possibilitam investigar formas de modificar o metabolismo, incrementando o conteúdo destes compostos no milho, ou aumentando sua biodisponibilidade, além de possibilitar a verificação de diferentes rotas metabólicas afetadas por eles (FARDET et al., 2008; REZZI et al., 2007). Neste âmbito, a combinação de diferentes técnicas de biofortificação é possivelmente a estratégia que gerará melhores resultados (CHRISTOU e TWYMAN, 2004; ALURU et al., 2008; NAQVI et al., 2009).

O foco, presente e futuro, no uso de espécies vegetais como biomassa para produção de biocombustíveis e biosintéticos, para produção de terapêuticos e produtos industriais, bem como na agregação de valor através da melhoria da nutrição e funcionalidade dos alimentos é uma perspectiva bastante concreta para o milho. Do ponto de vista do consumidor, o foco sobre incrementos em nutrientes e compostos funcionais que proporcionem melhoria da nutrição e saúde, assume grande relevância. Desenvolvimento de plantas com essas características melhoradas envolve a superação de uma série de desafios, incluindo técnicos e regulamentares e, principalmente, de questões inerentes à percepção e às complexas modificações que poderão ocorrer (NEWELL-McGLOUGHLIN, 2008).

3. HIPÓTESE

A água de xisto, por sua composição mineral e a presença de diversos compostos orgânicos em sua matriz, possibilita melhora da nutrição vegetal e estímulo do metabolismo da planta, com conseqüente aumento em parâmetros de crescimento e de qualidade, tanto nutricional quanto funcional.

4. OBJETIVO

Caracterizar físico-quimicamente a água proveniente do processo de pirólise do folhelho pirobetuminoso (água de xisto) e avaliar sua influência no crescimento, produtividade e qualidade de culturas agrícolas por meio de aplicações foliares.

4.1. Objetivos específicos

- Caracterizar físico-quimicamente a água de xisto;
- Avaliar a segurança do uso da água de xisto na produção de alimentos;
- Avaliar a influência da água de xisto na nutrição e produtividade de alface por meio de aplicações foliares;
- Avaliar a influência da água de xisto no crescimento das plantas e na produtividade e qualidade de grãos de milho por meio de aplicações foliares;
- Adaptar e otimizar metodologia para isolamento de RNA de grãos de milho;
- Avaliar a influência da água de xisto enriquecida com micronutrientes no crescimento das plantas e na produtividade e qualidade de grãos de milho por meio de aplicações foliares.

5. **ARTIGO 1 – “Physical-chemical characterisation of water from the pyrobituminous shale pyrolysis process and evaluation of its potential use in agriculture”**

Physical-chemical characterisation of water from the pyrobituminous shale pyrolysis process and evaluation of its potential use in agriculture

Rafael da Silva Messias^{a*}, Carlos Augusto Posser Silveira^a, Luis Henrique Gularte Ferreira^b, Cesar Valmor Rombaldi^c, Clenio Nailto Pillon^a

^a Embrapa Clima Temperado, Rodovia BR 396, Km 78, Caixa Postal 403, CEP 96001-970, Pelotas - Rio Grande do Sul, Brasil. rafael.embrapa@yahoo.com.br; augusto.posser@cpact.embrapa.br; clenio.pillon@cpact.embrapa.br.

^b Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Avenida Oswaldo Aranha 540, Bairro Juventude da Enologia, CEP 95700000, Bento Gonçalves – Rio Grande do Sul, Brasil. lhgferreira@gmail.com.

^c Universidade Federal de Pelotas, Campus universitário S/N; Cx Postal 354; 96010-900; Pelotas – Rio Grande do Sul, Brasil. cesarvrf@ufpel.edu.br.

***Correspondence author:**

Rafael da Silva Messias

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado,

Rodovia BR 396, Km 78 Caixa Postal 403, CEP 96001-970, Pelotas – RS; Brasil.

Phone: Tel. +55-53- 32758253, Fax +55-53- 3275-8221

***Rafael.embrapa@yahoo.com.br**

Abstract

Pyrolysis of pyrobituminous shale to extract products such as fuel oil and gas generates by-products whose compositions suggest their potential usefulness. One of these by-products is the water that is extracted from shale rock as a result of the high pressures and temperatures involved in the pyrolysis process (shale water). The chemical characterisation of shale water shows a great variety of organic compounds, mineral nutrients and trace elements. This complex matrix is of interest for its potential use in plant nutrition. Increases in yield and in certain nutrients observed in lettuce treated with different doses of shale water delivered as foliar fertiliser, as well as the absence of toxic contaminants, suggest that shale water could be used in agriculture as an appropriate alternative to traditional fertilisers from both an environmental and a food safety standpoint.

Keywords: shale water; foliar fertiliser; inorganic composition; organic composition.

1 Introduction

World reserves of pyrobituminous shale are considered to be an alternative source of oil, given the shortage of global oil reserves. Brazil has the second largest reserve of shale behind the United States, followed by Congo, Jordan and Morocco (Dyni, 2006). The geological Irati Formation is the main reserve currently being exploited in Brazil (Figure 1), with Petrosix[®] technology enabling the extraction of petroleum derivatives from shale (United States Patent 4253938).



Figure 1. Map of Brazil with an enlarged inset of the Irati Formation. The white ball indicates São Mateus do Sul in the Brazilian state of Paraná, the city where the Petrobras SIX - Shale Industrialization is located. Adapted from Padula (1969).

Petrobras processes about 7,800 tons of shale daily to generate fuel oil, liquefied petroleum gas (LPG), fuel gas, shale naphtha and sulphur (S), generating a huge number of by-products (Nicolini et al., 2011; Petrobras, 2011). This includes approximately $300 \text{ m}^3 \text{ day}^{-1}$ of a water that is extracted from shale rock using retorting technology, which uses extremely hot gas for pyrolysis process. Commonly called shale water (SW), this by-

product has potential for use as feedstock in the production of liquid fertilisers. Its wide range of dissolved and suspended (emulsified) organic compounds, in addition to macronutrients, micronutrients and other trace elements from fossilised algae during the Permian Period, have attracted interest because of the importance of these substances in plant nutrition (Pereira and Mello, 2002).

Historically, agricultural production has been focused on the use of fertilisers that are based primarily on macronutrients (nitrogen – N; phosphorus – P; and potassium - K) to increase productivity. Improvements in production processes have allowed these fertilisers to become increasingly free of trace elements and micronutrients, limiting the demand for a wider range of these compounds and causing soil depletion as a result of their intensive use and the high rate of extraction of these nutrients by crops (Lal, 2009; Raut et al., 2010).

Thus, the search for supplementary fertilisers with a better balance for use in different agricultural systems has been the subject of several studies (Gómez-Galera et al., 2010; Zhao et al., 2008). In this context, foliar fertilisation has been one of the most appropriate additional fertilisation methods to deliver macro- and micronutrients and other beneficial substances to plants. This practice has shown positive effects on productivity and resistance to diseases and pests as well as an increase in the quality of different crops. In addition, a foliar spray that is properly formulated can increase nutrient uptake from the soil and stimulate plants to translocate more sugars and other exudates (Tariq et al., 2007; Yaseen et al., 2004).

Currently, the importance of many trace elements for plant and animal nutrition is well known. The essential trace elements are those needed in small quantities to maintain the life processes of plants and/or animals, including humans. For most essential trace elements, low uptake/intake causes deficiency, and high uptake/intake causes toxicity

(Miller et al., 1991). Nickel (Ni), for instance, was one of the last trace elements whose essentiality was proven due to its participation in urease, an important enzyme for the mobilisation of nitrogenous compounds during seed germination (Brown et al., 1987). Selenium (Se) was also recently proven to be important for the development of plants (Sepänen et al., 2003) and to human health (Navarro-Alarcon and Cabrera-Vique, 2008), although it is not yet considered an essential nutrient, just a beneficial one. However, very little is known about the function of several other trace elements because of the difficulty of proving their essentiality: they are needed in only very small amounts by plants (Marschner, 2003).

Therefore, knowledge of the constituents of SW, as well as their dynamics and concentrations, is essential to informing decisions concerning the use of this by-product. This is especially true as a result of the presence of trace elements and organic compounds in SW, which can be both agronomically beneficial and environmentally harmful. Thus, SW will require detailed studies to ensure the safety of its use in food production. In this context, lettuce (*Lactuca sativa* L.), the leafy vegetable with the highest commercial value of all those grown in Brazil, is also an excellent biological indicator of food quality, because it is usually eaten 'fresh', and environmental quality, because of its high susceptibility to contaminants (Lopes et al., 2005). Furthermore, lettuce has a short cropping cycle and has high rates of nutrient absorption; as a consequence, soils with low nutrient capacities cannot supply the nutritional demands of this plant. In this context, the application of foliar fertilisers represents an interesting fertilisation alternative.

Based on the above information, this study aimed to characterise SW, physically and chemically, through data systematisation obtained in different sampling periods and to evaluate its potential and safety for agricultural foliar fertilisation in lettuce crops.

2 Materials and Methods

2.1 Sampling

Shale water was sampled from SIX – Shale Industrialization, located in São Mateus do Sul (PR), between December 2005 and April 2006. Aiming to obtain a better representation of any possible variability in the composition of the shale rock and the industrial process itself, we chose a methodology for collecting that sampled 200 L per day (divided into subsamples of 50 L at 8:00, 13:00, 18:00 and 23:00 h) from Monday to Friday in the third week of each month during these five months. From each daily sample of 200 L, aliquots of 40 L were removed immediately after homogenisation, for a total of 200 L per week. Of these 200 L, 3 L were withdrawn, stored at $\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and protected from light until analysis. For the characterisation of organic compounds, sampling occurred during four months. The SW sample used in the experiment with lettuce culture was characterised separately.

2.2 Experimental design

The experiment with lettuce was executed at Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil, in a greenhouse from October to December 2008. The lettuce seedlings (Vera cultivar) produced were transplanted after 21 days to plastic pots with a 1.5 L volume in a substrate consisting of a mixture of soil and vermiculite (25%). The soil used was an Ultisol that was sifted and corrected with N, P and K corresponding to 66% of the recommendation for this culture (CQFS, 2004). The design used randomised blocks with four repetitions with 8 plants per plot.

Irrigation was performed twice daily, keeping the soil constantly moist in all treatments. The factor treatment tested was an equivalent dose of SW, as shown in Table 1, with the following description: control – without the application of SW; SW6 – 6.0 L ha^{-1} SW; SW18 – 18 L ha^{-1} SW; SW54 – 54 L ha^{-1} SW; and As – positive control with 18 L ha^{-1}

¹ of sodium arsenate at an arsenium (As) concentration ten-fold higher than that found in the SW, according to the average presented in Table 1. When the spray liquid was prepared (flow rate of 300 L ha⁻¹), all treatments were supplied with 1% mineral oil (Oppa ® BR-CE) to improve the foliar adhesion of the formulations. When necessary, the pH of the formulations was adjusted to a physiological pH of 6.0 with diluted solutions of HCl or NaOH. The applications of the formulations were performed with the use of a pressurised sprayer (CO₂) every ten days starting two weeks after transplanting and ending one week before harvest. Three partial applications of equal parts from the total dose were performed during the crop cycle according to the proposed treatments. The harvest of the lettuce was performed 52 days after transplanting, cutting the 8 plants in each plot at ground level. For the analysis of organic compounds, subsamples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until the time of analysis.

2.3 Analytical Methods and Statistical Analyses

Analyses of the pH, total suspended and dissolved solids, electrical conductivity and density were performed according to standard methods for the examination of water and wastewater (Eaton et al., 2005).

After digestion, the total inorganic compounds were determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) and mass spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-MS) (Eaton et al., 2005). The determination of mercury (Hg) concentration was performed by cold vapour atomic absorption spectrometry (CV-AAS) (USEPA, 1991). The quantification of volatile and semi-volatile organic compounds was performed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The determination of total cyanide (CN⁻) was carried out after distillation using a selective electrode for CN⁻ (Eaton et al., 2005). For the analysis of SW characterisation results, the

percentage of samples with values below the detection limit (DL) was calculated. For the remainder of the samples (those that had values above the DL), the confidence interval was estimated.

After evaluation of the fresh weight, the dry weights of lettuce plants were determined using a forced air oven at 65 °C. The results were subjected to an analysis of variance by Tukey's test with a confidence level of 5% using SAS software (2004).

3 Results and Discussion

3.1 Physical-chemical characterisation of shale water

Shale water has an alkaline pH of 9.43 ± 1.35 (mean $\pm$ standard deviation) and presents a translucent, light-yellow colour. The levels of the total dissolved and suspended solids are 2.45 ± 0.15 and 0.52 ± 0.01 g 100 mL⁻¹, respectively. The electrical conductivity value is 18.0 ± 15.3 S m⁻¹, while the density is 0.98 ± 0.08 g cm⁻³. The results presented above enable the use of SW in relation to the salinity and technical requirements of foliar application. As expected, despite the fact that SW extraction remains closed during the entire process, we observed variations in the concentrations of the compounds present in SW between the different collection timepoints (Table 1). These differences occur mainly because of natural variations inherent in the rock composition and the consequent necessary adjustments in the extraction process.

Table 1. The sample size (n), confidence interval for the average values greater than the detection limit (DL) and relative frequencies of the values below the DL for the inorganic elements quantified in SW sampling over six months in addition to the values for the SW used in the lettuce agronomic experiment.

Element	Values confidence interval > DL		Values frequency < DL		SW October/2008 ^b
	n	Average $\pm$ sd ^a	DL	Relative frequency	
		mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	%	mg L ⁻¹
As	25	1.45 $\pm$ 0.22	...	0	1.19
Cl	25	1.62 $\pm$ 0.49	...	0	0.30
Na	25	5.96 $\pm$ 2.76	...	0	2.74
S	25	311.70 $\pm$ 241.24	...	0	595.90
Se	25	1.32 $\pm$ 0.32	...	0	0.98
Si	17	1.64 $\pm$ 1.99	...	0	n.a.
		µg L ⁻¹	µg L ⁻¹	%	µg L ⁻¹
Ag	4	0.08 $\pm$ 0.11	0.007	84	n.a.
Al	24	80.48 $\pm$ 62.61	...	5	n.a.
B	25	302.86 $\pm$ 58.72	...	0	235.60
Ba	25	33.70 $\pm$ 11.82	...	0	n.a.
Ca	25	437.47 $\pm$ 306.19	...	0	653.20
Cd	1	0.06	0.05	96	n.d. ^c (<0.05)
Co	8	0.14 $\pm$ 0.05	0.03	68	n.d. (<0.03)
Cr	8	3.83 $\pm$ 2.83	1.0	68	n.d. (<1.0)
Cu	17	38.27 $\pm$ 30.43	0.07	32	17.70
Fe	25	176.55 $\pm$ 65.82	...	0	130.00
Hg	8	8.59 $\pm$ 8.40	0.05	68	12.00
K	25	393.16 $\pm$ 107.09	...	0	100.10
Li	4	0.78 $\pm$ 0.18	0.2	84	n.a.
Mg	25	343.32 $\pm$ 204.68	...	0	158.80
Mn	25	5.19 $\pm$ 1.56	...	0	3.90
Mo	0	...	0.5	100	n.a.

Ni	14	1.07 ± 0.42	0.04	56	n.d. (<0.5)
P	16	68.53 ± 47.68	25.0	36	n.d. (<25.0)
Pb	17	1.19 ± 0.39	0.5	32	n.d. (<0.5)
Sn	0	...	50.0	100	n.a.
Te	7	1.82 ± 0.61	1.0	72	n.a.
Ti	7	29.69 ± 47.59	2.0	72	n.a.
V	16	0.78 ± 0.51	0.08	36	n.a.
Zn	25	30.10 ± 12.58	...	0	17.10

^a Standard deviation.

^b Chemical composition of SW used in lettuce experiment.

^c n.d. – not detected; n.a. - not analysed.

Some chemical elements of agronomic interest that were found at a greater concentration in the SW also exhibited the greatest variation between sampling, such as silicon (Si) and S. The latter varied between 250 and 500 mg L⁻¹ (Table 1). Generally, the needs of S for most crops are supplied by fertiliser S carriers, such as ammonium sulphate (24% S), potassium sulphate (16% S), superphosphate (12% S) and gypsum (15 to 18% S), which are the most common sources of this nutrient. However, in recent times, with the more intensive use of soil and fertiliser formulas that are more concentrated and pure, without S, the response to this element in plant nutrition tends to increase when using additional fertiliser. Although Si is the second most abundant element in the Earth's crust, it is quickly depleted in soils with intensive cultivation. This mineral has been shown to have beneficial effects in plants, including resistance to biotic and abiotic stresses, due to its accumulation below the cuticle, which decreases damage from fungi and insects as well as water loss by reducing the opening of the stomata. Silicon therefore promotes increases in productivity, especially in grasses (Savant et al., 1997). Recently, this element has been the focus of several studies aiming at its foliar application (Rezende et al., 2009). Despite SW presenting with relatively low concentrations of Si (Table 1), with a maximum value

of 0.035%, it could still exert a beneficial effect when delivered as a foliar fertiliser, as was observed with the foliar application of a Si product supplier using 0.001 to 0.2% Si in its formula (Goodwin, 2010).

Considerable amounts of sodium (Na) and chlorine (Cl) (the latter an essential micronutrient in the photosynthesis process) were also found in SW (Table 1). The concentration levels of these minerals in plants determines whether it has a beneficial or toxic effect as the limit of tolerance is dependent on the concentration of the salt in the solution, the exposure time and the plant developmental stage. The toxic effect of these ions is related to the osmotic effect, leading to a water stress condition in plants (Cruz et al., 2006). However, in optimal doses, moderate water stress has been proven to improve nutritional and functional value by increasing the vitamin C content and the antioxidant activity in broccoli (Cogo et al., 2011) and the β -carotene and lutein content in romaine lettuce without productivity losses (Kim et al., 2008). Moreover, the function of Na in plants is similar to that of K, which may replace it for certain metabolic and osmotic functions and acts as an activator of a wide range of enzymes and ATPases (responsible for transport across the membrane). Sodium may also facilitate the absorption of N, P and K in some plants (Marschner, 2003).

Selenium is another element of agronomic interest that is found in SW. Studies in plants suggests that this element has antioxidant properties that activate protective mechanisms that can alleviate oxidative stress in chloroplasts (Seppänen et al., 2003). There is also evidence that trace amounts of Se can increase the growth of some plant species (Xue and Hartikainen, 2000). According to Strawn et al. (2002), soils with shale and its derivatives usually contain high Se concentrations, making SW a potential supplier of this element. For human health, Se is also considered essential because the glutathione peroxidase enzyme is considered to be a structure that plays a vital role against oxidative

damage in cells (WHO, 1998). Furthermore, studies have shown Se importance in several biological functions, such as the functioning of the thyroid gland and the cardiovascular system, in preventing the formation of free radicals and improving immune response during infection (Navarro-Alarcon and Cabrera-Vique, 2008).

The other mineral elements in SW, such as the essential micronutrients boron, copper (Cu), iron (Fe), zinc (Zn) and several others, are in low concentrations (Table 1) but are quite high in number, which could explain the effect of SW on nutrition and productivity in a previous study with pepper and tomato (Pereira and Mello, 2002).

Among the trace elements present in SW, some are considered potentially toxic (such as lead – Pb; cadmium – Cd; Hg; As; aluminium, lithium and tin), although many of these may exert essential functions at low levels (WHO, 1998). New studies continue to broaden knowledge regarding these trace elements in the diet, such as the role of As (widely used in pesticides, herbicides and desiccants) as an additive in poultry and pig feed, where it increases weight gain and protects against enteric diseases, and its physiological action in the formation of various metabolites of methionine, including taurine and polyamines (Uthus, 1992). However, in plants, due to chemical similarities between As and P, these elements can compete with each other, causing a deficiency of P and interfering with physiological and biochemical processes related to growth (Otte and Ernst, 1994).

In SW, the predominant form of As is arsenate, AS (V) (corresponding to 90.6% of the total As measured). AS (V) is approximately sixty times less toxic than arsenite, As (III) (Duarte, 2006), which corresponds to 0.63% of the total As measured. In SW, the organic forms of As constitute the remaining 8.8% of the total As measured. In rice, while the applied arsenate did not affect the plants, arsenite was shown to be phytotoxic (Patra et al., 2004). According to the EU Commission legislation for fertiliser and organic substrates

used in agriculture (EU Commission, 2001), as well as Brazilian legislation (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006), the levels of these trace elements in SW are below the permissible limits.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are potentially toxic to the environment, resulting in absorption and accumulation in the food chain (Nicolini et al., 2011). The analyses of PAHs (Benz[a]pyrene, Benz[b]fluoranthene, Benz[k]Fluorene, Chrysene, Acenaphthylene, Fluorine, Anthracene, Benz[g,h,i]perylene, Phenanthrene, Dibenz[a,h]anthracene, Indeno[1,2,3-cd]pyrene, Pyrene, Anthracene, Fluoranthene, Naphthalene and Benz[a]anthracene) performed in the SW samples did not detect the presence of any of the compounds analysed (limit detection of 0.005 mg L^{-1}). The concentrations of the other organic compounds analysed in the SW are shown in Table 2.

Table 2. Organic compounds in SW sampling during four months of the study.

Compound	Average (mg L ⁻¹) ± s.d. ^a	Quantification Limit
Sulphate	162.2 ± 33.9	<1.0 mg L ⁻¹
Sulfide	n.d. ^b	
Nitrate	n.d.	
Clhoride	n.d.	
Estireno	n.d.	
Total Cresols	133.82 ± 20.93	<0.005 mg L ⁻¹
Cyanide	0.36 ± 0.07	
BTEX		
Benzene	n.d.	<0.001 mg L ⁻¹
Toluene	0.125 ± 0.17	
Etilbenzene	0.010 ± 0.009	
o-Xilene	0.004 ± 0.003	
m,p-Xilene	0.009 ± 0.002	
Fenóis		

2,4-Dimetilphenol	29.33 ± 7.14	
Phenol	66.70 ± 5.27	
2-Metilphenol	45.96 ± 5.35	
4-Metilphenol	91.89 ± 11.46	
Pentaclorophenol	n.d.	
2-Metil-4,6 dinitrofenol	n.d.	
2-Clorofenol	n.d.	<0.1 mg L ⁻¹
2,4-Diclorofenol	n.d.	
2,6-Diclorofenol	n.d.	
4-Cloro-3-Metilfenol	n.d.	
2,4,6-Triclorofenol	n.d.	
2,4,5-Triclorofenol	n.d.	
2,3,4,6-Tetraclorofenol	n.d.	
2-Nitrofenol	n.d.	
4-Nitrofenol	n.d.	

^aAverage and standard deviation of 18 samples.

^bn.d.- not detected.

Among the aromatic compounds tested, trace levels of benzene were detected, as were toluene, ethylbenzene, o-xylene and p-xylene as well as simple phenols, 2,4-dimethylphenol, and cresols. Cresols are methylated phenolic compounds that occur naturally in the environment; they are found in many foods and are also produced by microorganisms in the soil and water that degrade organic matter (Dolatto et al., 2010). Cresols can exist in three forms of chemical structures that are very similar to each other: o-cresol (2-methylphenol), m-cresol (3-methylphenol) and p-cresol (4-methylphenol). These forms can be found separated or combined (ATSDR, 2008) and could act as natural organic complexes that assist in the absorption of the nutrients present in SW if applied to plants as fertiliser (Botero et al., 2009; Mortvedt, 2001). A recent study by our research group tested the persistence of these compounds in soil and found that they are quickly

degraded or remain as non-extractable residues; they therefore do not present a risk of groundwater contamination (Dolatto et al., 2010). Chlorinated phenols and nitrogenous phenols, which are considered the most pollutants and toxic aromatic phenolic compounds (Barreto-Rodrigues et al., 2007), were not detected during the characterisation (Table 2).

The SW samples analysed had an average content of 0.36 mg of $\text{CN}^- \text{L}^{-1}$ SW. Cyanide toxicity is related to its ability to inhibit metabolism and be a chemical asphyxiant, preventing tissues from exchanging O_2 . However, due to technical and economic aspects, foliar fertilisers are usually diluted to ratios of 1:100 to 1:400 before delivery to plants, causing the level of CN^- to be much lower. Moreover, part of the fertiliser will not be absorbed, and the portion absorbed cannot be translocated to the food product. Most foods, especially those of vegetable origin, naturally contain trace amounts of CN^- , which are partially removed during cooking (Ortega-Flores, 1991) and the acceptable daily intake for men is up to 0.5 mg kg^{-1} body mass (Moore, 1990).

3.2 Evaluation of foliar fertilisation with SW on yield and food safety in lettuce

The evaluation of the agronomic effectiveness and safety of SW in food production was performed by foliar spraying in increasing doses of SW (0, 6, 18 and 54 L ha^{-1}). This evaluation included high doses from the standpoint of technical and economic feasibility, but these tests were important from the standpoint of environmental and food safety. Despite the presence of some potentially toxic trace elements in the SW, the analysis of heavy metals (Hg, As, Cd, Chrome - Cr, Ni, Pb) in the lettuce leaf samples did not detect their presence at any of the doses tested. Only As accumulation was detected in the negative control (1.3 mg kg^{-1}), where salt containing this metal was sprayed in a dosage ten times higher than that found in the SW. This result suggests that the levels and/or bioavailability of these elements are very low in SW. Also, symptoms of toxicity from Na

and Cl, such as chlorosis and burns on the edges of older leaves, were not observed in this study for any treatment.

The analysis of the major organic compounds in the SW matrix (phenol, 2-methylphenol, 4-methylphenol and 2,4-dimethylphenol) also failed to detect the presence of these compounds in the lettuce leaves (limit of quantification $<200 \text{ mg kg}^{-1}$). Likewise, we failed to detect the presence of CN^- (limit of quantification $<0.5 \text{ mg kg}^{-1}$). These data indicate that SW as a foliar fertiliser, at the doses tested, does not affect the safety of lettuce as food.

Table 3. Mineral concentration in lettuce leaf samples treated with different SW doses.

Treatments	Control	SW6	SW18	SW54	As	REF. ^a
----- Macronutrients (g kg^{-1}) -----						
N	26.8 ab ^b	25.2 abc	24.5 c	25.1 cb	27.1 a	30-50
P	5.4 a	4.4 ab	4.1 bc	4.5 ab	3.3 c	4-6
K	30.7 b	30.3 b	53.1 a	28.7 b	24.0 b	50-80
Ca	9.70 a	8.50 a	8.80 a	8.80 a	9.0 a	15-25
Mg	4.80 a	5.30 a	5.50 a	5.30 a	5.5 a	4-6
S	1.32 ab	1.39 ab	1.66 a	1.08 ab	0.96 b	1.5-2.5
----- Micronutrients (mg kg^{-1}) -----						
Cu	8.85 b	11.23 a	8.55 b	8.22 b	8.26 b	7-20
Zn	42.50 ab	39.00 b	48.75 a	41.67 ab	39.75 ab	30-100
Fe	142.72 b	200.67 a	152.25 b	78.67 c	86.67 c	50-150
Mn	80.33 b	49.67 bc	163.50 a	64.25 b	21.33 c	30-150

^a Reference values for macro and micronutrients in lettuce leafs. Fonte: CQFS, 2004.

^b Average of four replicates for each treatment evaluate after total SW total doses proposed applied. Equal letters for each variable indicate no significance at 5% level of confidence by Tukey's test.

The agronomic evaluation of the lettuce showed an increase in yield when applying doses of SW (6, 18 and 54 L ha^{-1} SW) as compared to untreated controls (Figure 2). The

fresh weight was significantly higher in the treatment with an equivalent dose of 6L ha^{-1} SW, and the dry weight was significantly higher in both treatments (6 and 18Lha^{-1} SW). However, the plants appeared to decrease their dry matter accumulation with the 54L ha^{-1} SW treatment, suggesting a possible inhibitory effect that was concurrent with the decrease in the absorption and/or soil uptake of Fe, and also a declining trend of K, Mn and Cu, comparing to SW6 and SW18 treatments (Table 3). Similarly, the application of sodium arsenate reduced the accumulation of nutrients in the leaves, especially P, S and Mn, as compared to both treatments with higher dry matter accumulation (the SW6 and SW18 treatments). Consequently, the concentrations of these elements on lettuce plants treated with arsenate were below the range of values suggested for the development of lettuce, which significantly affected the yield of this treatment as compared to treatments with SW application. The mechanism by which high doses of As cause a phytotoxic effect is possibly the similarity in the chemical structure of phosphate and arsenate, cited below and observed by the low accumulation of P in this treatment. The arsenate accumulated in this treatment could be transported across the plasma membrane via phosphate co-transport systems and may replace phosphate in the ATP molecule, resulting in an unstable ADP-As, leading to the disruption of energy flow in cells (Meharg, 1994). It is also relevant to note that the source of arsenic used in this study was sodium arsenate, and despite leaves from this treatment remained with similar percentage of water than the other treatments, the negative effects observed could, at least in part, be a consequence of osmotic stress caused by sodium.

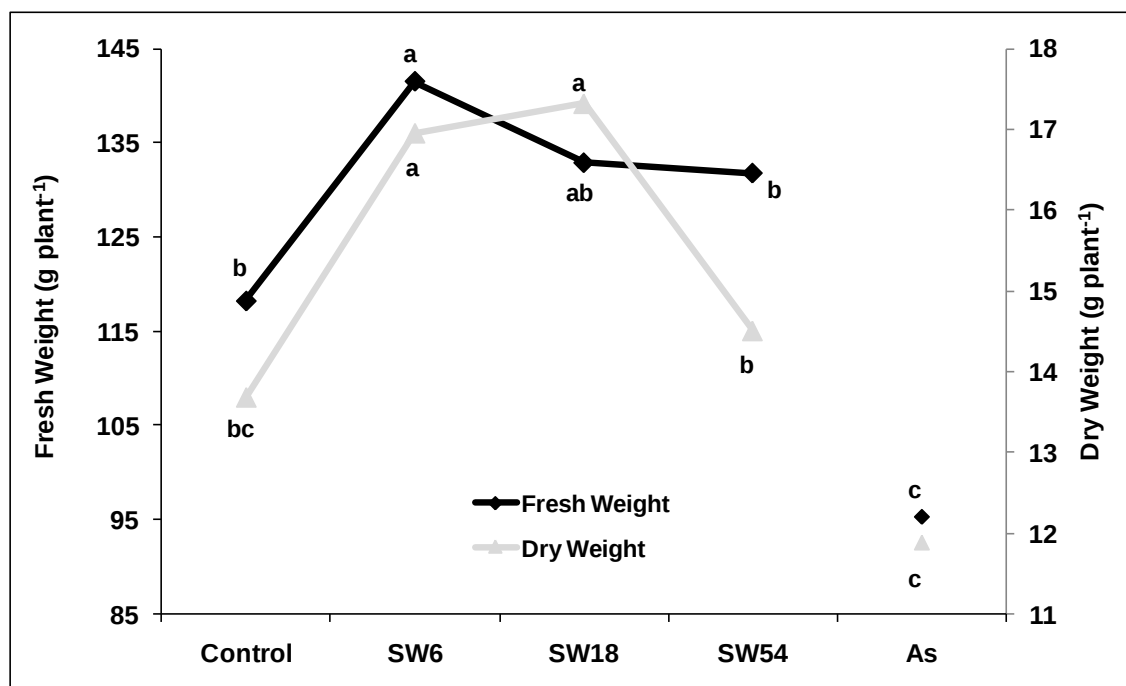


Figure 2. Fresh weights and dry weights of lettuce plants treated with SW foliar fertilisations and controls.

The accumulation of K and Mn (Table 3) was significantly increased in the SW18 treatment, while the micronutrients Cu and Fe accumulated more in the SW6 treatment as compared to the control. Potassium is an essential nutrient to plants and animals and is the most required nutrient in lettuce. Potassium affects a plant's efficiency of water use, translocation of carbohydrates, protein synthesis, enzyme efficiency and resistance to stress (Mota et al., 2001). Manganese (Mn) is a required microelement for growth and photosynthesis and acts as a cofactor, activating approximately 35 different enzymes (Gordon, 2007). Iron is also essential for all living cells. This transition metal plays key roles in electron transfers in both photosynthetic and respiratory reactions in chloroplasts and mitochondria (Lanqua et al., 2005). In mammals, Fe deficiency is the most common nutritional disorder in the world, affecting possibly between 4 and 5 billion people, mainly in developing countries (WHO, 1998). The functions of copper in plants are to metabolise N and carbohydrates and to synthesise lignin, which is essential for cell wall strength. It

also affects the flavour and colouring of vegetables, in addition to their storage abilities, which aids in the prevention of diseases (Williams, 2009). Thus, these nutrients are directly or indirectly associated with plant growth. The results that are related to nutrient accumulation in the SW treatments correlate positively with the dry weight evaluation and likely played a role in the increased yield.

The micronutrients Mn, Fe and Cu, together with Zn, are also the most easily complexed with organic compounds. The presence of organic complexes produced by the reaction of metal salts with various organic compounds, such as those found in industrial by-products already used for this purpose (for example, obtained in the pulp industry), may act similarly to synthetic chelates, which stabilise the metal ions, increasing availability for long enough to be absorbed by plants (Mortvedt, 2001). SW was proved to have these organic compounds (Table 2). However, tests are needed to assess their compatibilities and efficiencies because it is not possible to accurately define its stability constant due to the different chemical structures of these products, which are dependent on the nature of these compounds and their manufacturing processes.

4 Conclusions

Taking into account the long-term characterisation of SW, which showed a large diversity of nutrients and trace elements, other compounds with possible actions on the formation of organic complexes, the absence of harmful concentrations of toxic compounds in its matrix, and the increase in nutrient accumulation and yield that was provided by the addition of 6 and 18 L ha⁻¹ SW to lettuce, SW has potential for use as a foliar fertiliser in agricultural crops. The use of SW was also shown to be safe from the standpoint of food production because it did not present any phytotoxic effects at the doses mentioned above; no acute effects on the development of the lettuce plants were observed

during the experiment conducted. Thus, the use of SW as a foliar fertiliser, mainly in agriculturally poor soils, such as those found in southern Brazil, which requires high amounts of supplementary nutrients, represents an environmentally friendly alternative and a low-cost strategy for the disposal of this by-product. However, further evaluations are necessary to provide a better understanding of the action mechanism of SW to better define the doses for maximum efficiency in the crops of interest, as well as its interaction with possible nutrients added for enrichment.

5 Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the technical and financial supports from Petrobras SIX – Industrialização do Xisto, Embrapa Clima Temperado, FAPEG and MCT – Ministério de Ciência e Tecnologia.

6 References

- Agency for toxic substances and disease registry – ATSDR, 2008. U.S. Department of health and human services. Toxicological profile for cresols. <http://www.atsdr.cdc.gov/pdns/pdfs/pdn_doc_34.pdf>
- Barreto-Rodrigues, M., Silva, F.T., Paiva, T.C.B., 2007. Physical, chemical and ecotoxicological characterization of an effluent from an explosives industry. *Quím. Nova* 30, 1623-1627.
- Botero, W. G., Santos, A., Oliveira, L.C., Rocha, J.C., 2009. Characterization of sludge generated in water treatment plants: prospects for agricultural application. *Quím. Nova* 32, 2018-2022.
- Brown, P.H., Welch, R.M., Cary, E.E., 1987. Nickel: a micronutrient essential for higher plants. *Plant Physiol.* 85, 801-803.

Cogo, S.L.P., Chaves, F.C., Schirmer, M.A., Zambiasi, R.C., Nora, L., Silva, J.A., Rombaldi, C.V., 2011. Low soil water content during growth contributes to preservation of green colour and bioactive compounds of cold-stored broccoli (*Brassica oleraceae* L.) florets. *Postharvest Biol. Tec.* 60, 158-163.

Comissão de Química e Fertilidade do solo (CQFS), 2004. Recomendações de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, 10th ed. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Porto Alegre, Brasil.

Cruz, J.L., Pelacani, C.R., Coelho, E.F., Caldas, R.C., De Almeida, A.Q., De Queiroz, J.R., 2006. Influence of NaCl salinity on uptake and distribution of sodium, chloride and macronutrients in yellow passion fruit seedlings. *Bragantia*, Campinas 65, 275-284.

Dolatto, R.G., Messerschmidt I., Pereira, B.F., de Oliveira, T., Pillon, C.N., Abate, G., 2010. Interaction of phenol, o-cresol, and p-cresol with a clay-rich soil sample. *J. Agric. Food Chem.* 58, 2426–2432.

Duarte, F.A., 2006. Determinação de espécies de arsênio por LC-ICP-MS. M.S. Thesis. Universidade de Santa Maria. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, pp. 90.

Dyni, R.J., 2006. Geology and resources of some world oil shale deposits: scientific investigations report 2005 – 5294. US Department of the Interior. <<http://www.usgs.gov/sir/2006/5394>>

Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Rice, E.W., Greenberg, A.E., Franson, M.A.H., 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21th ed. Washington DC, APHA, AWWA and WEF.

European Union Commission, 2001. Critérios ecológicos para a concessão de etiqueta ecológica comunitária das emendas do solo e dos substratos de cultivo, Diário Oficial das Comunidades Europeias. 2597 -2001/688/CE, Bruxelas.

- Gomez-Galera, S., Rojas, E., Sudhakar, D., Zhu, C., Pelacho, A. M., Capell, T., Christou, P., 2010. Critical evaluation of strategies for mineral fortification of staple food crops. *Transgenic Res.* 19, 165-180.
- Goodwin, B., 2010. Foliarly applicable silicon nutrition compositions & methods. United states patent application 20100016162.
- Gordon, B., 2007. Manganese nutrition of glyphosate-resistant and conventional soybeans. *Better Crops*, 91, 12-13.
- Kim, H.J., Fonseca, J.M., Choi, J.H., Kubota, C., Kwon, D.Y., 2008. Salt in irrigation water affects the nutritional and visual properties of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Agr. Food Chem.* 56, 3772–3776.
- Lal, R., 2009. Soil degradation as a reason for inadequate human nutrition. *Food Security*, 1, 45–57.
- Lanquar, V., Lelievre, F., Bolte, S., Hames, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schroder, A., Kramer, U., Barbier- Brygoo, H., Thomine, S., 2005. Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J.* 24, 4041–4051.
- Lopes, J.C., Ribeiro, L.G., Araújo, M.G., Beraldo, M.R.B.S., 2005. Lettuce production using doses of sewage sludge. *Hortic. Bras.* 23, 1-11.
- Marschner, H., 2003. *Mineral Nutrition of Higher Plants*, second ed. Academic Press 525 B Street, Suite 1900, San Diego, California 92101-4495, USA.
- Miller, R.E., Lei, X., Ullrey, D.E., 1991. Trace elements in animal nutrition, in: Mortvedt, J.J. (second ed.), *Micronutrients in Agriculture*, Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 593–662.

- Meharg, A.A., 1994. Integrated tolerance mechanisms – constitutive and adaptive plant-responses to elevated metal concentrations in the environment. *Plant Cell Environ.* 17, 989–993.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006. Instrução Normativa 27, Secretaria de Defesa e Agropecuária/MAPA. <<http://www.agricultura.gov.br>>
- Moore, J., 1990. Inorganic contaminants in surface waters, Springer-Verlag, New York.
- Mortvedt, J.J., 2001. Tecnologia e produção de fertilizantes com micronutrientes. Presença de elementos tóxicos. In: Ferreira, M.E., Cruz, M.C.P., Raij, B., Abreu, C.A. (Eds.), *Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura*, Jaboticabal: CNPq/ FAPESP / POTA-FOS, São Paulo, pp. 237-253.
- Mota, J.H., Souza, R.J., Da Silva, E.C., Carvalho, J.G., Yuri, J.E., 2001. The effect the of potassium chloride fertirrigation on american lettuce production in greenhouse. *Ciênc. Agrotec.* 25, 542-549.
- Navarro-Alarcon, M.E., Cabrera-Vique, C., 2008. Selenium in food and the human body: A review. *Sci. Total Environ.* 400, 115-141.
- Nicolini, J., Pereira, B.F., Pillon, C.L., Machado, V.G., Lopes, W.A., de Andrade, J.B., Mangrich, A.S., 2011. Characterization of Brazilian oil shale byproducts planned for use as soil conditioners for food and agro-energy production. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 90, 112–117.
- Ortega-Flores, C.I., 1991. Carotenóides com atividade pró-vitáminica A e teores de cianeto em diferentes cultivadores de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) do Estado de São Paulo. (Carotenes with pro-vitamin A activity and levels of cyanide in different cultivars from the State of Sao Paulo). M.S. Thesis. Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil, pp. 77.
- Otte, M.L. and Ernst, W.H.O., 1994. Arsenic in vegetation of Wetlands. Wileynew York (USA).

- Padula, V.T., 1969. Oil shale of Permian Irati Formation, Brasil: Buletin American Association Petroleum Geologists, 53, 591-602.
- Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B., Sharma, A., 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environ. and Exp. Bot.* 52, 199–223.
- Pereira, S.H.E and Mello, C.S., 2002. Foliar fertilizer applications on nutrition and yield of sweet pepper and tomato. *Hortic. Bras.* 20, 597-600.
- Petrobras, 2011. Shale Industrialization Business Unit. <<http://www.petrobras.com.br/minisite/refinarias/petrosix/ingles/conheca/index.as>>
- Raut, N., Sitaula, B.K., Bajracharya, R.M., 2010. Agricultural intensification: linking with livelihood improvement and environmental degradation in mid-hills of Nepal. *Agr. Environ.* 11, 83-94.
- Rezende, D.C., Rodrigues, F.A., Carré-Missio, C.V., Schurt, D.A., Kawamura, I.K., Korndörfer, G.H., 2009. Effect of root and foliar applications of silicon on brown spot development in rice. *Australas. Plant Path.* 38, 67–73.
- Roma, C., 1981. Process for retorting oil products contained in shales and sands. United States Patent 4253938.
- Savant, N.K., Snyder, G.D., Datnoff, L.E., 1997. Silicon in management and sustainable rice production. *Adv. Agron.* 58, 151–199.
- Seppänen, M., Turakainen, M., Hartikainen, H. 2003. Selenium effects on oxidative stress in potato. *Plant Sci.* 165, 311-319.
- Severi, A., 2001. Toxicity of selenium to *Lemna minor* in relation to sulfate concentration. *Physiol. Plant.* 113, 523–532.
- Statistical Analysis System (SAS), 2004. SAS user's guide: Statisticas. SAS Institute, Cary, NC.

- Straw, D., Doner, H., Zavarin, M., McHugo, S., 2002. Microscale investigation into the geochemistry of arsenic, selenium, and iron in soil developed in pyritic shale materials. *Geoderma* 108, 237– 257.
- Tariq, M., Sharif, M., Shah, Z., Khan, R., 2007. Effect of foliar application of micronutrients on the yield and quality of sweet orange (*Citrus sinensis* L.). *Pak. J. Biol. Sci.* 10, 1823-1828.
- U.S. EPA, 1991. Mercury in tissues by cold vapor atomic absorption spectroscopy, Method 245.6., U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, U.S.A.
- Uthus, E.O., 1992. Evidence for arsenic essentiality. *Environ. Geochem. Hlth.* 14, 55-58.
- Xue, T. and Hartikainen, H., 2000. Association of antioxidative enzymes with the synergistic effect of selenium and UV irradiation in enhancing plant growth. *Agr. Food Sci. Finland* 9, 177-186.
- Yaseen, M., Nadeem, M., Hussain, S., 2004. Investigating the effectiveness of Micropower foliar spray on growth and yield of different crops. *Pak. J. Life Soc. Sci.* 2, 156-158.
- Williams, E.R. 2009. The benefit of foliar applied copper fertilizer on romaine lettuce grown in low copper soils of the coastal Santa Maria, California. Thesis. Faculty of California Polytechnic State University, San Luis Obispo March.
- World Health Organization (WHO), 1998. Elementos traço na nutrição e saúde humana, first ed., Editora Roca. <<http://www.who.int/nut/ida.htm>>
- Zhao, F., Tausz, M., De Kok, L.J., 2008. Role of sulfur for plant production in agricultural and natural ecosystems sulfur metabolism in phototrophic organisms. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, 27, 417-435.

6. ARTIGO 2 – “Isolation of high quality RNA from maize grain (*Zea mays* L.)”

Isolation of high quality RNA from maize grain (*Zea mays* L.)

Rafael da Silva Messias^{I*}, Vanessa Galli^I, Sérgio Delmar dos Anjos e Silva^I, Manoel Artigas Schirmer^{II}, Leonardo Nora^{II}, César Valmor Rombaldi^{II}

I - EMBRAPA Clima Temperado, Rodovia BR 396, Km 78 Caixa Postal 403, CEP 96001-970, Pelotas – RS; Brasil.

II - Universidade Federal de Pelotas, Campus universitário S/N; Cx Postal 354; 96010-900; Pelotas - RS; Brazil

***Correspondence author:**

Rafael da Silva Messias

Laboratório de Biologia Molecular,

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Clima Temperado, Rodovia BR 396, Km 78 Caixa Postal 403, CEP 96001-970, Pelotas – RS; Brasil.

55 (53) 32758253

[*rafael.embrapa@yahoo.com.br](mailto:rafael.embrapa@yahoo.com.br)

Summary

Most methods available for RNA isolation from plants are inappropriate for grains and other organs and plant tissues rich in polysaccharides. This is mainly due to the tendency of polysaccharides to co-purify and to co-precipitate with RNA during isolation, compromising the use of RNA in subsequent applications. Different methods for RNA isolation, including commercial reagents, RNA isolation kits, DNA isolation kits, and a CTAB method adapted on this study were tested in order to identify the most appropriate for grain maize. In terms of yield, purity and integrity of RNA, the method based on the use of CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) was considered suitable for the isolation of RNA from maize grain. Although other methods used have resulted in RNA whose cDNA synthesized have amplified the actin gene, they were considered inadequate due to limitations in terms of purity and / or integrity of RNA that can potentially compromise the evaluation of gene expression by quantitative PCR.

Key words: Isolation of RNA, grain, maize, CTAB, gene expression, methodology.

Introduction

The quantity and quality of isolated RNA are crucial for the evaluation of gene expression, since the use of low quality RNA may compromise the reliability of the results of these studies, which are expensive, laborious and costly (1-3).

High-quality RNA should be intact and free of contamination with RNases, proteins, genomic DNA, enzymes and other inhibitory substances for RT-PCR (1-2). RNA integrity is quickly compromised in post-mortem tissues due to exposition to endogenous and exogenous ribonucleases, mainly at inadequate temperatures (4). RNA purity is also compromised by environment contamination and waste solution from RNA isolation, especially phenolic compounds (5-6). These contaminants may inhibit reverse transcriptase activity and consequently affect DNA synthesis from isolated RNA (5-6). Therefore, strict methodological precautions, varying according to the origin of RNA and isolation method are necessary to obtain good quality RNA (7).

Besides being one of the major crops in the world - 817 million tons in 2009 (8) - maize is also notable for having high antioxidant activity content (9). Considering that many of these antioxidant compounds (eg. carotenoids and anthocyanins found in colored grains) are synthesized directly in the grain, is essential to characterize the expression of genes associated with the antioxidant compounds accumulation, in order to better understand this process and use these informations to biofortify this crop by using metabolic engineering (10).

However, the isolation of RNA from maize grain is notoriously difficult due to its association with the matrix of the amylo-protein endosperm and high fiber concentration in the aleurone layer. Thus, co-purification and co-precipitation of polysaccharides, proteins and sometimes polyphenols present in high concentrations in those tissues normally compromise the isolation of RNA regarding its yield, purity and integrity (4, 11-13).

Finally, considering that the complete genome of maize has recently been sequenced (14), to enable studies of gene expression in maize grain, the establishment and standardization of RNA isolation methods is of paramount importance.

In this study different methods of RNA isolation from maize grains were assessed for concentration yield, purity, integrity and suitability of the obtained RNA for gene expression studies aiming to find a simple, efficient and low cost method.

Materials and Methods

Collection and preparation of grain samples for RNA isolation

Cobs of hybrid maize cultivar 30F53 (Pioneer™) (*Zea mays* L.), cultivated from January to April between 2008 and 2009, at Pelotas, RS – Brazil, were collected 24 days after pollination, in the R4 stage of maize development (15), when the grain were at 72 to 80% moisture content. Cobs were immediately frozen in liquid nitrogen in plastic bags previously treated with RNase inhibitor (RNase AWAY™, Invitrogen™, Cat No. 10328-011) and kept stored at -70 °C until analysis.

Immediately before the RNA isolation, the cobs were shelled in a frozen state, and whole grains were homogenized under liquid nitrogen with the aid of a mortar and pestle. For each method of RNA isolation, aliquots of 100 mg from the homogenized were prepared in triplicate in 1.5 µL microtube (Eppendorf) previously cooled.

RNA Isolation Methods

The methods evaluated on this study were:

- M1. PureLink® Plant RNA Reagent (Invitrogen™, Cat. No. 12322-012) (16);
- M2. TRIzol® Reagent (Invitrogen™, Cat. No. 15596-018) (17);
- M3. NucleoSpin® RNA Clean-up (Macherey-Nagel™, Cat. No. 740948) (18);
- M4. Total RNA purification from plant (Macherey-Nagel™, Cat. No. 740949) (19);
- M5. Total RNA Extraction Kit - Plant Tissues (Real Genomics™, Cat. No. YRP50) (20);
- M6. DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN™, Cat. No. 69104) (21);
- M7. PureLink® Plant Total DNA Purification Kit (Invitrogen™, Cat. No. K1830-01) (22);
- M8. CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide), adapted from JAOKALA et al. (23).

M1 and M2 consisted of commercial reagents PureLink® Plant RNA Reagent and TRIzol® Reagent, respectively. In M2, 1.2 M NaCl and 0.8 M sodium citrate were included in the precipitation step to aid the elimination of polysaccharide contamination. Both methods were performed according to manufacturer's instructions (16, 17).

M3, M4 and M5 consisted of commercial kits for RNA isolation and were performed according to manufacturer's instructions. M3 is recommended for the isolation of RNA from cultured cells while M4 and M5 are specific to plant tissues. M4, due to the high viscosity, was used with lysis buffer (RAP contained in the kit) based on guanidine-HCl, and centrifugation in a filtration column (11000 × g for 1 min) to allow the flow of the lysate. M5 was tested with both lysis buffers, RB and PRB. PRB buffer is

recommended to use with polysaccharide-rich samples. M4 and M5 were performed at room temperature after lysis solution addition.

M6 and M7, DNA isolation kits, were used for RNA isolation as proposed by BELEFANT-MILLER et al. (11). In both methods, to remove DNA and preserve RNA, the RNase digestion step was replaced by a DNase digestion step.

M8, adapted for maize grains from the method proposed by JAAKOLA et al. (23) for isolation of total RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus*), is described below:

Samples (100mg) pre-milled were suspended in 1.25mL of extraction solution (2% CTAB - hexadecyltrimethylammonium bromide, 2% PVP - polyvinylpyrrolidone, 2 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA and 3.3 % β -mercaptoethanol) pre-heated at 65°C and incubated at 65 °C for 3 min. Then two extractions were made with an equal volume of chloroform-isoamyl alcohol (24 : 1), homogenized by inversion for 5 min and centrifuged at $7300 \times g$ for 20 min. The upper phase was recovered and precipitated overnight at -20 °C with $\frac{1}{4}$ of 10 M LiCl. After this period the samples were centrifuged at $18,000 \times g$ for 30 min at 4 °C. The pellet was resuspended at 65 °C for a few minutes in 70 μ L of SSE buffer (1 M NaCl, 0.5 % SDS, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) and extracted twice with an equal volume of chloroform: isoamyl alcohol (24 : 1). The upper phase was precipitated with 364 μ L of 100 % ethanol and 18 μ L of 3 M sodium acetate pH 5.5, for 1h at -70 °C, followed by centrifugation at $18,000 \times g$ for 20 min at 4 °C. The pellet was washed twice with 70 % ethanol and resuspended in DEPC water with 0.1 mM EDTA.

RNases and DNA contamination control

To minimize RNase contamination, all places and materials used to manipulate samples were pretreated with RNase inhibitor (RNase Away - Invitrogen TM). Tips and centrifuge microtubes were heated at 121 °C for 45 min. Equipment and places used for isolation procedures were DNA decontaminated with 70% alcohol.

Characterization of RNA isolated

The spectrophotometric ratio 260 nm / 280 nm, measured on Hitachi U-1800 spectrophotometer, was used to assess the purity of RNA. Samples with a ratio between 1.8 - 2.2 were considered pure. RNA concentration was calculated using the formula: $[RNA] = 40 \mu g ml^{-1} \times A_{260} \times \text{dilution factor}$ (24). RNA integrity was assessed visually after electrophoresis on 1% agarosis gel at 130 V for 40 min, using 6 μ L of sample.

DNase digestion

For all methodologies, 1.5 µg of total RNA from each triplicate were digested with 1 U DNase and 1 × DNase I Reaction Buffer. After 15 min incubation at 25 ° C, 25 mM EDTA was added to the reaction and incubated for 5 min at 65 ° C.

RT-PCR

RNA digested with DNase was used for reverse transcription using M-MLV enzyme (Invitrogen™, Cat No. 28025013). cDNAs were amplified by PCR (thermocycler Gene Amp 9700, Applied Biosystems™) as follows: final volume of 25 µL containing 75 ng cDNA, 0.2 mM dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 10 pmol of each primer, 2 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen™, Cat No. 10342178), 1 × *Taq* Buffer. PCR condition were: 2 min at 95 ° C followed by 35 cycles of 60 s at 95 ° C, 60 s at 60 ° C and 60 s at 72 ° C and final extension of 7 min at 72 ° C.

The primers for the housekeeping gene actin from maize (GenBank J01238.1) were defined using Vector NTI 11 program. The forward and reverse primers were 5'-GGAGAACTGGCATCACACCTT-3' and 5'-GACGCAGATTATGTTTGAAACCTT-3', respectively. PCR products were analyzed on 3% agarosis gel in electrophoresis for 50 min at 130 V, stained with ethidium bromide and visualized on a UV transilluminator (Vilber Lourmat, CN-UV/VL).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed on SAS 9.1.3 software (SAS Institute Inc., USA), using F test in analysis of variance and Tukey test to compare means of treatment, both at 5 % level of significance.

Results and Discussion

The results of electrophoresis in agarosis gel containing RNA isolated from maize grains through different methods evaluated in this study as well as spectrophotometric data are shown in Figure 1.

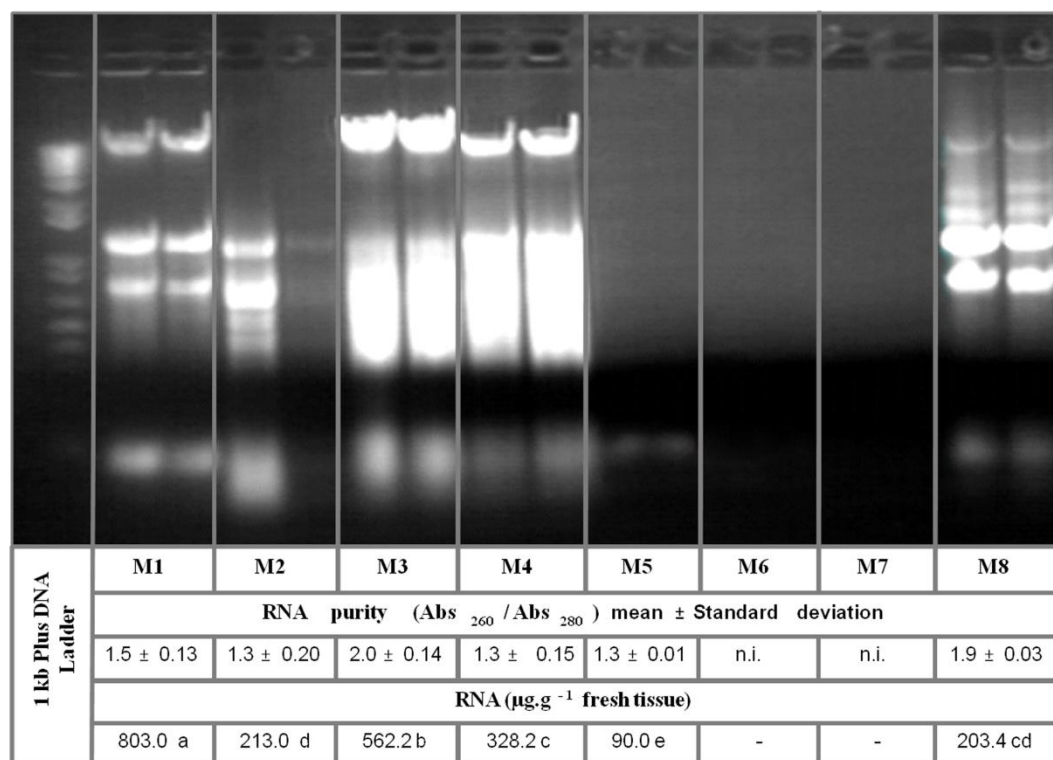


Figure 1. Eletrophoresis in 1 % agarosis gel with RNA isolated from hybrid maize cultivar 30F53 (PioneerTM) (*Zea mays* L.), and its respectively purity and yield. RNA isolation methods evaluated were: M1. PureLink[®] Plant RNA Reagent; M2. TRIzol[®] Reagent; M3. DNeasy[®] Plant Mini Kit; M4. PureLink[®] Plant Total DNA Purification Kit; M5. Total RNA purification from plant; M6. NucleoSpin[®] RNA Clean-up; M7. Total RNA Extraction Kit - Plant Tissues; M8. CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide). Ladder used: 1 kb Plus DNA LadderTM (Invitrogen Cat. No. 10787018). Different letters in RNA yield indicate statistical differences by Tukey test ($p < 0.05$). n.i. – not isolated RNA.

PureLink [®] *Plant RNA* is a commercial reagent recommended for RNA isolation from different plant tissues, especially those with high levels of polyphenols and sugars. The reagent is allowed to obtain total RNA with significantly higher concentrations than the other methods (Figure 1, M1), with a low coefficient of variation ($CV = 8.13\%$), demonstrating the reproducibility of the method. However, RNA extracted from corn using this reagent did not show rRNA bands on agarosis gel with an acceptable profile and resolution, showing signs of contamination by DNA, which can result in an overestimation of spectrophotometer readings. The spectrophotometric ratio 260 nm / 280 nm showed

values below 1.8 (Figure 1, M1), a possible indicator of protein contamination (2). The viscosity observed in RNA samples obtained by this method made it difficult to pipette and confirm the hypothesis of contamination, either by residual isolation solutions or compounds present in the grains, such as carbohydrates, phenols and proteins which could interfere negatively in subsequent analysis of gene expression (5). Thus, a RNA purification step would be necessary.

The isolation of RNA using the commercial reagent *TRIzol*® *Reagent* (17) resulted in lower DNA contamination comparing to other methods, according to electrophoresis gel. However, this method proved to be difficult to handle due to the formation of a viscous and water insoluble pellet. Therefore, when the same amount of samples were applied in two different wells in the agarosis gel resulted in bands with different intensities (Figure 1, M2), which combined with possible contamination with pigments interfered directly in the spectrophotometer readings, resulting in non-homogeneous samples concentration (CV = 35.26). Moreover, 18S and 28S rRNA gel bands did not show a correct 28S: 18S ratio (approximately 2: 1) (25) suggesting the presence of degraded RNA, and therefore not indicated for use in tests based on RNA.

The RNA isolation kits represent an isolation technology which combines the selective binding properties of silica gel membrane and the use of fast spin. However, the *Total RNA purification from plant* kit was the only RNA isolation kit evaluated which allowed the isolation of RNA (Figure 1, M5), showing that this strategy is kit dependent. Nevertheless, this RNA showed low quality, and yield lower than the other methods evaluated in the study, needing the use of large volume of RNA to amplify housekeeping gene by RT-PCR (Figure 3). In other RNA isolation kit evaluated, the high viscosity of the generated extract prevented its flow through the columns provided (Figure 1, M6 and M7).

Another approach evaluated was the use of commercial kits for DNA isolation, which are quite numerous. Besides being more practical and cheaper than RNA isolation kits, this approach represent an interesting strategy to obtain RNA when the RNase digestion step is omitted and a DNase digestion step is added to the end of the process. But despite BELEFANT-MILLER et al. (11) have obtained high quality RNA from rice samples using Genomic DNA - Food Samples Extract Kit (Cartagena) which allow its use in RT-PCR assay, the same result was not obtained with other kits evaluated by these authors, as well as with the kits tested in the present study. Thus, obtaining RNA through this strategy proved to be very limited and dependent on the DNA isolation kit used. The

PureLink™ Plant Total DNA Purification Kit (22) is based on selective binding of dsDNA in a silica membrane in the presence of chaotropic salts. Despite that, this kit was able to extract RNA efficiently. However, with a much lower quality than usually required for gene expression analysis (Figure 1, M4). On the other hand, *Dneasy® Plant Mini Kit* (21), which according to the manual, allows the isolation of good quality DNA from various tissues, including seeds, allowed to obtain pure RNA - spectrophotometer readings between 1.8 and 2.2 (Figure 1, M3) - only with lower yield than *PureLink® RNA Plant* method (Figure 1, M1). However, it was not possible to identify the correct proportion of 18S and 28S rRNA bands in electrophoresis, making it difficult to assess the integrity of these RNAs, one of the parameters necessary to determine its quality.

The method proposed by JAAKOLA et al. (23), use CTAB as detergent buffer in order to separate polysaccharides from nucleic acids, and PVP and β -mercaptoethanol to reduce phenolic compounds oxidation. This method also allows the separation of sugars present in samples using lithium chloride precipitation followed by centrifugation. Changes made in this method provided the achievement of high quality total RNA and RNA concentrations desirable for gene expression studies. These changes included mainly the reduction in sample amount and the use of sodium acetate, which, added together to ethanol makes RNA less hydrophilic, allowing efficient RNA precipitation by increasing the salt concentration, and consequently resulting in higher yield. Moreover, the reduction of centrifugation and washing steps and smaller number of different solutions used become the method less laborious.

Although methods involving multiple steps and reagents, such as CTAB method, usually result in loss of RNA or even its degradation (13), accurate pippeting and the maintenance of low temperatures, together with the presence of RNase inhibitor, allowed to obtain in all samples, RNAs with 260/280nm ratio between 1.8 and 2.2 (Figure 1, M8), indicating they are relatively free of contamination with proteins, carbohydrates and phenolic compounds. RNA isolated was also intact (28S rRNA : 18S rRNA = 2:1) (Fig. 1, M8). Although the yield of total RNA extracted with this method was lower than *Dneasy® Plant Mini Kit* (QIAGEN™) and *PureLink® Plant RNA* methods, it was statistically equal or superior to other methods (Figure 1). In addition, the use of this methodology for isolate RNA from a larger number of samples (21 samples) resulted in pure RNA, with 260/280nm ratio = 1.91 ± 0.11 (mean $\pm$ standard deviation) and mean concentration = 428.5 mg g^{-1} , showing to be a highly reproducible method.

Despite the amplification of the actin gene was detected using RNA samples derived from all methods tested (Figure 2), except those based on DNA extraction, which did not allow the RNA isolation, differences in gene expression between methods show the importance of obtaining an RNA free of contaminants. Both PureLink[®] Plant RNA and CTAB methods showed efficient amplification of the transcript, and the best performance regarding to quality and amount of RNA.

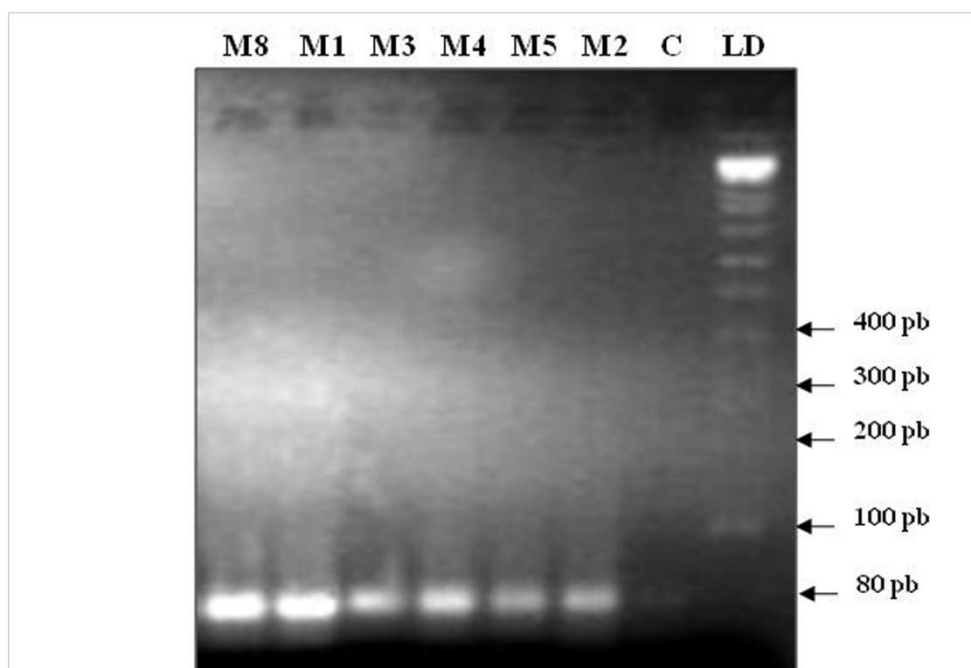


Figure 2. Eletrophoresis in 3 % agarosis gel showing amplification by RT-PCR of the gene *actin*, using RNA isolated with different methods: M1. PureLink[®] Plant RNA Reagent; M2. TRIzol[®] Reagent; M3. DNeasy[®]Plant Mini Kit; M4. PureLink[®]Plant Total DNA Purification Kit; M5. Total RNA purification from plant; M8. CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide). C. Negative control; LD. 1 kb Plus DNA Ladder[™] (Invitrogen Cat. No. 10787018).

Conclusions

The results of this study indicate that the method of isolation directly affects the quality and concentration of RNA obtained from maize grains. Although more laborious, the CTAB method proved to be practice and economically feasible, enabling the isolation of high pure and concentrated RNA from maize grain, without the need of RNA purification steps, which can be used in gene expression studies.

Acknowledgments

The authors are grateful to Embrapa Clima Temperado, Fundação de Apoio a Pesquisa e Desenvolvimento Agropecuário Edmundo Gastal (FAPEG) and Petrobras for the financial support for this study.

References

1. S.A. Bustin, T. Nolan, Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction, *Journal of Biomolecular Techniques*, 15 (2004) 155-156.
2. S. Fleige, M.W. Pfaffl, RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance, *Molecular Aspects of Medicine*, 27 (2006) 126-139.
3. L.V. Madabusi, G.J. Latham, B.F. Andruss: RNA extraction for Arrays. In: DNA Microarrays, Part B: Databases and Statistics, Vol. 411, Elsevier Academic Press Inc, San Diego, USA (2006), pp. 1-14.
4. D.H. Wang, B.C. Wang, B. Li, C.R. Duan, J. Zhang, Extraction of total RNA from Chrysanthemum containing high levels of phenolic and carbohydrates, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 36 (2004) 111-114.
5. L. Rossen, P. Norskov, K. Holmstrom, O.F. Rasmussen, Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions, *International Journal of Food Microbiology*, 17 (1992) 37-45.
6. I.G. Wilson, Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification, *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (1997) 3741-3751.
7. E. Wang, RNA amplification for successful gene profiling analysis, *Journal of Translational Medicine*, 3 (2005).
8. Faostat, Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO (2009) (<http://faostat.fao.org/>).
9. R.H. Liu, Whole grain phytochemicals and health, *Journal of Cereal Science*, 46 (2007) 207-219.
10. R. Vallabhaneni, E.T. Wurtzel, Timing and Biosynthetic Potential for Carotenoid Accumulation in Genetically Diverse Germplasm of Maize, *Plant Physiology*, 150 (2009) 562-572.

11. H. Belefant-Miller, C. Ledbetter, S. Bennett, Using a commercial DNA extraction kit to obtain RNA for RT-PCR from starchy rice endosperm, *Biotechnology Journal*, 3 (2008) 360-363.
12. H. Tai, C. Pelletier, T. Beardmore, Total RNA isolation from *Picea mariana* dry seed, *Plant Molecular Biology Reporter*, 22 (2004) 93-93.
13. Y. Zeng, T. Yang, RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides, *Plant Molecular Biology Reporter*, 20 (2002) 417-417.
14. P.S. Schnable, D. Ware, R.S. Fulton, J.C. Stein, F.S. Wei, S. Pasternak, C.Z. Liang, J.W. Zhang, L. Fulton, T.A. Graves, P. Minx, A.D. Reily, L. Courtney, S.S. Kruchowski, C. Tomlinson, C. Strong, K. Delehaunty, C. Fronick, B. Courtney, S.M. Rock, E. Belter, F.Y. Du, K. Kim, R.M. Abbott, M. Cotton, A. Levy, P. Marchetto, K. Ochoa, S.M. Jackson, B. Gillam, W.Z. Chen, L. Yan, J. Higginbotham, M. Cardenas, J. Waligorski, E. Applebaum, L. Phelps, J. Falcone, K. Kanchi, T. Thane, A. Scimone, N. Thane, J. Henke, T. Wang, J. Ruppert, N. Shah, K. Rotter, J. Hodges, E. Ingenthron, M. Cordes, S. Kohlberg, J. Sgro, B. Delgado, K. Mead, A. Chinwalla, S. Leonard, K. Crouse, K. Collura, D. Kudrna, J. Currie, R.F. He, A. Angelova, S. Rajasekar, T. Mueller, R. Lomeli, G. Scara, A. Ko, K. Delaney, M. Wissotski, G. Lopez, D. Campos, M. Braidotti, E. Ashley, W. Golser, H. Kim, S. Lee, J.K. Lin, Z. Dujmic, W. Kim, J. Talag, A. Zuccolo, C. Fan, A. Sebastian, M. Kramer, L. Spiegel, L. Nascimento, T. Zutavern, B. Miller, C. Ambroise, S. Muller, W. Spooner, A. Narechania, L.Y. Ren, S. Wei, S. Kumari, B. Faga, M.J. Levy, L. McMahan, P. Van Buren, M.W. Vaughn, K. Ying, C.T. Yeh, S.J. Emrich, Y. Jia, A. Kalyanaraman, A.P. Hsia, W.B. Barbazuk, R.S. Baucom, T.P. Brutnell, N.C. Carpita, C. Chaparro, J.M. Chia, J.M. Deragon, J.C. Estill, Y. Fu, J.A. Jeddelloh, Y.J. Han, H. Lee, P.H. Li, D.R. Lisch, S.Z. Liu, Z.J. Liu, D.H. Nagel, M.C. Mccann, P. Sanmiguel, A.M. Myers, D. Nettleton, J. Nguyen, B.W. Penning, L. Ponnala, K.L. Schneider, D.C. Schwartz, A. Sharma, C. Soderlund, N.M. Springer, Q. Sun, H. Wang, M. Waterman, R. Westerman, T.K. Wolfgruber, L.X. Yang, Y. Yu, L.F. Zhang, S.G. Zhou, Q. Zhu, J.L. Bennetzen, R.K. Dawe, J.M. Jiang, N. Jiang, G.G. Presting, S.R. Wessler, S. Aluru, R.A. Martienssen, S.W. Clifton, W.R. Mccombie, R.A. Wing, R.K. Wilson, The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics, *Science*, 326 (2009) 1112-1115.

15. S. Ritchie, J.J. Hanway: How a corn plant develops. In: *Special Report* (48), Iowa State University of Science and Technology, Ames, Iowa, USA (1989).
16. Anonymous: Concert™ Plant RNA Reagent, Invitrogen Life Technologies (Cat. No. 12322-012), Carlsbad, California, USA (2001) pp. 1-9.
17. Anonymous: TRIzol® Reagent, Invitrogen Life Technologies (Cat. No. 15596-018), Carlsbad, California, USA (2007) pp. 1-2.
18. Anonymous: NucleoSpin® RNA Clean-up, Macherey-Nagel (Cat. No. 740948), Düren, Germany (2004) pp. 1-18.
19. Anonymous: NucleoSpin® RNA Plant, Macherey-Nagel (Cat. No. 740949), Düren, Germany (2009) pp. 1-23.
20. Anonymous: Total RNA Extraction Kit (Plant) [Mini], RBC Bioscience - Real Genomics (Cat. No. YRP50), Chung Ho, Taipei, Taiwan (2008) pp. 23-23.
21. Anonymous: DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen (Cat. No. 69104), Cologne, Germany (2006) pp. 24-27.
22. Anonymous: PureLink™ Plant Total DNA Purification Kit, Invitrogen Life Technologies (Cat. No. K1830-01), Carlsbad, California, USA (2004) pp. 1-24.
23. L. Jaakola, A.M. Pirttilä, M. Halonen, A. Hohtola, Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit, *Molecular Biotechnology*, 19 (2001) 201-203.
24. J. Sambrook, D.W. Russell: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA (2001) pp. 999.
25. S. Imbeaud, E. Graudens, V. Boulanger, X. Barlet, P. Zaborski, E. Eveno, O. Mueller, A. Schroeder, C. Auffray, Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces, *Nucleic Acids Research*, 33 (2005) pp. 56.

7. ARTIGO 3 – “Foliar application of shale water improves yield and quality of maize (*Zea mays* L.)”

Foliar application of shale water improves yield and quality of maize (*Zea mays* L.)

Rafael da Silva Messias¹, Vanessa Galli¹, Manoel Artigas Schirmer², Clenio Nailto Pillon¹, Sérgio Delmar dos Anjos e Silva¹, César Valmor Rombaldi^{2*}

¹Embrapa Clima Temperado, Rodovia BR 396, Km 78 Caixa Postal 403, CEP 96001-970, Pelotas – RS; Brasil

²Universidade Federal de Pelotas, Agronomia, Campus universitário S/N; Cx Postal 354; 96010-900; Pelotas – RS; Brasil

***Correspondence author:**

Cesar Valmor Rombaldi

Departamento de Ciências e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário, s/nº, Capão do Leão, RS, Brasil, 96010-900.

Phone: 55 (53) 32758253

***cesarvrf@ufpel.edu.br**

Abstract

The water extracted from shale rock (shale water) throughout the pyrolysis process to obtain fuel oil and other products, shows a composition based in organic compounds and a wide range of minerals and other trace elements, important for plant nutrition and metabolism. Thus, the influence of foliar application of shale water, with or without micronutrients enrichment, was evaluated in this study, aiming maize grains biofortification. The application of 21L ha⁻¹ of shale water increased growth of maize plants, beyond yield and quality of grains, indicating its influence in both, primary and secondary metabolism. On the other hand, the mineral enrichment of shale water had a positive effect on free amino acids and some minerals accumulation, but with a negative effect on carotenoid content. The results indicate that shale water has potential to be used in agriculture without the need of enrichment. The hypotheses concerning the results observed were discussed.

Keywords: maize, shale water, foliar application, yield, biofortification

1 Introduction

Nowadays, the search for food with nutritional and functional quality, free of toxic residues, as well as environmentally friendly produced, is a world-wide tendency. Major cereal crops are staple foods that have the role to provide great amount of dietary macronutrients such as carbohydrates, lipids and proteins, micronutrients such as minerals, vitamins, as well as, like more recently reported, functional compounds, especially antioxidants, which can improve human health (Wang, 2008). In particular, maize is one of the major crops cultivated over the world, mainly in developing countries, with a varied range of consumed forms and utilizations. Because of this, several efforts have been made to biofortify this crop (Aluru et al, 2008; Gómez-Galera et al, 2010; Zhu, 2007).

Mineral biofortification, especially in cereal grains, that are relatively poor sources of key mineral nutrients, is an important strategy to deal with the micronutrient soil deficiency (Gómez-Galera, 2010). This deficiency have been caused by the increase in agricultural production and purity of industrial fertilizers process, which have been resulting in depletion of soil and micronutrients phytoavailability reduction (Lal, 2009; Raut et al, 2010) and, consequently, has become a limiting factor for crop quality and yield in many agricultural lands worldwide (Treutter et al, 2010). The fertilization with Nitrogen (N), for instance, could increase several other nutrients, such as phosphorous (P), potassium (K), iron (Fe) and zinc (Zn) content in corn grains (White and Broadley, 2009), and foliar application of Zn, mainly on Zn poor soil, could also increase the content of this mineral in grains (Cakmak, 2008).

On the other hand, maize grains are a considerable source of poliphenols, especially phenolic acids such as ferulic, caffeic and p-cumaric (Sosulski et al, 1982). It also displays great natural variation for carotenoid composition, including vitamin A precursor's α -carotene, β -carotene, and β -cryptoxanthin, and the xanthophylls lutein and zeaxanthin, mostly found in its composition (De Oliveira and Rodriguez-Amaya, 2007). These compounds have an important role as antioxidants and regulators of the immune system, resulting in prevention of cardiovascular diseases, as well as several types of cancer and other age-related diseases (Fraser and Bramley, 2004). Due to this and despite their presence in maize grains, phenolic compounds and, mainly, carotenoids are also important targets for biofortification efforts, especially vitamin A precursor, because its dietary

deficiency is related to eye diseases in many development countries that have maize as their major dietary source.

However, few studies about mineral fertilization have been developed to improve the content of these compounds. For example, in pepper, the increase in Ca^{2+} and NO_3^- concentrations in the root medium improved lycopene and β -carotene contents (Flores, 2004). Furthermore, quantities of anthocyanins and phenolic compounds were significantly increased in plants treated with selenium (Hawrylak-Nowak, 2008), and increases in the amounts of flavonoids and hydroxycinnamic acid derivatives were also revealed after sulfur fertilization on broccoli (Vallejo et al, 2003). Despite of these promising results, they usually are culture, dose and fertilizer source dependent (Flores et al, 2009). Moreover, one bottleneck of this agronomic intervention is the cost and environmental impact of solid fertilizers, generated by the increase in its use, since a great part of them is leached (Cakmak, 2008). Thus, new investigations on alternative and natural sources of fertilizers and/or inducing products, capable to deal with gradual poorness of soil, avoid contaminations, as well as maximize plant mineral uptake and increase quality and yield, are of great interest.

Foliar fertilization with micronutrients have been intensively used in late years due to the development of hybrids maize which have high productivity potential but associated with a high nutritional demand, as well as the use of fertilizers formulas more based on macronutrients increasingly pure and free (low content) of micronutrients (Coelho and Filho, 2006). Moreover, spray allows application in the right moment during plant development, below uniformity in nutrient distribution and increase nutrient absorption, avoiding losses (Brakemeier, 1999). Foliar fertilization strategies are usually more adequate on big commodities production and can be costless since generally is used concomitantly with herbicide and insecticide application. More recently, the use of bioactive substances, such as chitosan (Abdel-Mawgoud et al, 2010), benzothiadiazole (Iriti and Faoro, 2003), glyphosate (Shahawy and Sharara, 2011), salicylic acid (Horváth et al, 2007) and some phytohormones (Ilias et al, 2007), which can be applied concomitantly with foliar fertilizer, have also shown promising results in influencing plant growth and development, playing a role on genes expression, plant defense metabolism, as well as increasing mineral nutrients uptake (Lauxen et al, 2010).

Shale water (SW), the water from inside shale pyrobituminous rock, which is extracted during the pyrolysis process to obtain, for instance, fuel oil, sulfur and gas

(LPG), shows a composition based on several phenols compounds, minerals and trace elements of interest for plant nutrition, suggesting its use in agriculture, with environmental and food safety (Messias et al, 2011). This study aims to evaluate the effect of foliar application of shale water, delivered with or without micronutrients enrichment, on vegetative growth, yield and quality of maize grains.

2 Methods

2.1 Experimental design and treatments

The maize hybrid (*Zea mays*) Pioneer 30F53 was grown on field in random plots constituted by four rows, 10 m long, spaced by 0.80 m and 0.25 m between plants. The experiment was conducted from January to April, 2010, in Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. The experimental area is an Ultisol. The results for soil samples analysis are shown in Table 1. During sowing, 280 kg ha⁻¹ of the formula 10-20-10 (N-P-K) was applied as basic fertilization (66% of recommended fertilization). Thirty days after germination, the application of nitrogen at 90 kg N ha⁻¹ (66% of recommended fertilization), as urea, was made. The experiments were composed by six treatments with random blocks design and five replicates (Figure 1; Table 2), including treatments with shale water delivered with or without mineral enrichment. Shale water used was previously physical-chemical characterized (Messias et al, 2011).

Table 1. Average values for soil analysis^a of the experimental área use in the experiment.

Clay %	CEC efective	CEC pH 7.0	O.M. %	pH in water	SMP index	BS cmol _c dm ⁻³	P --- mg dm ⁻³ ---	K
19.67	5.53	9.02 ^{b**}	1.25*	5.60**	6.20	60.92*	5.13*	58.67**
Ca --- cmol _c dm ⁻³ ---	Mg	S	Na	B	Cu mg dm ⁻³	Fe	Mn	Zn
3.30**	2.05***	7.35***	9.17	0.20**	0.43**	1.62**	3.47**	0.33**

^aAccording to Tedesco et al. (1995).

^bSoil fertility diagnosis according to CQFS (2004). Interpretation: *Low, **Medium and ***High.

The formulations were adjusted to pH 5.0 - 6.0 using chloridric acid (Vetec[®]) when necessary. A surfactant plus mineral oil was used to increase adherence and homogenize applications. Treatments applications were conducted using a pressurized sprayer (CO₂), set at a flow rate of 100 L ha⁻¹. The first two applications occurred during the vegetative

growth period (V6-V8 and V9-V10), and the third during the reproductive phase (spraying flowering and pollination, R1), according to Hanway (1966), totalizing the doses described in Table 2. At the same day, during kernel dough stage (R4, according Hanway, 1966), three cobs from the useful area of each plot (two central rows), were collected and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until analysis. At physiological maturity, the remaining cobs and aboveground plants from the useful area were harvested, weight, and dried at 65 °C to approximately 13% moisture content. Productivity data was calculated on 13% moisture basis.

Table 2. Description of treatments and doses applied to maize.

Description of Treatments	Code	Micronutrients added (concentrations) ^a	Schist Water - Total dose applied (L ha ⁻¹) ^b
Control (Without foliar application)	C	-	-
Micronutrients diluted in Distilled Water ^c	DW-M1	Zn (8%); Cu (1.5%); Mn (1.5%); Mo (0.5%); B (0.5%)	0 ³
Micronutrients diluted in Shale Water	SW-M1	Zn (8%); Cu (1.5%); Mn (1.5%); Mo (0.5%); B (0.5%)	7.5
Shale water dose 1	SW-1	Without mineral enrichment	7.5
Micronutrients diluted in Shale Water	SW-M2	Zn (12%); Cu (0.8%)	7.5
Shale Water dose 2	SW-2	Without mineral enrichment	21.0

^a DW-M1, SW-M1 and SW-M2 treatments presented 6.3, 6.8 and 6.1% of Sulfur, respectively, coming from sulfates in salts used (ZnSO₄, MnSO₄, CuSO₄, H₃BO₃, (NH₄)₆Mo₇O₂₄).

^b Divided in three applications containing 1/3 of the total dose each.

^c Shale water was substituted to distilled water with the same dose (7.5 L ha⁻¹).

2.2 Amino acids composition and carbohydrate content of maize grains

All determinations were made in three analytical replicates on five field replicates of cobs collected together during kernel dough stage (R4), with an average of 62.6% moisture.

The free amino acids were extracted from 50 mg of lyophilized maize grains

samples with 25% acetonitrile in 0.1N chloridric acid solution, and filtered in a 0.45 μm PTFE syringe after centrifugation of the supernatant at 18.890 g, and analyzed by gas chromatography (GC-FID, Shimadzu) with a capillary column ZB-AAA using the Ez:faast kit (Phenomenex®). The carrier gas used was nitrogen, with the flow of the column adjusted to 2 mL min^{-1} and pressure of 60 kPa. The flow rate valve was split 1:17 and the injection and detection temperature was 280 and 320 $^{\circ}\text{C}$, respectively. The injected volume was 2 μL . The results were expressed in micrograms per gram of dry weight ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW).

The starch and the total soluble sugar content in maize grains were quantified by the method with anthrone (Hodge and Hofreiter, 1962) and their concentrations were expressed in milligrams of glucose per gram of dry weight (mg g^{-1} DW).

2.3 Mineral composition of maize grains

The mineral composition was quantified by atomic absorption spectrometry (AAS) (Varian™ AA240FS) from 250 mg of dried maize grains samples digested with 1 mL of H_2O_2 and 5 mL of HNO_3 in microwave, according to da Silva (2009). The nitrogen, carbon and sulfur content was carried out on CHN-S analyzer coupled (LECO®). Means value from three replicates, were expressed in grams per kilogram for macronutrients and milligrams per kilogram for micronutrients, both in dry weight (mg kg^{-1} DW).

2.4 Assessment of secondary metabolism

For each procedure the lyophilized grain (except for gene expression determination) samples, collected together at R4 stage, were crushed with mortar and pestle using liquid nitrogen.

To determine antioxidant activity the methods from Brand-Williams et al (1995) and Arnao et al (2001) were used. Data were presented as microgram equivalent Trolox per gram of grain, in dry weight ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW).

Phenolic compounds were quantified by the method from Adom and Liu (2002). Data were presented as milligrams of chlorogenic acid equivalents per 100 grams of grain (mg 100 g^{-1} DW).

Total carotenoids content was quantified by the method adapted from Rodriguez-Amaya and Kimura (2004). Data were calculated based on a β -carotene curve and presented in μg of β -carotene equivalents per gram ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW).

2.4.1 Transcript accumulation of genes involved in carotenoid biosynthesis

To evaluate the expression of genes phytoene synthase (*psy1*), carotenoid ϵ -hydroxylase (*cyp97c*) and β -carotene hydroxylase (*hyd3*), entire maize grains were crushed

with mortar and pestle using liquid nitrogen. Two replicates of each sample were subjected to total RNA isolation using a CTAB modified protocol, previously adapted (Messias et al, 2010). 1.25mL of extraction solution (2% CTAB - hexadecyltrimethylammonium bromide, 2% PVP - polyvinylpyrrolidone, 2 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA and 3.3% β -mercaptoetanol), previously heated at 65 °C, were added to microfuge tubes containing 100 mg of milled sample, and incubated at 65 °C for 3 min. Then two extractions were made with an equal volume of chloroform-isoamyl alcohol (24:1), homogenized by inversion for 5 min and centrifuged at $7300 \times g$ for 20 min. The upper phase was recovered and precipitated overnight at -20 °C with $\frac{1}{4}$ of 10 M LiCl. After this period the samples were centrifuged at $18000 \times g$ for 30 min at 4 °C. The pellet was resuspended at 65 °C for a few minutes with 70 μ L of SSE buffer (1 M NaCl, 0.5% SDS, 10 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) and extracted twice with an equal volume of chloroform: isoamyl alcohol (24:1). The upper phase was precipitated with 364 μ L of 100% ethanol and 18 μ L of 3 M sodium acetate pH 5.5, for 1 h at -70 °C, followed by centrifugation at $18000 \times g$ for 20 min at 4 °C. The pellet was washed twice with 70% ethanol and resuspended in DEPC (Invitrogen™) water with 0.1 mM EDTA.

The two analytical samples of isolated RNA were pooled and the quality of it was evaluated by electrophoresis on 1% agarose gel stained with ethidium bromide and by spectrometry, using A260/A280 and A260/A230 ratio. The concentration was measured in Qubit® fluorometer (Invitrogen™). One μ g of total RNA was digested with 1 U DNase, according to manufacturer's instructions (Invitrogen™). Total RNA was used for reverse transcription using M-MLV enzyme (Invitrogen™), according to manufacturer's instructions. For Real time PCR reaction, specific primers were designed on Vector NTI 11 Program (Invitrogen) or according to literature and all amplicons were designed to be < 150 bp (Table 2). The efficiency of them was previously verified in real time PCR using serial concentrations of a reference cDNA, was *psy1* = 92.5 %; *cyp97c* = 98.1 %; and *hyd3* = 96.5 %.

The PCR conditions used were as follows: final volume of 20 μ l containing 150 ng of cDNA, 3-10 μ mol of each primer, 3-5 mM MgCl₂, 10 μ l Platinum Sybr UDP Mix (Invitrogen™). The amplification was standardized in 7500 Fast thermal cycler (Applied Biosystems™) using the following conditions: 50 °C for 20 s, 95 °C for 10 s, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 60 s at 60 °C. Melt curve conditions used was: 15 s at 95 °C, 60 s at 60 °C, 30 s at 95 °C and 15 s at 60 °C. The PCR product was subjected to

electrophoresis on 1% agarose gel for verification of unspecific bands. The housekeeping genes actin (*act*), ubiquitin (*ubi*) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) were analyzed using the geNorm software package (Vandesompele et al, 2002) and *actin* was chosen as control. Results were obtained by the mean of three field and three analytical replicates of each treatment. The values of relative quantification were generated according to Pfaffl (2001) and presented as fold changes.

Table 3. *Zea mays* selected genes, GenBank access and primers designed to Real time PCR analysis.

Gene	GenBank access	Primer
<i>cyp97c</i>	BE552887	F: 5'-GTTGACATTGGATGTGATTGG-3' R: 5'-AACCAACCTTCCAGTATGGC-3'
<i>psy1</i>	AY296446	F: 5'-GACAGATGAGCTTGTAGATGGGC-3' R: 5'-TCAGAGAGAGCGGCATCAAGCA-3'
<i>hyd3</i>	AY844957	F: 5'-GGGGATTACGCTGTTTCGG-3' R: 5'-GTGGTGTATCTTGTGCGAGG-3'
<i>act</i>	J01238.1	F: 5'-CATGGAGAACTGGCATCACACCTT-3' R: 5'-CTGCGTCATTTTCTCTCTGTTGGC-3'
<i>Ubi</i> ^a	-	F: 5'-GTTTAAGCTGCCGATGTGCCTG-3' R: 5'-GACACGACTCATGACACGAACAGC-3'
<i>Gapdh</i> ^b	-	F: 5'-ACTGTTTCATGCCATCACTGC-3' R: 5'-GAGGACAGGAAGCACTTTGC-3'

^a According to Miller et al (2008)

^b According to Luo et al (2008)

2.5 Statistical analysis

The results were subjected to analysis of variance between treatments with a confidence *p*-level of 1% or 5% by Tukey average test. Spearman's test was used to correlate treatments. All statistical analysis was conducted on Systems Analysis Software (SAS Institute, 2004).

3 Results

3.1 Evaluation of foliar application of shale water on maize growth and yield

The vegetative growth and yield data allowed to observe that SW-2 treatment showed significantly higher fresh weight and yield values than control (C), with the dry

weight value showing the same behavior (Figure 1A and 1B). More specifically, the foliar spraying of SW-2 (21 L hec^{-1}), delivered without enrichment, showed an average of $16.75 \text{ tons hec}^{-1}$ of fresh aboveground biomass and $7.48 \text{ tons hec}^{-1}$ of yield, while control, without any foliar treatment, showed an average of 12.90 and $6.39 \text{ tons hec}^{-1}$, respectively. This increase of 30% in the fresh weight with a corresponding increase of 12% in dry weight could be of interest if the crop main goal is silage. On the other hand, the application of 7.5 L hec^{-1} of SW (SW-1) did not increased weight and yield, indicating a dose dependent effect.

The enrichment of SW with micronutrients (SW-M1 and SW-M2) also showed yield improvement in relation to control, but not on growth data. Moreover, they showed similar effects to SW-2 treatment, concerning on the yield. Since these treatments have a lower dose of SW than SW-2 treatment, they may represent an alternative strategy instead of using just SW, if yield is the parameter of interest, indicating that micronutrients supplying affects more grains production than plant growth. This is coherent with findings that micronutrients could positively influence synthesis and translocation of photo assimilates.

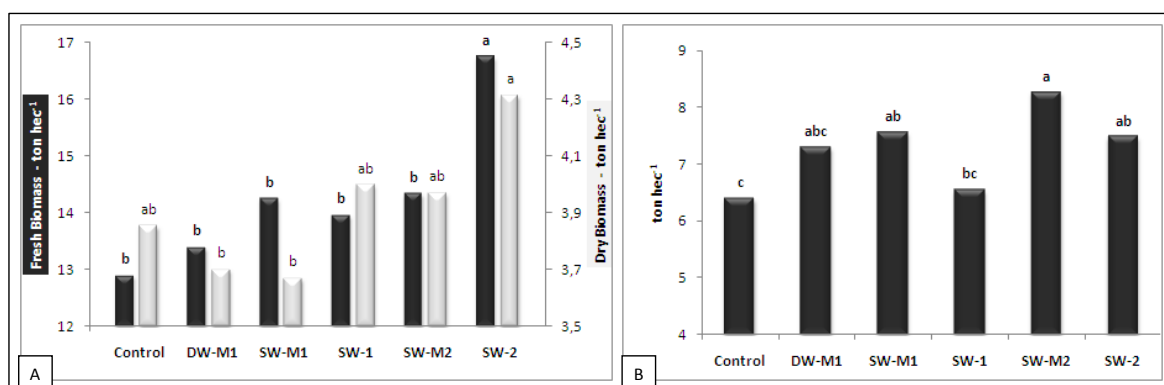


Figure 1. A) Fresh and dry weight of maize plants, and **B)** Yield of maize grains, as follow: Control - control without foliar spray; DW-M1 - formulation with micronutrients in distilled water (7.5 L ha^{-1}); SW-M1 - formulation with the same micronutrients concentration of DW-M1 in shale water (SW) (7.5 L ha^{-1}); SW - M2- formulation containing Zn and Cu in SW; SW-1 and SW-2 - shale water applied at rates equivalent to 7.5 L ha^{-1} and 21 L ha^{-1} , respectively. Different letters represent significant difference at 5% confidence level by Duncan's test between treatments for the same dependent variable.

3.2 Evaluation of foliar application of shale water on starch and total soluble sugar accumulation in maize grain

The treatments with doses of SW (SW-1 and SW-2) and the enriched treatment SW-M2 showed statistically more starch accumulation with a better conversion rate of

sugar to starch than the others, at R4 stage (Figure 2A), which is in agreement with the results of yield for these treatments (Figure 1). At physiological maturity, they also accumulated the highest contents of starch (Figure 2B); however, only SW-2 treatment showed high starch/TSS ratio, whereas SW-1 and SW-M2 treatments showed great amounts of soluble sugars, which could have a negative effect, since these grains stay more susceptible to insects during storage. Interestingly, grains from control treatment (C) showed an increased amount of starch at maturity stage, by converting the high TSS content, observed at at R4 stage, to starch, similar to the accumulation of treatments DW-M1 and SW-M1. These results indicates that the TSS translocation and/or starch accumulation processes in treatment C were possibly later than the others that received foliar applications. Furthermore, it seems that SW contribution in starch accumulation was higher than micronutrient supplementation, since the starch content was equal or even higher on SW-1 treatment, without micronutrients enrichment, than SW-M1 and SW-M2.

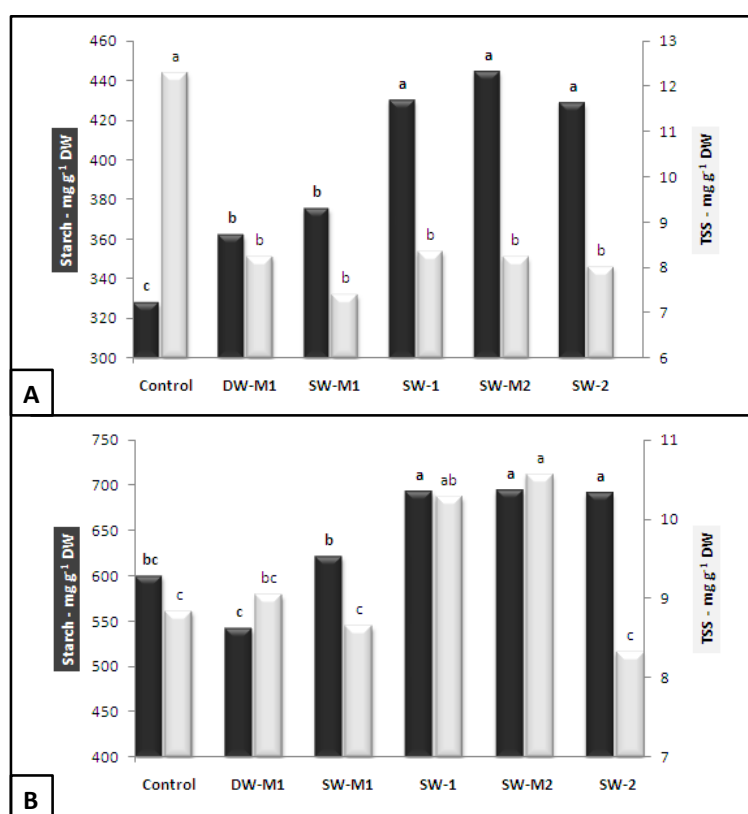


Figure 2. A) Starch and total soluble sugars (TSS) content in maize grains at R4 stage, and **B)** Starch and total soluble sugars (TSS) content in maize grains at harvest, as follow: Control - control without foliar spray; DW-M1 - formulation with micronutrients in distilled water (7.5 L ha^{-1}); SW-M1 - formulation with the same micronutrients concentration of DW-M1 in shale water (SW) (7.5 L ha^{-1}); SW - M2- formulation containing Zn and Cu in SW; SW-1 and SW-2 - shale water applied at rates equivalent to 7.5 L ha^{-1} and 21 L ha^{-1} ,

respectively. Different letters represent significant difference at 5% confidence level by Tukey test between treatments, for the same dependent variable.

3.3 Evaluation of foliar application of shale water on free amino acids content in maize grains

The evaluation of free amino acids in maize grains, at R4 stage, showed that, compared to control, foliar application with the higher dose of SW (SW-2) resulted in improvement of alanine, proline, valine and asparagine (Figure 3). However, the same result was not observed on SW-1 treatment, indicating that the accumulation of some amino acids is dependent of the dose applied. It is also significant to note the decrease on the content of some amino acids, mainly lysine, a limiting aminoacid in maize, and phenilalanine, a key amino acid in the synthesis of proteins and phenolic compounds.

On the other side, when SW was enriched with minerals on SW-M2 treatment, all free amino acids evaluated (except proline) were increased or equal compared to control. The same behavior was observed in the amino acids profile comparing the treatments SW-M1 and DW-M1, showing the influence of the interaction between SW and minerals supplied.

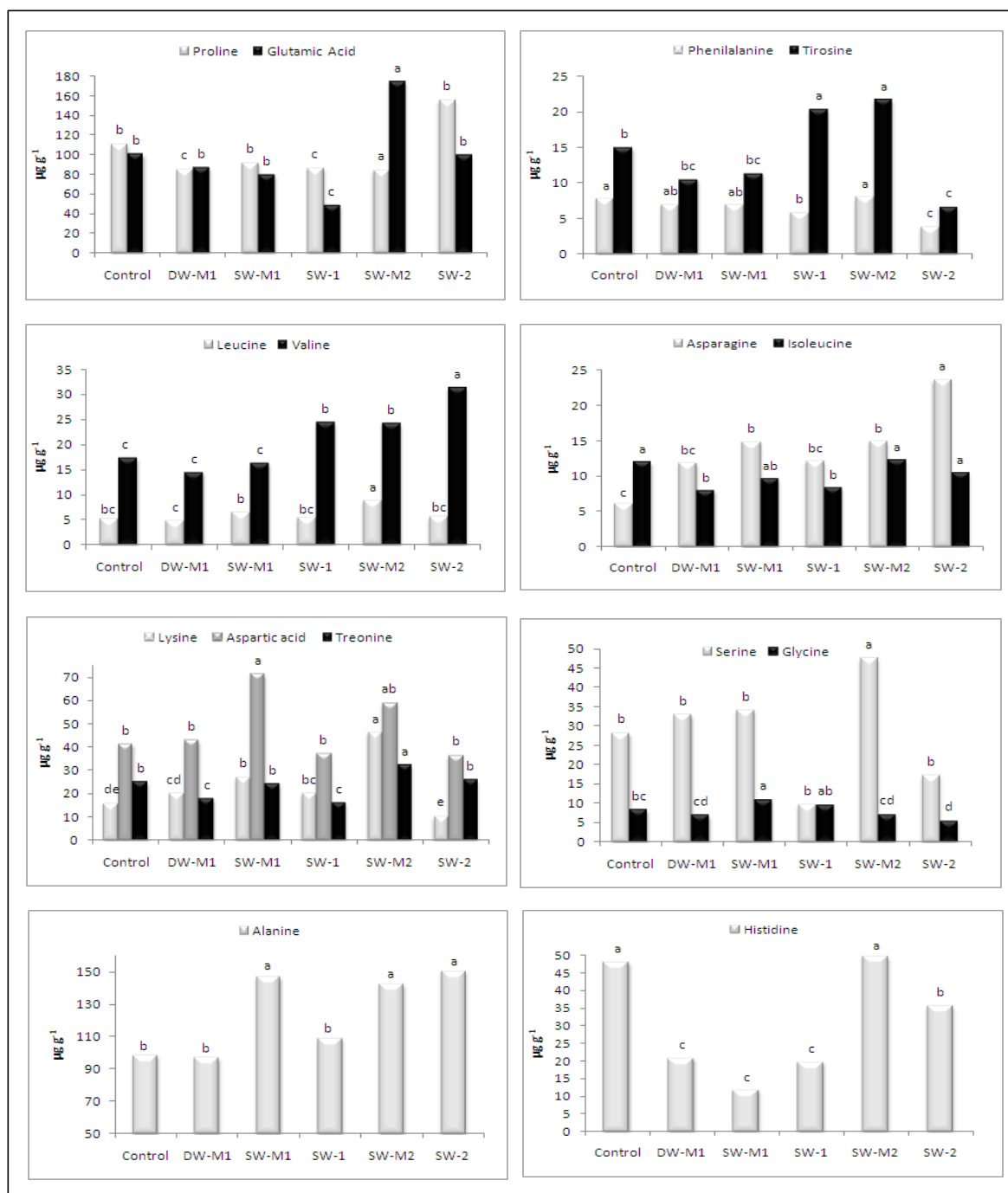


Figure 3. Free amino acids content of maize grains collected at R4 stage, as follow: Control - control without foliar spray; DW-M1 - formulation with micronutrients in distilled water (7.5 L ha⁻¹); SW-M1 - formulation with the same micronutrients concentration of DW-M1 in shale water (SW) (7.5 L ha⁻¹); SW - M2- formulation containing Zn and Cu in SW; SW-1 and SW-2 - shale water applied at rates equivalent to 7.5 L ha⁻¹ and 21L ha⁻¹, respectively. Data shows means of three field and analytical replicates. Different letters represent significant difference at 5% confidence level by Tukey test for the same dependent variable.

3.4 Evaluation of foliar application of shale water on mineral content in maize grains

The enrichment of foliar treatments with micronutrients (DW-M1, SW-M1 and SW-M2) significantly increased its levels on maize grains, compared to control. The foliar fertilization of maize with SW-2 allowed higher accumulation of K, Cu, Fe, Mn and Zn on grain, compared to control (Table 4). The two doses of SW applied (SW-1 and SW-2) did not show significant difference in mineral accumulation. The mineral enrichment in SW-M1 and SW-M2 treatments resulted in the accumulation of Zn in higher concentration than SW delivered alone. However, SW-M2 treatment inhibited the accumulation of Fe and affected negatively the accumulation of N and Ca compared to SW-M1 treatment, indicating an antagonistic effect with the enhancement of Zn in the formulation. SW-M1 treatment increased N, Ca, Cu and Fe content compared to DW-M1, which was probably an effect of the presence of SW in the formulation, due to the similar significance of many minerals accumulation between treatments SW-M1 and SW-1.

Table 4. Mineral composition of maize grains treated with foliar fertilizer formulations.

Mineral	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn
Treatment ^a	g kg ⁻¹						mg kg ⁻¹			
REF. ^b	-	2.100	2.870	0.070	1.270	-	3.140	27.000	4.850	22.100
Control	10.320 cd ^c	3.271 a	2.185 b	0.069 a	0.912 a	1.262 a	1.817 d	13.333 c	3.350 d	11.970 d
DW-M	10.950 bc	2.869 a	2.472 ab	0.044 bc	0.816 a	1.248 a	2.938 c	14.500 bc	4.600 bc	19.495 bc
SW-M1	12.508 a	3.013 a	2.864 a	0.066 a	0.809 a	1.303 a	3.300 b	16.650 a	5.230 ab	21.462 ab
SW-1	11.578 ab	3.147 a	2.878 a	0.070 a	0.865 a	1.315 a	3.550 ab	14.150 bc	5.150 ab	18.403 c
SW-M2	10.465 bc	2.865 a	2.513 ab	0.039 bc	0.726 a	1.228 a	3.500 b	13.680 c	4.870 ab	22.149 a
SW-2	11.240 bc	3.352 a	2.934 a	0.055 ab	0.848 a	1.304 a	3.780 a	15.730 ab	5.710 a	18.972 c

^a Control - control without foliar spray; DW-M1 - formulation with micronutrients in distilled water (7.5 L ha⁻¹); SW-M1 - formulation with the same micronutrients concentration of DW-M1 in shale water (SW) (7.5 L ha⁻¹); SW - M2- formulation containing Zn and Cu in SW; SW-1 and SW-2 - shale water applied at rates equivalent to 7.5 L ha⁻¹ and 21L ha⁻¹, respectively.

^b All values from USDA National Database for Standard Reference. Available in: www.ars.usda.gov/nutrientdata.

^c Mean of five field and two analytical replicates and statistical significance at 5% level of confidence by Tukey test for the same dependent variable.

3.5 Evaluation of foliar application of shale water on secondary metabolites content in maize grains

The liposoluble fraction of antioxidant activity as well as bound phenolics compounds were higher than hidrosoluble fraction of antioxidant activity and free phenolic compounds, respectively, in all treatments with foliar applications (Figure 4A and B). Liposoluble fraction corresponded to about 85% of total antioxidant activity, and it showed 0.51 ($p < 0.01$ by Spearman's test) of correlation with total carotenoids (Figure 5A), among treatments, indicating an important role of these compounds on antioxidant activity of maize grains. Similarly, hidrosoluble fraction of total antioxidant activity showed 0.56 of correlation ($p < 0.01$) with free phenolic content.

The liposoluble fraction of antioxidant activity (Figure 4A) and total carotenoids (Figure 5A) evaluated in maize grains treated with SW-2 were higher than the other treatments. On the other hand, total phenolic compounds content was significantly increased in SW-M2 treatment compared to others (Figure 4B), due to the increase in free and conjugated phenolic content. No significant differences were found in total phenolic compounds, and their fractions, in function of SW doses applied (SW-1 and SW-2). However, total antioxidant activity was increased in SW-2 due to the higher activity of liposoluble fraction, probably related with the increase in total carotenoids in this treatment (Figure 5A).

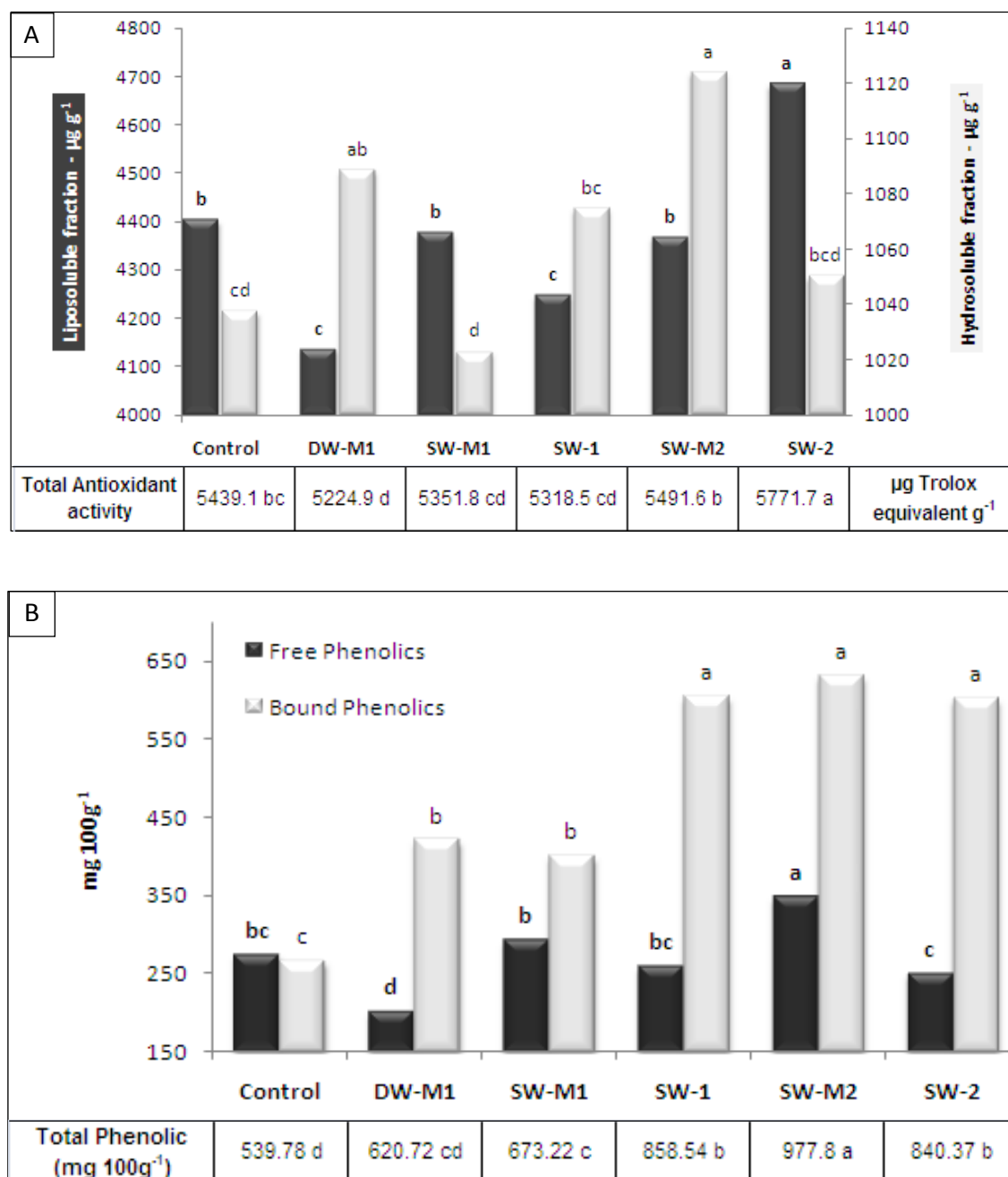


Figure 4. **A)** Antioxidant activity of liposoluble and hydrosoluble fractions in maize grains sprayed with six distinct foliar fertilization and harvested at R4 stage. Data are presented in microgram equivalent Trolox per gram of grain ($\mu\text{g g}^{-1}$). **B)** Free and bound phenols in maize grains sprayed with six distinct foliar fertilization and harvested at R4 stage. Data are presented in milligrams of chlorogenic acid equivalents per 100 grams of grain ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$). Control - control without foliar spray; DW-M1 - formulation with micronutrients in distilled water (7.5 L ha^{-1}); SW-M1 - formulation with the same micronutrients concentration of DW-M1 in shale water (SW) (7.5 L ha^{-1}); SW - M2- formulation containing Zn and Cu in SW; SW-1 and SW-2 - shale water applied at rates equivalent to 7.5 L ha^{-1} and 21 L ha^{-1} , respectively. Data

shows means of five field and two analytical replicates. Different letters represent significant difference at 5% confidence level by Tukey test for the same dependent variable.

Since the carotenoid content was higher on SW-2 treatment, the expression of genes involved on the synthesis of these compounds were evaluated (Figure 5A). In fact, the highest carotenoid content on this treatment was directly related to the upregulation of *psy1*, *hyd3* and *cyp97c* genes, whose transcript accumulation correlated significantly with total carotenoids determined among different treatments (86.02%, 83.6% and 74.9%, respectively). The expression of the key gene of carotenoid pathway *psy1* was 1.408, 1.321 and 2.157 fold higher than the control in treatments SW-M1, SW-1 and SW-2, respectively. *cyp97c* and *hyd3* genes were also upregulated in all treatments, except SW-M1, and were more expressed in SW-2 treatment than the others. In this treatment, there was also a *hyd3/cyp97c* ratio of 4.5 folds (Figure 5B). The same association was observed in the other treatments but with different ratios (C - 3.7 fold; DW-M1 - 3.9 fold; SW-M1 - 3.2 fold; SW-1 - 3.8 fold; and SW-M2 - 3.1 fold), indicating a greater allocation to the carotenoids metabolic pathway branch associated to the synthesis of β -carotene, β -cryptoxanthin and zeaxanthin. In summary, there was a close relationship between transcript accumulation and carotenoid contents, indicating that transcription and physiological response occurs simultaneously.

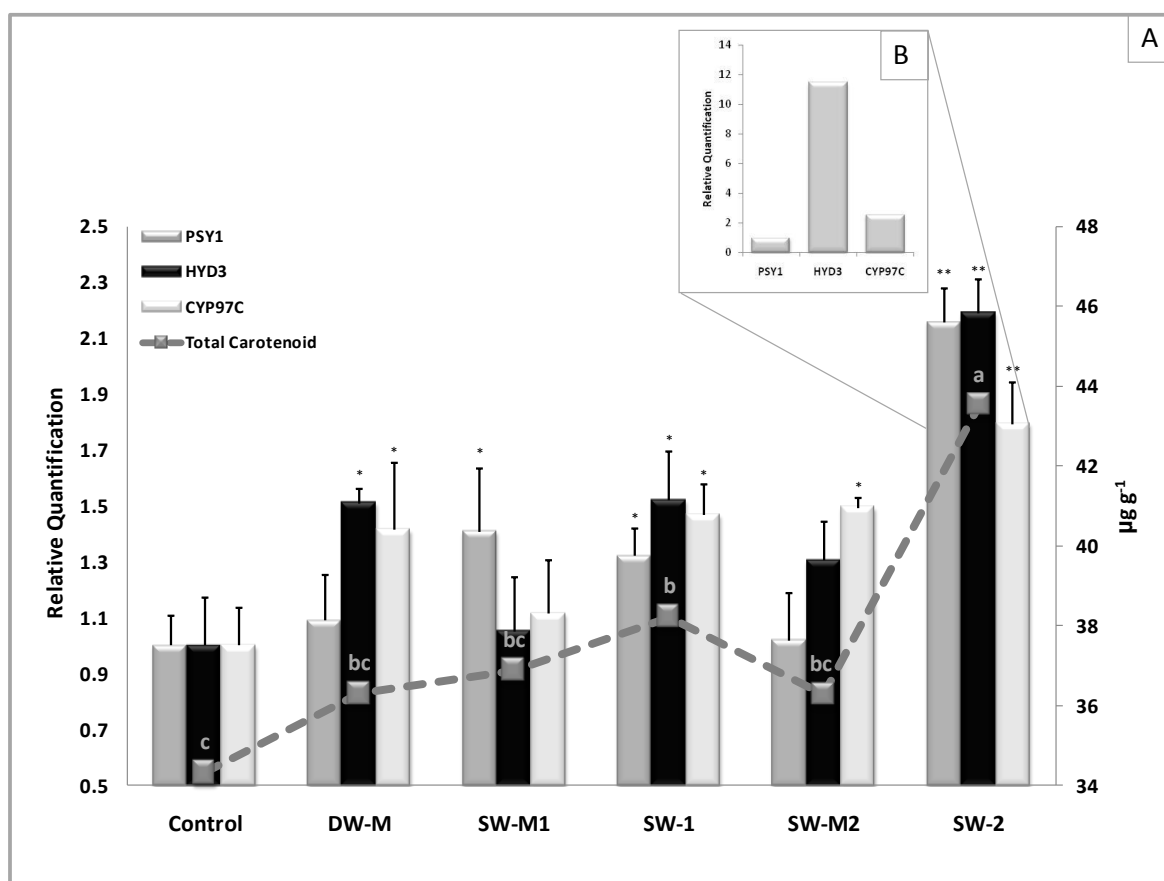


Figure 5. A) Total carotenoids content (μg of β -carotene equivalents g^{-1}) and the relative expression compared to control (based on the calculation of Pffal, 2001) of genes encoding phytoene synthase (*psy1*), ϵ -carotene hydroxylase (*Cyp97c*) and β -carotene hydroxylase (*Hyd3*), in maize grains sprayed with six foliar fertilization and harvested at R4 stage. **B)** Relative expression of *Cyp97c* and *Hyd3* compared to *psy1* expression in maize grains sprayed with foliar fertilization SW-2 (21L SW ha^{-1}). Control - control without foliar spray; DW-M1 - formulation with micronutrients in distilled water (7.5 L ha^{-1}); SW-M1 - formulation with the same micronutrients concentration of DW-M1 in shale water (SW) (7.5 L ha^{-1}); SW - M2 - formulation containing Zn and Cu in SW; SW-1 and SW-2 - shale water applied at rates equivalent to 7.5 L ha^{-1} and 21L ha^{-1} , respectively. Different letters represent significant differences at 5% confidence level by Tukey test. One asterisk indicates treatments that differ from control and two asterisk the treatments that differ from all other treatments, based on standard deviation between replicates.

4 Discussion

Foliar spraying of fertilizers and/or inductors is an important strategy to biofortify crops, since it has shown to improve absorption and/or translocation of minerals via xylem, nutritional and functional compounds as well as enhance vegetative growth and yield (Brakemeier, 1999; Hawrylak-Nowak, 2008). In this study, foliar application of 21L ha^{-1}

shale water (SW), distributed throughout the crop cycle, induced vegetative growth of maize plants, possibly by the improvement of plant nutrition and/or influence on the uptake and accumulation of some minerals, such as K, Cu, Fe, Mn and Zn, compared to control (Table 4). Some of these minerals, K, Cu and Mn, for instance, play an important role in photosynthesis (Glinicki et al, 2010; Kirchmanna and Eskilsson, 2010), which could contribute to explain fresh weight observed in SW-2. It also may provide a better performance to generate energy and to convert it into structural and storage plant compounds, whereas a significantly increase in yield, with a positive relationship with starch content in grains, was observed in this treatment.

Accumulation of potassium (K) is also associated with improvement of nutrients absorption, since it is responsible for the correct osmotic gradient, and plays a role in the transport of photoassimilates products in plants. Consequently, the dry weight is directly affected by the concentration of K (Glinicki et al, 2010). Manganese (Mn), as well, has shown positive influence in grains yield (Abbas et al, 2011), and its foliar application has also improved yield and seed quality (Dordas, 2009).

Several other minerals non-assessed in this study, but present in the SW matrix (Messias et al, 2011), could also have contributed to the observed results, such as, silicon (Si), whose foliar fertilization has shown beneficial effects in plants, improving yield, mainly on grass (Resende et al, 2009). Chlorine (Cl) also present in SW composition, is an essential micronutrient in the photosynthesis process, and sodium (Na) may replace K in certain metabolic and osmotic functions and may also facilitate the absorption of N, P and K in C₄ plants such as maize, being necessary in the CO₂ transport to the cells, where it is reduced to carbohydrates (Fernandez, 2006).

Despite that yield remains the aim of agronomic efforts, quality of maize is also important, particularly for people whose main source of food is this grain. SW-2 application, besides improving yield, resulted in a higher accumulation of essential mineral nutrients, whose levels and balance are inadequate in grains, and starch, important to provide energy in diet, acting in the reduction of cholesterol and stimulating the immune system among others (Meyer et al, 2000). Total antioxidant activity was also significantly increased due to the application of SW-2 by inducing high bound phenolic and total carotenoid contents, both related to the prevention of chronic diseases and cancer (Liu, 2007; Scalbert et al, 2005). The increase in total antioxidant activity, such as observed in SW-2 treatment, at least in part, was also caused by the increase in Cu, Mn and Zn

accumulation in grains, which are associated with the activity of superoxide dismutase, an antioxidant enzyme (Hänsch and Mendel, 2009). Studies towards biofortification of carotenoids in maize, especially those with pro-vitamin A activity (α and β -carotene, cryptoxanthin), have also been a focus of great interest (Vallabhaneni et al, 2009a).

The effect SW-2 treatment on the carotenoid content was directly related to upregulation of key genes associated to its accumulation in maize grains (Figure 5A) and whose correlation with total carotenoid content have already been proved by other studies (Li, 2008; Vallabhaneni, 2009a and 2009b). As far as we know, there are no other reports evaluating the influence of fertilization on induction of these genes, despite the fact that they are widely known and studied in maize (Gallagher et al, 2004; Li et al, 2008; Vallabhaneni et al, 2009b). The induction of transcript levels (approximately two fold higher than control) occurred both, at the beginning of this metabolic pathway, increasing *psy1* expression (coding for the enzyme phytoene synthase) and at the end, increasing expression of genes encoding for enzymes directly associated to β -carotene, β -cryptoxanthin and zeaxanthin synthesis (*Hyd3*), and lutein synthesis (*Cyp97c*). In all treatments there was a greater allocation to the production of compounds from metabolic pathway branch associated to *Hyd3* expression instead of the ones associated to *Cyp97c* expression (Figure 5B), probably because yellow grain, such as the hybrid used in this study, usually shows high levels of zeaxanthin/lutein ratio (Zhu et al, 2008).

The well-known growth and differentiation balance hypothesis (GDBH) implies that there is a physiological trade-off between growth and secondary metabolism imposed by developmental constraints in growing cells, and by competition between primary and secondary metabolic pathways in mature cells (Herms and Mattson, 1992; Loomis, 1932). The SW-M1 treatment, for example, supported this hypothesis, since increased N accumulation and yield, without increasing the levels of phenolic compounds. This effect would occur by competition with phenylalanine. However, with a moderate nutrient availability both, growth and secondary metabolism increase until the net assimilation ratio stabilization, when the growth ratio increased over the secondary metabolism. In addition, as proposed by Glynn et al (2007), sometimes it could have a quadratic behavior involving a temporal response of secondary metabolism to environmental variation. This kind of response predicts that secondary metabolite concentration can either increase or decrease in response to increase in resource availability, depending on the initial physiological status of the plant and the magnitude of the treatment. So, in a non-equilibrium condition

(natural environmental variation) with highly dynamic nutrient availability, it is possible that single temporal measure of secondary metabolism represent a transient status that never equilibrates, depending on treatment levels employed, when plants are sampled, and the rate and degree to which plants acclimate to changes in fertility. This trade-off between secondary and primary metabolism was also observed to be affected by genome background, environment behavior, plant competition as well as doses of fertilizers in the study of de La Fuente et al. (2003).

The SW-2 treatment seems to induce a similar behavior, since stimulated growth and, during reproductive phase this treatment also promotes increase in the levels of secondary metabolites beyond primary metabolites production. Thus, the positive influence of SW-2 on both metabolisms could also be, at least in part, associated with the foliar applications strategy used, since the third application was done during reproductive phase, providing an extra amount of nutrients, inducing secondary metabolism without negative interference in starch synthesis from sugar previously accumulated on leaves and translocated to grain. Similar effects was obtained with foliar fertilization combined with a growth regulator activity compound (Geneva et al, 2008), suggesting that SW may act as fertilizer and stimulant of growth and secondary metabolism. Walter and Boyle (2005) have already observed that yield can increase, decrease or not be affected when a secondary metabolism is stimulated using a resistance inductor product in plants. Even a temporary decrease on yield was observed by the use of these inductors followed by a quick increase one week later. In general, some of these biostimulators substances, evaluated in several cultures, appears to influence metabolic reactions that stimulate the growth and development of plants, and may assist in the defense against biotic and abiotic stresses (Khan et al, 2009) with possible positive effect on yield and on quality of these crops (Gajc-Wolska et al, 2010). This could explain, at least in part, the better behavior of maize treated with SW.

It is also relevant to note that usually a negative correlation is observed between primary metabolites and total phenolic compounds (Glynn et al, 2007). In this study, the increase in vegetative growth, yield and starch content in fact showed a negative correlation with free phenolic compounds and hydrosoluble fraction of antioxidant activity in SW-2 treatment, compared to control. However, they correlated positively with lipophylic antioxidant fraction and bound phenolic compounds. Glynn et al (2007) also observed that primary metabolism correlate negatively with total phenolic compounds but

not with isolated phenols or terpenes. It seems that there is a lack on studies searching this correlation with bound phenolic compounds, which would be important in maize grains, since studies show that they can reach 85% of total phenolic compounds (Adom and Liu, 2002), and in this study, for SW-2 treatment, they corresponded to 71% of total phenolic compounds.

SW also presents in its composition various elements such as Cl and Na that, depending on the dose applied, could induce moderate non-harmful stress in plants, causing the increase of secondary metabolic compounds without significantly affecting the yield effectiveness. Several studies show that moderate water stress, can increase nutritional and functional value by the induction of hormones as ABA (abscisic acid), whose role in regulating development of plants in salt stress and water is well established (Kim et al, 2008; Cogo et al., 2011).

A possible evidence of this hypothesis was found by analyzing the content of free amino acids in maize grains sprayed with SW-2, which induced higher levels of valine, asparagine, alanine and proline (Figure 3). These last two amino acids together with glutamic acid (at levels significantly greater in SW-M2 treatment) are related to stress. Alanine play a role in the intracellular pH regulation in stress condition, being produced in large amounts in order to induce the increase of nitrogen to prepare the plant for the return of normal oxygen status during hipoxia (Miyashita et al, 2007). The accumulation of free proline in plants is widely observed in different abiotic stresses such as salinity and drought, acting in the stomata opening regulation of and osmotic processes. Studies show the influence of this amino acid in the synthesis of phenolic compounds (Ashraf and Foolad, 2007; Kishore et al, 2005), corroborating the data observed in SW-2 treatment.

The enrichment of SW with micronutrients according to maize crop requirement was tested in SW-M1 and SW-M2 treatments in order to verify if the effect of SW could be improved by this approach. Indeed, supplementation with micronutrients, including mainly Zn, allowed increased Zn accumulation in both treatments, representing a great nutritional and functional improvement, since this mineral is essential as transcript cofactor and plays a role in the antioxidant defense (Mafra, 2005). However, is important to evaluate its bioavailability in humans due to the presence of phytate in maize grains. In plants, Zn, whose absorption could be more effective via foliar application than via soil (Aref, 2011), have shown a direct relationship with yield (Cakmak, 2008), also observed in SW-M1 and SW-M2 treatments.

Nevertheless, SW-M2 treatment appears to have induced an inhibition of uptake and/or accumulation of N, Ca and Fe, when compared to SW-M1. So, the minerals concentration in the fertilizer appears to be also significant in relation to possible synergistic/antagonistic effects, since SW-M2 have higher concentration of Zn than SW-M1. Despite the current controversy, Reddy et al (2005) also observed an antagonism between Zn fertilization and Fe accumulation in sorghum crop. Likewise, Hotz (2007) suggests that great amounts of Zn may reduce the absorption of phosphorus, resulting in reduction of phytate accumulation, as a secondary effect, which would make Zn more available. On the other hand, Aref (2011) showed that application of Zn increased the uptake of Cu in maize grain, which was also observed in this study.

The application of SW-M2 also showed an increase on free phenolic content as well as hydrophilic fraction of antioxidant activity. However, major efforts on maize grains are focused on biofortification of carotenoids, which was smaller on this treatment compared to SW-2 treatment. However, the content of several free amino acids, such as lysine, leucine, treonine, glutamic acid, histidine, phenylalanine and serine was higher in SW-M2 treatment than the others. Lysine and glutamic acid, for instance, are important to pollination, and maybe influenced the great yield obtained in this treatment, being also a target in maize biofortification due to its essentiality in diet and its deficiency in maize grains (HUANG et al, 2004).

Summarizing, the results of this study showed that the use of foliar application of SW-2 influenced mineral and primary metabolites accumulation, which resulted in significant increase in vegetative growth, yield and nutritional improvement. This treatment also caused improvement of secondary metabolites, such as phenols and carotenoids, resulting from some shift of the primary metabolism probably due to the later application during the reproductive stage (R1). The hypotheses concerning the results observed were discussed. The enrichment of SW with mineral potentiated its effect associated with the improvement of free amino acids and some minerals, specially Zn, but decreased the accumulation of other minerals and carotenoid content and did not affect significantly other parameters evaluated compared to SW-2. In this context, SW, at an equivalent dose of 21 L hec^{-1} , results in great improvement in maize growth and grain quality, having potential to be used without enrichment. However, further studies are necessary to optimize SW doses and better understanding SW mechanisms of action.

5 Acknowledgment

The authors gratefully acknowledge the financial and logistic support of Petrobras/SIX – Shale Industrialization, Embrapa Clima Temperado, FAPEG and MCT/FINEP – Ministério de Ciência e Tecnologia, Research and Projects Financing.

6 Literature Cited

1. Abbas, G.; Khan, M.Q.; Khan, M.J.; Tahir, M.; Ishaque, M.; Hussain, F. Nutrient uptake, growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by manganese application. *Pak. J. Bot.*, 2011, 43, 607-616.
2. Abdel-Mawgoud, A.M.R.; Tantawy, A.S.; El-Nemr, M.A.; Sassine, Y.N. Growth and yield responses of strawberry plants to chitosan application. *European Journal of Scientific Research*, 2010, 39, 170-177.
3. Adom, K. K.; Liu, R. H. Antioxidant activity of grains. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2002, 50, 6182–6187.
4. Aluru, M.; Xu, Y.; Guo, R.; Wang, Z.; Li, S.; White, W.; Wang, K.; Rodermel, S. Generation of transgenic maize enhanced provitamin A content. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59, 3551-3562.
5. Aref, F. Concentration and uptake of zinc and boron in corn leaf as affected by zinc sulfate and boric acid fertilizers in a deficient soil. *Life Science Journal*, 2011, 8, i.1, 26-32.
6. Arnao, M.B.; Canoa, A.; Acosta, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 2001, 73, i.2, 239-244.
7. Ashraf, M.; Foolad, M.R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 2007, 59, i.2, 206-216.
8. Brakemeier, C. *Adubação foliar: a complementação nutricional da macieira*. Jornal da Fruta, Lajes, 1999, p.7.
9. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 1995, 28, i. 1, 25-30.

10. Cakmak, I. Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification? *Plant Soil*, 2008, 302, 1–17.
11. Coelho, A.M; Filho, A.C. Adubação foliar da cultura do milho visando fertilizantes multinutrientes. *Comunicado Técnico: Embrapa Milho e Sorgo*, 2006, 135, 1-6.
12. Cogo, S.L.P.; Chaves, F.C.; Schirmer, M.A.; Zambiasi, R.C.; Nora, L.; Silva, J.A.; Rombaldi, C.V. Low soil water content during growth contributes to preservation of green colour and bioactive compounds of cold-stored broccoli (*Brassica oleraceae* L.) florets. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, 60, i.2, 158-163.
13. Da Silva, F.C. *Manual de analyses químicas de solos, plantas e fertilizantes*. Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, Brasil, 2009, 2º Ed.
14. De la Fuente, E.B.; Gil, A.; Lenardis, A.E.; Pereira, M.L.; Suárez, S.A.; Ghersa, C.M.; Grass, M.Y. Response of winter crops differing in grain yield and essential oil production to some agronomic practices and environmental gradient in the Rolling Pampa, Argentina. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2003, 99, 159–169.
15. De Oliveira, G.P.R.; Rodriguez-Amaya, D.B. Processed and prepared corn products as sources of lutein and zeaxanthin: Compositional variation in the food chain. *Journal of Food Science*, 2007, 72, S079-S085.
16. Dordas, C. Foliar application of manganese increases seed yield and improves seed quality of cotton grown on calcareous soils. *Journal of Plant Nutrition*, 2009, 32, 160-176.
17. El-Shahawy, T.A.; Sharara, F.A.A. Hormesis influence of glyphosate in between increasing growth, yield and controlling weeds in faba bean. *Journal of American Science*, 2011, 7, 139-144.
18. Fernandes, M.S. *Nutrição Mineral de Plantas*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo: Viçosa, MG, 2006.
19. Flores, P.; Navarro, J.M.; Garrido, C.; Rubio, J.S.; Martinez, V. Influence of Ca^{2+} , K^{+} and NO^{3-} fertilisation on nutritional quality of pepper. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2004, 84, 6, 569–574.
20. Flores, P.; Hellin, P.; Fenoll, J. Effect of manure and mineral fertilisation on pepper nutritional quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009, 89, i.9, 1581–1586.
21. Fraser, P.D.; Bramley, P.M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, 2004, 43, 228–265.

22. Gajc-Wolska, J.; Łyszkowska, M.; Zielony, T. The influence of grafting and biostimulators on the yield and fruit quality of greenhouse tomato CV. (*Lycopersicon esculentum* Mill.) grown in the field. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 2010, 72, 63-70.
23. Gallagher, C.E.; Matthews, P.D.; Faqiang, L.; Wurtzel, E.T. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses. *Plant Physiology*, 2004, 135, 1776–1783.
24. Geneva, M.; Stancheva, I.; Sichanova, M.; Boychinova, M.; Georgiev, G.; Dolezal, M. Improvement of milk thistle (*Silybum marianum* L.) seed yield and quality with foliar fertilization and growth effector md 148/II. *Gen. Appl. Plant Physiology*, 2008, 34, 309-318.
25. Glinicki, R.; Paszt, L.; Jadczyk-Tobjasz, E. The effect of plant stimulant/fertilizer “resistim” on growth and development of strawberry plants. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 2010, 18, 111-124.
26. Glynn, C.; Herms, D.A.; Orians, C.M.; Hansen, R.C.; Larsson, S. Testing the growth–differentiation balance hypothesis: dynamic responses of willows to nutrient availability. *New Phytologist*, 2007, 176, 623–634.
27. Gomez-Galera, S.; Rojas, E.; Sudhakar, D.; Zhu, C.; Pelacho, A.M.; Capell, T.; Christou, P. Critical evaluation of strategies for mineral fortification of staple food crops. *Transgenic Research*, 2010, 19, 165-180.
28. Hänsch, R.; Mendel, R.R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology*, 2009, 12, 259–266.
29. Hawrylak-Nowak, B. Enhanced selenium content in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) by foliar fertilization. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 2008, 69, 63-72.
30. Herms, D.A.; Mattson, W.J. The dilemma of plants: to grow or defend. *Quarterly Review of Biology*, 1992, 67, 283–335.
31. Hodge, J.E.; Hofreiter, B.T. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In *Methods in carbohydrate chemistry*; Whistler, R.L.; Wolfrom, M.L. Eds; Academic Press: New York, NY, 1962; Vol.1, pp.380–394.
32. Horvath, E.; Szalai, G.; Janda, T. Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *J Plant Growth Regul*, 2007, 26, 290–300.

33. Hotz, C.; McClafferty, B. From harvest to health: Challenges for developing biofortified staple foods and determining their impact on micronutrient status. *Food and Nutrition Bulletin*, 2007, 28, 271S-279S.
34. Huang, S.; Adams, W.R.; Zhou, Q.; Malloy, K.P.; Voyles, D.A.; Jan J. Improving nutritional quality of maize proteins by expressing sense and antisense zein genes. *Agriculture and Food Chemistry*, 2004, 52, 1958-1964.
35. Ilias, G.; Ouzounidou, A.; Giannakoula; Papadopoulou, P. Effects of gibberellic acid and prohexadione-calcium on growth, chlorophyll fluorescence and quality of okra plant. *Biologia Plantarum*, 2007, 51, 575-578.
36. Iriti, M.; Faoro, F. Does benzothiadiazole-induced resistance increase fitness cost in bean? *Journal of Plant Pathology*, 2003, 85, 265-270.
37. Khan, W.; Rayirath, U.P.; Subramanian, S.; Jithesh, M.N.; Rayorath, P.; Hodges, D.M.; Critchley, A.T.; Craigie, J.S.; Norrie, J.; Prithiviraj, B. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2009, 28, 386-399.
38. Kim, H.J.; Fonseca, J.M.; Choi, J.H.; Kubota, C.; Kwon, D.Y. Salt in irrigation water affects the nutritional and visual properties of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2008, 56, 3772–3776.
39. Kirchmann, H.; Eskilsson, J. Low manganese (Mn) and copper (Cu) concentrations in cereals explained yield losses after lime application to soil, 2010, 60, i.6, 569 – 572.
40. Kishor, S.; Sangam, R.N.; Amrutha, P.; Sri Laxmi, K.R.; Naidu, K.R.S.S.; Rao, Sreenath Rao, K. J.; Reddy, P.; Theriappan; Sreenivasulu, N.; Kavi, P.B. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, 2005, 88, 424-438.
41. Lal, R. Soil degradation as a reason for inadequate human nutrition. *Food Security*, 2009, 1, 45–57.
42. Lauxen, L.R.; Villela, F.A.; Soares, R.C. Physiological performance of cotton seeds treated with thiametoxam. *Rev. Bras. Sementes*, 2010, 32, 61-68.
43. Li, F.; Vallabhaneni, R.; Yu, J.; Rocheford, T.; Wurtzel, E.T. The maize phytoene synthase gene family: Overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance. *Plant Physiology*, 2008, 147, 1334-1346.

44. Loomis W.E. Growth–differentiation balance vs. carbohydrate–nitrogen ratio. *American Society for Horticultural Science Proceedings*, 1932, 29, 240–245.
45. Luo, M.; Liu, J.; Lee, R.D.; Guo, B.Z. Characterization of gene expression profiles in developing kernels of maize (*Zea mays*) inbred Tex6. *Plant Breeding*, 2008, 127, i.6, 569–578.
46. Mafra, A.G.F.D. Zinco e câncer: uma revisão. *Revista saúde*, 2005, 1, 144-156.
47. Messias, R.S; Galli, V.; Silva, S.D.A.; Schirmer, M.A.; Pillon, C.N. Metodologias de extração e avaliação semi quantitativa da expressão de genes de metabolismo secundário do milho (*Zea mays* L.). *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento: Embrapa Clima Temperado*, 2010, 117, 1-25.
48. Messias, R.; Silveira, C.A.P; Ferreira, L.H.G.; Rombaldi, C.V.; Pillon, C.N. Physical-chemical characterisation of water from the pyrobituminous shale pyrolysis process and evaluation of its potential use in agriculture. In submission process, 2011.
49. Meyer, K.A.; Kushi, L.H.; Jacob, D.R.J.; Slavin, J.; Sellers, T.A.; Folsom, A.R. Carbohydrates, dietary fiber, incident type 2 *diabetes mellitus* in older women. *American Journal Clinical Nutrition*, 2000, 71, 921–930.
50. Miller, T.A.; Muslin, E.H.; Dorweiler, J.E. A maize *CONSTANS*-like gene, *conz1*, exhibits distinct diurnal expression patterns in varied photoperiods. *Planta*, 2008, 227, 1377–1388.
51. Miyashita, Y.; Dolferus, R.; Ismond, K.P.; Good, A.G. Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 2007, 49, i.6, 1108–1121.
52. Pfaffl, M.W.; Horgan, G.W.; Dempfle, L. Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30, 39–49.
53. Raut, N.; Sitaula, B. K.; Bajracharya, R. M. Agricultural intensification: linking with livelihood improvement and environmental degradation in mid-hills of Nepal. *The Journal of Agriculture And Environment*, 2010, 11, 83-94.
54. Reddy, B.V.S.; Ramesh, S.; Longvah, T. Prospects of breeding for micronutrients and β -carotene-dense sorghums. *ISMN*, 2005, 46, 10-14.
55. Rezende, D.C.; Rodrigues, F.A.; Carré-Missio, C.V.; Schurt, D.A.; Kawamura, I.K.; Korndörfer, G.H. Effect of root and foliar applications of silicon on brown spot development in rice. *Australas. Plant Path.* 2009, 38, 67–73.

56. Rodriguez-Amaya, D.B.; Kimura, M. *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*. HarvestPlus Technical Monograph: Washington, DC and Cali: International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT), 2004.
57. SAS - STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM (SAS). SAS user's guide: Statistics. SAS Institute, Cary, NC, 2004.
58. Scalbert, A.; Johnson, I.T.; Saltmarsh, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2005, 81, 215S-217S.
59. Sosulski, F.; Krygier, K.; Hogge, L. Free, esterified, and insoluble bound phenolic acids. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1982, 30, 337-340.
60. Tedesco, M.J.; Gianello, C.; Bissani, C.A.; Bohnen, S.J. *Análise de solo, plantas e outros materiais*. 2.ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 147p. (Boletim Técnico, 5)
61. Treutter, D. Managing phenol contents in crop plants by phytochemical farming and breeding—visions and constraints. *International Journal of Molecular Science*, 2010, 11, 807-857.
62. Vallabhaneni, R.; Wurtzel, E. Timing and biosynthetic potential for carotenoid accumulation in genetically diverse germplasm of maize. *Plant Physiology*, 2009a, 150, 562-572.
63. Vallabhaneni, R.; Gallagher, C.E.; Licciardello, N.; Cuttriss, A.J.; Quinlan, R.F.; Wurtzel, E.T. Metabolite sorting of a germplasm collection reveals the Hydroxylase3 locus as a new target for maize provitamin A biofortification. *Plant Physiology*, 2009b, 151, 1635-45.
64. Vallejo, F.; Viguera, C.G.; Tomás-Barberán, F.A. Changes in broccoli (*Brassica oleracea* L. Var. italica) health-promoting compounds with inflorescence development. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2003, 51, 3776-3782.
65. Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate normalization of realtime quantitative Rt-PCR data by enometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 2002, 3, 1-12.
66. Walters, D.R.; Boyle, C. Induced resistance and allocation costs: What is the impact of pathogen challenge? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2005, 66, i.1-2, 40-44.

67. Wang, L.; Xua, C.; Qua, M.; Zhang, J. Kernel amino acid composition and protein content of introgression lines from *Zea mays* ssp. *mexicana* into cultivated maize. *Journal of Cereal Science*, 2008, 48, 387-393.
68. Zhu, C.; Naqvi, S.; Gomez-Galera, S.; Pelacho, A. M.; Capell, T.; Christou, P. Transgenic strategies for the nutritional enhancement of plants. *Trends on Plant Science*, 2007, 12, 548–55.
69. Zhu, C.; Naqvi, S.; Breitenbach, J.; Sandmann, G.; Cristou, P.; Capell, T. Combinatorial genetic transformation generates a library of metabolic phenotypes for the carotenoid pathways in maize. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 2008, 105, 18232–7.

8. CONCLUSÕES

Tendo em conta a caracterização, através da sistematização de dados obtidos em diferentes períodos de amostragem, realizada na água de xisto (AX), a qual mostrou uma grande diversidade de nutrientes minerais e elementos traço, além de compostos com possíveis ações para a formação de complexos orgânicos, bem como a ausência de concentrações perigosas de compostos tóxicos em sua matriz. Considerando igualmente o aumento no acúmulo de nutrientes e produtividade, que foi proporcionado pela adição de 6 e 18 L ha⁻¹ de AX na cultura da alface, a mesma apresenta potencial para utilização na adubação foliar suplementar em culturas agrícolas, especialmente em solos que não atendam a demanda nutricional das plantas.

Os resultados da aplicação foliar de AX na cultura do milho mostraram que seu uso influenciou o acúmulo de metabólitos primários, resultando em aumento significativo no crescimento vegetativo, produtividade e melhoria nutricional, proporcionando igualmente incremento de metabólitos secundários, tais como fenóis e carotenóides. O enriquecimento da AX com micronutrientes potencializou seu efeito associado ao acúmulo de aminoácidos livres e alguns minerais, porém com redução no incremento de compostos de metabolismo secundário e sem afetar significativamente outros parâmetros avaliados em relação a aplicação de AX sem enriquecimento na dose de 21 L ha⁻¹, tendo a AX, portanto, potencial para ser utilizada como bioestimulante natural na cultura do milho.

9. REFERÊNCIAS

- ABBATE, P. E.; ANDRADE, F. H.; LÁZARO, L.; BARIFFI, J. H.; BERARDOCCO, H. G.; INZA, V. H.; MARTURANO, F. Grain yield increase in recent Argentine wheat cultivars. **Crop Science**, v.38, p.1203–1209, 1998.
- ADOM, K. K.; SORRELLS, M.; LIU, R. H. Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.53, p.2297–2306, 2005.
- ADOM, K. K.; LIU, R. H. Antioxidant activity of grains. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, p.6182–6187, 2002.
- ADOM, K. K., SORRELLS, M.E., LIU, R.H. Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p.7825–7834, 2003.
- ALTIERI, M. A. **Agroecologia: bases científicas para uma agricultura sustentável**. Guaíba: Editora Agropecuária. p.592, 2002.
- ALTPETER, F.; BAISAKH, N.; BEACHY, R.; BOCK, R.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; DANIELL, H.; DATTA, K.; DATTA, S.; DIX, P.; FAUQUET, C.; HUANG, N.; KOHLI, A.; MOOIBROEK, H.; NICHOLSON, L.; NGUYEN, T.; NUGENT, G.; RAEMAKERS, K.; ROMANO, A.; SOMERS, D.; STOGER, E.; TAYLOR, N.; VISSER, R. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. **Molecular Breeding**, v.15, p.305–327, 2005.
- ALURU, M.; XU, Y.; GUO, R.; WANG, Z.; LI, S.; WHITE, W.; WANG, C.; RODERMEL, S. Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. **Journal of Experimental Botany**, v.59, n.13, p.3551–3562, 2008.
- ANDERSON, J. W.; HANNA, T. J.; PENG, X.; KRYSCIO, R. J. Whole grain foods and heart disease risk. **Journal of American College of Nutrition**, v.19, p.291S–299S, 2000.
- ANJANEYULU, M., CHOPRA, K. Nordihydroguaiaretic acid, a lignin, prevents oxidative stress and the development of diabetic nephropathy in rats. **Pharmacology**, v.72, p.42-50, 2004.
- ANTTONEN, M. J.; HOPPULA, K. I.; NESTBY, R.; VERHEUL, M. J.; KARJALAINEN, R. O. Influence of fertilization, mulch color, early forcing, fruit order, planting date, shading, growing environment, and genotype on the contents

of selected phenolics in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) fruits. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.54, n.7, p. 2614–2620, 2006.

ARAÚJO, P. M.; NASS, L. L. Caracterização e avaliação de populações de milho crioulo. **Scientia agrícola**, v.59, n.3, 2002.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v.59, i.2, p.206-216, 2007.

BANSAL, A. K.; BANSAL, M.; SONI, G.; BHATNAGAR, D. Protective role of Vitamin E pre-treatment on N-nitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver. **Chemico-Biological Interactions**, v.156, p.101-111, 2005.

BARAK, A. J.; BECKENHAUER, H. C.; MAILLIARD, M. E.; KHARBANDA, K. K.; TUMA, D. J. Betaine lowers elevated S-adenosylhomocysteine levels in hepatocytes from ethanol-fed rats. **Journal of Nutrition**, v.133, p.2845-2848, 2003.

BARSAN, C.; SANCHEZ-BEL, P.; ROMBALDI, C.; EGEA, I.; ROSSIGNOL, M.; KUNTZ, M.; ZOUINE, M.; LATCHÉ, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J. C. Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis. **Journal of Experimental Botany**, 2010.

BASSIM, T. A. H.; PECKET, R. C. The effect of membrane stabilizers on phytochrome-controlled anthocyanin biosynthesis in *Brassica oleraceae*. **Phytochemistry**, v.14, p.731–733, 1975.

BEGUM, A. N.; NICOLLE, C.; MILA, I.; LAPIERRE, C.; NAGANO, K.; FUKUSHIMA, K.; HEINONEN, S. M.; ADLERCREUTZ, H.; REMESY, C.; SCALBERT, A., Dietary lignins are precursors of mammalian lignans in rats. **Journal of Nutrition**, v.134, p.120-127. 2004.

BELAL, S.; HASSAN, N.; MANSOUR, A. Histopathological and stereological studies for evaluation of aeromonas hydrophila-induced pulmonary structural changes with emphasis on the possible protective effect of inositol hexaphosphate. **Advances in Biological Research**, v.3, n.5-6, p.222-230, 2009.

BERARDO, N.; MAZZINELLI, G.; VALOTI, P.; LAGANA, P.; REDAELLI, R. Characterization of maize germplasm for the chemical composition of the grain. **Agriculture and Food Chemistry**, v.57, p.2378–2384, 2009.

BJORCK, I.; GRANFELDT, Y.; LILJEBERG, H.; TOVAR, J.; ASP, N. Food properties affecting the digestion and absorption of carbohydrates. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.59, p.688–705, 1994.

BOYER, C. D.; LIU, K. C. Starch and water-soluble polysaccharides from sugary endosperm of sorghum. **Phytochemistry**, v.22, i.11, p. 2513-2515, 1983.

BRAATEN, J. T.; WOOD, P. J.; SCOTT, F. W.; WOLYNETZ, M. S.; LOWE, M. K.; BRADLEY- WHITE, P.; COLLINS, M. W. Oat beta-glucan reduces blood cholesterol concentration in hypercholesterolemic subjects. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.48, p.465-474, 1994.

BRAKEMEIER, C. Adubação foliar: a complementação nutricional da macieira. **Jornal da Fruta**, Lajes, p.7, 1999.

BROADLEY, M. R.; WHITE, P. J.; BRYSON, R. J.; MEACHAM, M. C.; BOWEN, H. C.; JOHNSON, S. E.; HAWKESFORD, M. J.; MCGRATH, S. P.; ZHAO, F. J.; BREWARD, N.; HARRIMAN, M.; TUCKER, M. Biofortification of UK food crops with selenium. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.65, p.169–181, 2006.

BROWN, L.; RIMM, E. B.; SEDDON, J. M.; GIOVANNUCCI, E. L.; CHASANTABER, L.; SPIEGELMAN, D.; WILLETT, W. C.; HANKINSON, S. E. A prospective study of carotenoid intake and risk of cataract extraction in US men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, n.4, p.431-2, 1999.

BRYNGELSSON, S.; DIMBERG, L. H.; KAMAL-ELDIN, A. Effects of commercial processing on levels of antioxidants in oats (*Avena sativa* L.). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, p.1890–1896, 2002.

BRUCE, W.; FOLKERTS, O.; GARNAAT, C.; CRASTA, O.; ROTH, B.; BOWEN, B. Expression profiling of the maize flavonoid pathway genes controlled by estradiol-inducible transcription factors CRC and P. **The Plant Cell**, v.12, p.65–79, 2000

BUNZEL, M., RALPH, J.; MARTIA, J. M.; HATFIELD, R. D.; STEINHART, H. Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.81, p.653–660, 2001.

CAHOON, E. B.; HALL, S. E.; RIPP, K. G.; GANZKE, T. S.; HITZ, W. D.; COUGHLAN, S. J.; Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. **Nature Biotechnology**, v.21, p.1082-1087, 2003.

- CAKMAK, I. Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification? **Plant Soil**, v.302, p.1–17, 2008.
- CALDERINI, D.; REYNOLDS, M. P.; SLAFER, G. A. Source-sink effects on grain weight of bread wheat, durum wheat, and triticale at different locations. **Australian Journal of Agriculture Research**, v.57, p.227–233, 2006.
- CASIRAGHI, M. C., GARSETTI, M., TESTOLIN, G., BRIGHENTI, F. Post-prandial responses to cereal products enriched with barley beta-glucan. **Journal of the American College of Nutrition**. v.25, p.313-320, 2006.
- CERVANTES-MARTINEZ, C. T.; FREY, K. J.; WHITE, P. J.; WESENBERG, D. M.; HOLLAND, J. B. Selection for Greater β -Glucan Content in Oat Grain. **Crop Science**, v.41, p.1085–1091, 2001.
- CHANDLER, V. L.; RADICELLA, J. P.;, ROBBINS TP, CHEN J, TURKS D. Two regulatory genes of the maize anthocyanin pathway are homologous: isolation of B utilizing R genomic sequences. **The Plant Cell**, v.1, p.1175–1183, 1989.
- CHASAN-TABER, L.; WILLETT, W. C.; SEDDON, J. M.; STAMPFER, M. J.; ROSNER, B.; COLDITZ, G. A.; SPEIZER, F. E.; HANKINSON, S. E. A prospective study of carotenoid and vitamin A intakes and risk of cataract extraction in US women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, p.509–516, 1999.
- CHATENOUD, L.; TAVANI, A.; LA-VECCHIA, C.; JACOBS, D. R. J.; NEGRI, E.; LEVI, F.; FRANCESCHI, S. Whole grain food intake and cancer risk. **International Journal of Cancer**, v.77, p.24–28, 1998.
- CHEN, Z.; YOUNG, T. E.; LING, J.; CHANG, S. C.; GALLIE, D. R. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.100, p.3525–30, 2003.
- CHRISTOU, P.; TWYMAN, R. M. The potential of genetically enhanced plants to address food insecurity. **Nutritional Research Review**, v.17, p.23–42, 2004.
- CIAPPELLANO, S.; TESTOLIN, G.; PORRINI, M. Effects of durum wheat dietary selenium on glutathione peroxidase activity and Se content in longterm- fed rats. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v.33, p.22-30, 1989.
- COELHO & FILHO, 2006
- COGO, S. L. P.; CHAVES, F. C.; SCHIRMER, M. A.; ZAMBIAZI, R. C.; NORA, L.; SILVA, J. A.; ROMBALDI, C. V. Low soil water content during growth contributes

to preservation of green colour and bioactive compounds of cold-stored broccoli (*Brassica oleraceae* L.) florets. **Postharvest Biology and Technology**, v.60, i.2, p.158-163, 2011.

COMBS JR, G. F. Selenium in global food systems. **British Journal of Nutrition**, v.85, p.517-547, 2001.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso 01 março 2011.

CONSONNI, G.; GAVAZZI, G.; DOLFINI, S. Genetic analysis as a tool to investigate the molecular mechanisms underlying seed development in maize. **Annals of Botany**, v.96, p.353–362, 2005.

COOKE, M. S.; EVANS, M. D.; MISTRY, N.; LUNEC, J. Role of dietary antioxidants in the prevention of *in vivo* oxidative DNA damage. **Nutrition Research Reviews**, v.15, p.19–41, 2002.

CRISPEELS, M. J.; SADAVA, D. E. **Plants, Genes and Crop Biotechnology**. Jones and Bartlett, Sudbury, Mass, USA; 2003.

CUKELJ, N.; NOVOTNI, D.; ĆURIĆ, D. Antioxidant properties of whole grain cereals. **Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition**, v.5, n.1-2, p.18-23, 2010.

CURIE, C.; PANAVIENE, Z.; LOULERGUE, C.; DELLAPORTA, S. L.; BRIAT, J.; WALKER, E. L. Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. **Nature**, v.409, p.346-349, 2001.

CURTIN, D.; HANSON, R.; LINDLEY, T. N.; BUTLER, R. C. Selenium concentration in wheat (*Triticum aestivum*) grain as influenced by method, rate, and timing of sodium selenate application. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v.34, p.329-339, 2006.

DE BOLAND, A. R.; GARNER, G. B.; O'DELL, B. L. Identification and properties of phytate in cereal grains and oilseed products. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.23, n.6, p.1186–1189, 1975.

DEL POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C. H.; SALDIVAR, S. O. S.; TALCOTT, S.T. Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays* L.) products. **Food Research International**, v.39, p.696-703, 2006.

- DE OLIVEIRA, G. P. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Processed and prepared corn products as sources of lutein and zeaxanthin: Compositional variation in the food chain. **Journal of Food Science**, v.72, p.79, 2007.
- DEWANTO, V.; WU, X.Z.; LIU, R.H. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4959–4964, 2002.
- DIDONATO JR, R. J.; ROBERTS, L. A.; SANDERSON, T.; EISLEY, R. B.; WALKER, E. L. Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine–metal complexes. **The Plant Journal**, v.39, p.403–414, 2004.
- DIETRYCH-SZOSTAK, D.; OLESZEK, W. Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p4384–4387, 1999.
- DIXON, R. A.; PASINETTI, G. M. Flavonoids and Isoflavonoids. **Plant Biology to Agriculture and Neuroscience Plant Physiology**, v.154, p.453–457, 2010.
- DORIA, E.; GALLESCHI, L.; CALUCCI, L.; PINZINO, C.; PILU, R.; CASSANI, E.; NIELSEN, E. Phytic acid prevents oxidative stress in seeds: evidence from a maize (*Zea mays* L.) low phytic acid mutant. **Journal of Experimental Botany**, v.60, n.3, p.967–978, 2009.
- DRAKAKAKI, G.; MARCEL, S.; GLAHN, R. P.; LUND, E. K.; PARIAGH, S.; FISCHER, R.; CHRISTOU, P.; STOGER, E. Endosperm-specific co-expression of recombinant soybean ferritin and aspergillus phytase in maize results in significant increases in the levels of bioavailable iron. **Plant Molecular Biology**, v.59, n.6, p.869-880, 2005.
- EICHLER, O.; SIES, H.; STAHL, W. Divergent optimum levels of lycopene, beta-carotene and lutein protecting against UVB irradiation in human fibroblasts. **Photochemical Photobiology**, v.75, p.503-506, 2002.
- EZEUGU, L. I.; DUODU, K. G.; TAYLOR, J. R. N. Effects of endosperm texture and cooking conditions on the *in vitro* starch digestibility of sorghum and maize flours. **Journal of Cereal Science**, v.42, i.1, p.33-44, 2005.
- FANG, Y.; WANG, L.; XIN, Z.; ZHAO, L.; NA, X.; HU, Q. Effect of foliar application of zinc, selenium, and iron fertilizers on nutrients concentration and yield of rice

grain in China. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.56, n.6, p.2079–2084, 2008.

FANNING, K. J.; MARTIN, I.; WONG, L.; KEATING, V.; PUNA, S.; O'HARE, T. Screening sweetcorn for enhanced zeaxanthin concentration. **Journal of Science Food and Agriculture**, v.90, p.91–96, 2010.

FARDET, A.; ROCK, E.; RÉMÉSY, C. Is the *in vitro* antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected *in vivo*? **Journal of Cereal Science**, v.48, p.258-276, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Maize in human nutrition. Rome, 1992. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/t0395e/T0395E00.htm>>. Acesso 10 março 2011.

FAOSTATE - Food And Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org>>. Acesso 01 março 2011.

FERREIRA; A. C. B.; ARAÚJO, G. A. A.; ROBERTO, P.; PEREIRA, G.; CARDOSO, A. A.. Características agronômicas e nutricionais do milho adubado com nitrogênio, molibdênio e zinco. **Scientia Agricola**, v.58, n.1, p.131-138, 2001.

FEUCHT, W.; TREUTTER, D.; BENGSCH, E.; POLSTER J. Effects of watersoluble boron and aluminium compounds on the synthesis of flavanols in grape vine callus. **Z. Naturforsch.**, v.54c, p.942–945, 1999.

FLORES, P.; NAVARRO, J. M.; GARRIDO, C.; RUBIO, J. S.; MARTINEZ, V. Influence of Ca²⁺, K⁺ and NO₃⁻ fertilisation on nutritional quality of pepper. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.84, i.6, p.569–574, 2004.

FLORES, P.; HELLIN, P.; FENOLL, J. Effect of manure and mineral fertilisation on pepper nutritional quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.89, i.9, p.1581–1586, 2009.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 228–265, 2004.

FREI, M.; SIDDHURAJUA P.; BECKER, K. Studies on the *in vitro* starch digestibility and the glycemic index of six different indigenous rice cultivars from the Philippines. **Food Chemistry**, v.83, i.3, p.395-402, 2003.

FROSSARD, E.; BUCHER, M.; MACHLER, F.; MOZAFAR, A.; HURRELL, F. Potential for increasing the content and bioavailability of Fe, Zn and Ca in plants

for human nutrition **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.861-879, 2000.

FUJIMORI, M.; HAYASHI, K.; HIRATA, M.; IKEDA, S.; TAKAHASHI, Y.; MANO, Y.; SATO, H.; TAKAMIZO, T.; MIZUNO, K.; FUJIWARA, T.; et al. Molecular breeding and functional genomics for tolerance to biotic stress. **Molecular Breeding of Forage and Turf. Developments in Plant Breeding**, v.11, p.21-35, 2004.

GALLAGHER, C. E.; MATTHEWS, P. D.; FAQIANG, L.; WURTZEL, E. T. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses. **Plant Physiology**, v.135, p.1776–1783, 2004.

GALLARDO, C.; JIMENEZ, L.; GARCIA-CONESA, M. T. Hydroxycinnamic acid composition and *in vitro* antioxidant activity of selected grain fractions. **Food Chemistry**, v.99, p.455 e 463.2006

GAUTAMA, S.; KALPANA, P.; SRINIVANAN, K. Influence of β -carotene-rich vegetables on the bioaccessibility of zinc and iron from food grains. **Food Chemistry**, v.122, i.3, p.668-672, 2010.

GIBSON, G. R.; BEATTY, E. R.; WANG, X.; CUMMINGS, J. H. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. **Gastroenterology**, v.108, p.975–982, 1995.

GLAHN, R. P.; WORTLEY, G. M. Inhibition of Iron Uptake by Phytic Acid, Tannic Acid, and $ZnCl_2$: Studies Using an *In Vitro* Digestion/Caco-2 Cell Model. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, n.2, p 390–395, 2002.

GODWIN, I. D.; WILLIAMS, S. B.; PANDIT, P. S.; LAIDLAW, H. K. C. Multifunctional grains for the future: genetic engineering for enhanced and novel cereal quality. ***In Vitro Cellular and Development Biology of Plant***, v.45, p.383–399, 2009.

GOLESTANI, A.; RASTEGAR, R.; SHARIFTABRIZI, A.; KHAGHANI, S.; PAYABVASH, S. M.; SALMASI, A. H.; DEHPOUR, A. R.; PASALAR, P. Paradoxical dose- and time-dependent regulation of superoxide dismutase and antioxidant capacity by vitamin E in rat. **Clinica Chimica Acta**, v.365, p.153-159, 2006.

- GOMEZ-GALERA, S.; ROJAS, E.; SUDHAKAR, D.; ZHU, C.; PELACHO, A. M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. Critical evaluation of strategies for mineral fortification of staple food crops. **Transgenic Research**, v.19, n.2, p.165-180, 2010.
- GOMEZ, C.; TERRIER, N.; TORREGROSA, L.; VIALET, S.; FOURNIER-LEVEL, A.; VERRIES, C.; SOUQUET, J. M.; MAZAURIC, J. P.; KLEIN, M.; CHEYNIER, V. Grapevine MATE-type proteins act as vacuolar H⁺-dependent acylated anthocyanin transporters. **Plant Physiology**, v.150, p.402–415, 2009.
- GRAF, E.; EATON, J. W. Antioxidant functions of phytic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v.8, p.61-69, 1990.
- GRAF, E.; EMPSON, K. L.; EATON, J. W. Phytic acid. A natural antioxidant. **Journal of Biological Chemistry**, v.262, p.11647-11650, 1987.
- GREGORIO, G. B. Progress in breeding for trace minerals in staple crops. Symposium: plant breeding: a new tool for fighting micronutrient malnutrition. **American Society for Nutritional Sciences**, 2002.
- GROTEWOLD, E.; CHAMBERLIN, M.; SNOOK, M.; SIAME, B.; BUTLER, L.; SWENSON, J.; MADDOCK, S.; CLAIR, G.; BOWEN, B. Engineering secondary metabolism in maize cells by ectopic expression of transcription factors. **Plant Cell**, v.10, p.721-740, 1998.
- GROTEWOLD, E.; SAINZ, M. B.; TAGLIANI, L.; HERNANDEZ, M.; BOWEN, B.; CHANDLER, V. L. Identification of the residues in the Myb domain of maize C1 that specify the interaction with the bHLH cofactor R. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.97, n.25, p.13579–13584, 2000.
- HALEEM, M. A.; BARTON, K. L.; BORGES, G.; CROZIER, A.; ANDERSON, A. S. Increasing antioxidant intake from fruits and vegetables: practical strategies for the Scottish population. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v.21, i.6, p.539–546, 2008.
- HÄNSCH, R.; MENDEL, R.R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Current Opinion in Plant Biology**, v.12, p.259–266, 2009.
- HARJES, S.; BAYER, P.; SCHEIDIG, A. J. The crystal structure of human PAPS synthetase 1 reveals asymmetry in substrate binding. **Journal of Molecular Biology**, v.347, p.623–635, 2005.

HARJES, C.; ROCHEFORD, T. R.; BAI, L.; BRUTNELL, T. P.; KANDIANIS, C. B.; SOWINSKI, S. G.; STAPLETON, A. E.; VALLABHANENI, R.; WILLIAMS, M.; WURTZEL, E. T.; YAN, J.; BUCKLER, E. S. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. **Science**, v.319, 2008.

HARVEST PLUS - <http://www.harvestplus.org/>

HAWRYLAK-NOWAK, B. Enhanced selenium content in sweet basil (*Ocimum Basilicum* L.) by foliar fertilization. **Vegetable Crops Research Bulletin**, v.69, p.63-72, 2008.

HAYNES, R. J.; GOH, K. M. Effects of nitrogen and potassium applications on strawberry growth, yield and quality. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.18, n.4, p. 457-471, 1987.

HEATON, K. W.; MARCUS, S. N.; EMMETT, P. M.; BOLTON, C. H. Particle size of wheat, maize, and oat test meals: effects on plasma glucose and insulin responses and on the rate of starch digestion *in vitro*. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.47, p.675–682, 1988.

HICHRI, I.; BARRIEU, F.; BOGS, J.; KAPPEL, C.; DELROT, S.; LAUVERGEAT, V. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. **Journal of Experimental Botany**, P. 1-19, 2011.

HOSNY, M.; ROSAZZA, J. P. N. Structures of ferulic acid glycoside esters in corn hulls. **Journal of Natural Products**, v.60, p.219-222, 1997.

HOTZ, C.; GIBSON, R. S. Traditional Food-Processing and Preparation Practices to Enhance the Bioavailability of Micronutrients in Plant-Based Diets. **The Journal of Nutrition**. Symposium: Food-Based Approaches to Combating Micronutrient Deficiencies in Children of Developing Countries.

HOTZ, C.; MCCLAFFERTY, B. From harvest to health: Challenges for developing biofortified staple foods and determining their impact on micronutrient status. **Food and Nutrition Bulletin**, v.28, n.2, 2007.

HUANG, S.; ADAMS, W. R.; ZHOU, Q.; MALLOY, K. P.; VOYLES, D. A.; JAN J. Improving nutritional quality of maize proteins by expressing sense and antisense zein genes. **Agriculture and Food Chemistry**, v.52, p.1958-1964, 2004.

JACOBS, D. R.; MEYER, K. A.; KUSHI, L. H., FOLSOM, A. R. Whole grain intake may reduce risk of coronary heart disease death in postmenopausal women: The

Iowa Women's Health Study. **American Journal Clinical Nutrition**, v.68, p.248–257, 1998.

JACOBS, D. R.; SLAVIN, J.; MARQUART, L. Whole grain intake and cancer: a review of literature. **Nutrition and Cancer**, v.22, p.221–229, 1995.

KAHLON, T. S.; CHOW, F. I.; KNUCKLES, B. E.; CHIU, M. M. Cholesterol-lowering effects in hamsters of beta-glucan-enriched barley fraction, dehulled whole barley, rice bran, and oat bran and their combinations. **Cereal Chemistry**, v.70, p.435-440, 1993.

KALA, K.; JUKKOLA, T.; ILLAR, P.; PARTANEN, J. Analysis of the midbrain–hindbrain boundary cell fate using a boundary cell-specific Cre-mouse strain. **Genesis**, v.46, i.1, p.29–36, 2008.

KASUM, C. M., JACOBS, D. R. J., NICODEMUS, K., FOLSOM, A. R. Dietary risk factors for upper aerodigestive tract cancers. **International Journal of Cancer**, v.99, p.267–272, 2002.

KERN, S. M.; BENNETT, R. N.; MELLON, F. A.; KROON, P. A.; GARCIA-CONESA, M. T. Absorption of hydroxycinnamates in humans after high-bran cereal consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.6050-6055, 2003.

KIM, M. K.; AHN, S. H.; LEE-KIM, Y. C. Relationship of serum α -tocopherol, carotenoids and retinol with the risk of breast cancer. **Nutrition Research**, v.21, p.797–809, 2001.

KIM, H. J.; FONSECA, J. M.; CHOI, J. H.; KUBOTA, C.; KWON, D. Y. Salt in irrigation water affects the nutritional and visual properties of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.56, p.3772–3776, 2008.

KITTS, D. D.; YUAN, Y. V.; WIJEWICKREME, A. N.; THOMPSON, L. U. Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.202, p.91-100, 1999.

KHOLOVA, J.; SAIRAM, R. K.; MEENA, R. C. Osmolytes and metal ions accumulation, oxidative stress and antioxidant enzymes activity as determinants of salinity stress tolerance in maize genotypes

- KLJAK, K.; KIŠ, G.; GRBEŠA, D. *In vitro* digestibility of phenolics in grain of maize hybrids Ital.Journal of Animal Science, v.8, suppl. 3, p.166-168, 2009
- KOEPPE, D. E.; SOUTHWICK, L. M.; BITELL, J. E. The relationship of tissue chlorogenic acid concentrations and leaching of phenolics from sunflowers grown under varying phosphate nutrient conditions. **Canadian Journal of Botany**, v.54, p.593–599, 1976.
- KOH-BANERJEE, P.; FRANZ, M.; SAMPSON, L.; LIU, S.; JACOBS, D. R.; SPIEGELMAN, D.; WILLETT, W.; RIMM, E. Changes in whole-grain, bran, and cereal fibre consumption in relation to 8-yr weight gain among men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.80, p.1237–1245, 2004.
- KONOPKA, I.; KOZIROK, W.; ROTKIEWICZ, D. Lipids and carotenoids of wheat grain and flour and attempt of correlating them with digital image analysis of kernel surface and cross-sections. **Food Research International**, v.37, p.429-438, 2004.
- KOPSELL, D. A.; KOPSELL, D. E.; CELENTANO, J. Carotenoid pigments in kale are influenced by nitrogen concentration and form. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.87, i.5, p.900–907, 2007.
- KURILICH, A. C.; JUVIK, J. A. Quantification of Carotenoid and Tocopherol Antioxidants in *Zea mays*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.47, p.1948-1955, 1999.
- LAIGHT, D. W.; DESAI, K. M.; GOPAUL, N. K.; ANGGARD, E. E.; CARRIER, M. J. F-2-isoprostane evidence of oxidant stress in the insulin resistant, obese Zucker rat: effects of vitamin E. **European Journal of Pharmacology**, v.377, p.89-92, 1999.
- LAL, R. Soil degradation as a reason for inadequate human nutrition. **Food Security**, v.1, p.45–57, 2009.
- LANDRUM, J.T.; BONE, R.A.; KILBURN, M.D. The macular pigment: a possible role in protection from age-related macular degeneration. **Advances in Pharmacology**, v.38, p.537–556, 1996.
- LANDRUM, J. T.; BONE, R. A.; JOA, H.; KILBURN, M. D.; MOORE, L. L.; SPRAGUE, K. E. A one year study of the macular pigment: the effect of 140 days of lutein supplementation. **Experimental Eye Research**, v.65, p.57–62, 1997.
- LEE, J. M.; CALKINS, M. J.; CHAN, K. M.; KAN, Y. W.; JOHNSON, J. A. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection

against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.12029-12038, 2003.

LEENHARDT, F., LEVRAT-VERNY, M.A., CHANLIAUD, E., REMESY, C. Moderate decrease of pH by sourdough fermentation is sufficient to reduce phytate content of whole wheat flour through endogenous phytase activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 98-102, 2005.

LEFSRUD, M. G.; KOPSEL, D. A. Kale carotenoids are unaffected by, whereas biomass production, elemental concentrations, and selenium accumulation respond to, changes in selenium fertility. **Journal of the Agriculture and Food Chemistry**, v.54, p.1764-1771, 2006.

LESSER, C.; TREUTTER, D. Effects of nitrogen supply on growth, contents of phenolic compounds and pathogen (scab) resistance of apple trees. **Physiologia Plantarum**, v.123, i.1, p.49–56, 2005.

LEONARD, S. W., GOOD, C. K., GUGGER, E. T., TRABER, M. G. Vitamin E bioavailability from fortified breakfast cereal is greater than that from encapsulated supplements. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p.86-92, 2004.

LI, Z.; MEYER, S.; ESSIG, J. S.; LIU, Y.; SCHAPAUGH, M. A.; MUTHUKRISHNAN, S.; HAINLINE, B. E.; TRICK, H. N. High-level expression of maize γ -zein protein in transgenic soybean (*Glycine max*). **Molecular Breeding**, v.16, p.11–20, 2005.

LI, W.; WEI, C.; WHITE, P. J.; BETA, T. High-amylose corn exhibits better antioxidant activity than typical and waxy genotypes. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.55, n.2, p.291–298, 2007.

LI, H. F.; LOMBI, E.; STROUD, J. L.; MCGRATH, S. P.; ZHAO, F. J. Selenium speciation in soil and rice: influence of water management and Se fertilization. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.58, n.22, p.11837–11843, 2010.

LIU, S.; MANSON, J. E.; STAMPFER, M. J.; HU, F. B.; GIOVANNUCCI, E.; COLDITZ, G. A.; HENNEKENS, C. H.; WILLETT, W. C. A prospective study of whole grain intake and risk of type 2 *diabetes mellitus* in US women. **American Journal of Public Health**, v.90, p.1409–1415, 2000.

LIU, S.; STAMPFER, M.J.; HU, F. B.; GIOVANUCCI, E.; RIMM, E.; MANSON, J. E.; HENNEKENS, C. H.; WILLETT, W. C. Whole grain consumption and risk of

coronary heart disease: results from the Nurses' Health study. **American Journal Clinical Nutrition**, v.70, p.412–419, 1999.

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

LIU, S.; WILLETT, W. C.; MANSON, J. E.; HU, F. B.; ROSNER, B.; COLDITZ, G. Relation between changes in intakes of dietary fiber and grain products and changes in weight and development of obesity among middle-aged women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.78, p.920–927, 2003.

LIYANA-PATHIRANA, C. M.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by gastric pH conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.2433-2440, 2005.

LONNERDAL, B.; BRYANT, A.; LIU, X.; THEIL, E. C. Iron absorption from soybean ferritin in nonanemic women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.83, p.103–7, 2006.

LOPEZ-MARTINEZ, L. X.; OLIART-ROS, R. M.; VALERIO-ALFARO, G.; LEE, C.HSIEN; PARKIN, K. L.; GARCIA, H. S. Antioxidant Activity, Phenolic Compounds and Anthocyanins Content of Eighteen Strains of Mexican Maize. **LWT. Food Science and Technology**. Article in Press. 2008.

LOPEZ, H. W.; DUCLOS, V.; COUDRAY, C.; KRESPINE, V.; FEILLET-COUDRAY, C.; MESSENGER, A.; DEMIGNE, C.; REMESY, C. Making bread with sourdough improves mineral bioavailability from reconstituted whole wheat flour in rats. **Nutrition**, v.19, p.524-530, 2003.

LOŠÁK, T.; HLUŠEK, J.; KRÁČMAR, S.; MÅRTENSSON. Effect of nitrogen and sulphur fertilisation on yields, nitrates and cysteine and methionine content in onion (*Allium cepa* L.). **ISHS Acta Horticulturae**. IV International Symposium on Ecologically Sound Fertilization Strategies for Field Vegetable Production, 2008.

LOUIS, A.; ABBEY, R.; PIERSON, J.; PANAVIENE, Z.; ELSEBETH, L. WalkerYellow Stripe1. Expanded roles for the maize iron-phytosiderophore transporter. **Plant Physiology**, v.135, p.112–120, 2004.

MAFRA, A. G. F. D. Zinco e câncer: uma revisão. **Revista saúde**, v.1, n.2, p.144-156, 2005.

MARIOTTI, F.; SIMBELIE, K. L.; MAKARIOS-LAHHAM, L.; HUNEAU, J. F.; LAPLAIZE, B.; TOME, D.; EVEN, P.C. Acute ingestion of dietary proteins

improves post-exercise liver glutathione in rats in a dose-dependent relationship with their cysteine content. **Journal of Nutrition**, v.134, p.128-131, 2004.

MARKS, M. D.; LINDELL, J. S.; LARKINS, B. A. Quantitative analysis of the accumulation of zein mRNA during maize endosperm development. **Journal of Biological Chemistry**, v.260, p.16445–50, 1985.

MARTIN, A.; WU, D. Y.; BAUR, W.; MEYDANI, S. N.; BLUMBERG, J. B.; MEYDANI, M. Effect of vitamin E on human aortic endothelial cell responses to oxidative injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v.21, p.505-511, 1996.

MARTIN-ORTIZ, D.; HERNANDEZ-APAOLAZA, L.; GRATE, A. Efficiency of a npk fertilizer with adhered zinc lignosulfonate as a zinc source for maize (*Zea mays* L.). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.57, n.19, p.9071–9078, 2009.

MARZABAL, P.; BUSK, P. K.; LUDEVID, M. D.; TORRENT, M. The bifactorial endosperm box of g-zein gene: characterisation and function of the Pb3 and GZM cis-acting elements. **The Plant Journal**, v.16, n.1, p.41–52, 1998.

MATHESON, N. K. Structures of the amylopectins of *waxy*, normal, amylose-extender, and *wx:ae* genotypes and of the phytoglycogen of maize **Carbohydrate Research**, v.243, i.2, p.307-321, 1993.

MAZARIEGOS, M.; HAMBIDGE, K. M.; KREBS, N. F.; WESTCOTT, J. E.; LEI, S.; GRUNWALD, G. K.; CAMPOS, R.; BARAHONA, B.; RABOY, V.; SOLOMONS, N. W. Zinc absorption in Guatemalan schoolchildren fed normal or low-phytate maize. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.83, p.59–64, 2006.

MAZUR, B.; KREBBERS, E.; TINGEY, S. Gene discovery and product development for grain quality traits. **Science**, v.285, p.372–375, 1999.

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

MERTZ, E. T.; BATES, L. S.; Nelson, O. E. Mutant gene that changes the protein composition and increases the lysine content of maize endosperm. **Science**, v.145, p.279–280, 1964.

MESSIAS, R. S.; GALLI, V.; SILVA, S. D. A.; SCHIRMER, M. A.; PILLON, C. N. Metodologias de extração e avaliação semi quantitativa da expressão de genes de metabolismo secundário do milho (*Zea mays* L.). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. ISSN 1981-5980, 2010.

- MEYER, K. A.; KUSHI, L. H.; JACOB, D. R. J.; SLAVIN, J.; SELLERS, T. A.; FOLSOM, A. R. Carbohydrates, dietary fiber, incident type 2 *diabetes mellitus* in older women. **American Journal Clinical Nutrition**, v.71, p.921–930, 2000.
- MILLER, H. E.; RIGELHOF, F.; MARQUART, L.; PRAKASH, A.; KANTER, M. Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. **Journal of the American College of Nutrition**, v.19, p.312-319, 2000.
- MILLER, L. V.; KREBS, N. F.; HAMBIDGE, K. M. A mathematical model of zinc absorption in humans as a function of dietary zinc and phytate. **Journal of Nutrition**, v.137, p.135–41, 2007.
- MISRA, A.; RASTOGI, K.; SHASHANK, R.; JOSHI, J. Whole grains and health: perspective for asian indians, **JAPI**, v.57, 2009.
- MITCHELL, G. V.; GRUNDEL, E.; JENKINS, M. Y. Bioavailability for rats of vitamin E from fortified breakfast cereals. **Journal of Food Science**, v.61, p.1257-1260, 1996.
- MORENO, F. S.; TOLEDO, L. P.; DE CONTI, A.; HEIDOR, R.; JORDÃO J. R.; VANNUCCHI, H.; CARDOZO, M. T.; ONG T. P. Lutein presents suppressing but not blocking chemopreventive activity during diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis and this involves inhibition of DNA damage. **Chemico-Biological Interactions**, v.168, p.221–228, 2007.
- MORITA, T.; KASAOKA, S.; OH-HASHI, A.; IKAI, M.; NUMASAKI, Y.; KIRIYAMA, S. Resistant proteins alter cecal short-chain fatty acid profiles in rats fed high amylose cornstarch. **Journal of Nutrition**, v.128, p.1156–1164, 1998.
- MOZAFFARIEH, M.; SACU, S.; WEDRICH, A. The role of the carotenoids, lutein and zeaxanthin, in protecting against age-related macular degeneration: a review based on controversial evidence. **Nutrition Journal**, v.2, n.1, p.20–28, 2003.
- MRCOPHTH, E. L.; NOLAN, J. M.; O'DONOVAN, O.; BHOSALE, P.; BERNSTEIN, P. S.; BEATTY, S. Transport and retinal capture of lutein and zeaxanthin with reference to age-related macular degeneration. **Survey of Ophthalmology**, v.53, n.1, 2008.
- MYHRSTAD, M. C. W.; CARLSEN, H.; NORDSTROM, O.; BLOMHOFF, R.; MOSKAUG, J. O. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. **Free Radical Biology and Medicine**, v.32, p.386-393, 2002.

NA, H. K.; SURH, Y. J. Intracellular signaling network as a prime chemopreventive target of epigallocatechin gallate. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.50, p.152-159, 2006.

NAGAH, A. M.; SEAL, C. J. *In vitro* procedure to predict apparent antioxidant release from wholegrain foods measured using three different analytical methods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.85, p.1177-1185, 2005.

NAQVI, S.; ZHU, C.; FARRE, G.; RAMESSAR, K.; BASSIE, L.; BREITENBACH, J.; CONESA, D. P.; ROS, G.; SANDMANN, G.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.106, n.192, p. 7762–7767, 2009.

NAVES, M. M. V.; SILVA, M. S.; Cerqueira, F. M.; Paes, M. C. D. Avaliação química e biológica da proteína do grão em cultivares de milho de alta qualidade protéica. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.34, n.1, p.1-8, 2004.

NEWELL-McGLOUGHLIN, M. Nutritionally improved agricultural crops. **Plant Physiology**, v.147, p939-953, 2008.

NICODEMUS, K. K.; JACOBS, D. R. J.; FOLSOM, A. R. Whole and refined grain intake and risk of incident postmenopausal breast cancer. **Cancer Causes and Control**, v.12, p.917–925, 2001.

NIEMEYER, H.B. e METZLER, M. Differences in the antioxidant activity of plant and mammalian lignans. **Journal of Food Engineering**, v.56, p.255-356, 2001.

NØRBÆK, R.; AABOER, D.B.F.; BLEEG, I.S.; CHRISTENSEN, B.T.; KONDO, T.; BRANDT, K. Flavone Cglycoside, phenolic acid, and nitrogen contents in leaves of barley subject to organic fertilization treatments. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p.809–813, 2003.

NORTON, G; J.; DEACON, C. M.; XIONG, L.; HUANG, S.; MEHARG, A. A.; PRICE, A. H. Genetic mapping of the rice ionome in leaves and grain: identification of QTLs for 17 elements including arsenic, cadmium, iron and selenium. **Plant and Soil**, v.329, n.1-2, p.139-153, 2010.

NUSS E. T.; TANUMIHARDJO, S. A. Maize: a paramount staple crop in the context of global nutrition. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, 2010.

OLMO, N.; TURNAY, J.; PEREZ-RAMOS, P.; LECONA, E.; BARRASA, J. I.; DE SILANES, I. L.; LIZARBE, M. A. *In vitro* models for the study of the effect of butyrate on human colon adenocarcinoma cells. **Toxicology in Vitro**, v.21, p.262-270, 2007.

O'QUINN, P. R.; NELSEN, J. L.; GOODBAND, R. D.; KNABE, D. A.; WOODWORTH, J. C. Nutritional value of a genetically improved high-lysine, high-oil corn for young pigs. **Journal of Animal Science**, v.78, p.2144-2149, 2000.

ORTIZ-MONASTERIO, J. I.; PALACIOS-ROJAS, N.; MENG, E.; PIXLEY, K.; TRETHOWAN, R.; PEÑA, R. J. Enhancing the mineral and vitamin content of wheat and maize through plant breeding. **Journal of Cereal Science**, v.46, i.6, p.293-307, 2007.

PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. Empresa brasileira de pesquisa agropecuária (EMBRAPA Milho e Sorgo). **Circular Técnica**, v.75, 2006.

PALAISSA, K. A.; MORGANTE, M.; WILLIAMS, M.; RAFALSKI, A. Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase loci. **The Plant Cell**, v. 15, n. 8, p. 1795–1806, 2003.

PALMGREN, M. G.; CLEMENS, S.; WILLIAMS, L. E.; KRAMER, U.; BORG, S.; SCHJØRRING, J. K.; SANDERS, D. Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. **Trends in Plant Science**, v.13, i.9, p.464-473, 2008.

PANFILI, G.; FRATIANNI, A.; IRANO, M. Improved normal-phase high-performance liquid chromatography procedure for the determination of carotenoids in cereals. **Public Health Nutrition**, v.52, p.6373-6377, 2004.

PARK, S.; ELLESS, M. P.; PARK, J.; JENKINS, A.; LIM, W.; CHAMBERS, E.; HIRSCHI, K. D. Sensory analysis of calcium-biofortified lettuce. **Plant Biotechnology Journal**, v.7, i.1, p.106–117, 2009.

PARK, S.; TAE, S.; KANG, C.; KIM, J. H.; KIM, S.; SMITH, R.; PIKE, L. M.; HIRSCHI, K. D. Genetic manipulation for enhancing calcium content in potato tuber. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.53, n.14, p.5598–5603, 2005.

PEDRESCHI, R.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.). **Food Chemistry**, v.100, p.956–963, 2007.

- PEEL, G. J.; MODOLO, L. V.; PANG, Y.; DIXON, R. A. The LAP1MYB transcription factor orchestrates anthocyanidin biosynthesis and glycosylation in *Medicago*. **Plant Journal**, v.59, p.136–149, 2009.
- PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M.; SALVATORE, S.; DEL RIO, D.; BIANCHI, M.; BRIGHENTI, F. Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.50, p.1030-1038, 2006.
- PEREIRA, M. A.; JACOBS, D. J.; PINS, J. J.; RAATZ, S. K.; GROSS, M. D.; SLAVIN, J. L.; SEAQUIST, E. R. Effect of whole grains on insulin sensitivity in overweight hyperinsulinemic adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.75, p.848–855, 2002.
- PEREZ-JIMENEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.5036-5040, 2005.
- PIETINEN, P.; RIMM, E. B.; KORHONEN, P.; HARTMAN, A. M.; WILLETT, W. C.; ALBANES, D.; VIRTAMO, J. Intake of dietary fiber and risk of coronary heart disease in a cohort of Finnish men: the alphas-tocopherol, beta carotene. **Cancer Prevention Study. Circulation**, v.94, p.2720–2727, 1996.
- POOL-ZOBEL, B. L.; ADLERCREUTZ, H.; GLEI, M.; LIEGIBEL, U. M.; SITTLINGON, J.; ROWLAND, I.; WAHALA, K.; RECHKEMMER, G. Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells. **Carcinogenesis**, v.21, p.1247-1252, 2000.
- PRASANNA, B. M.; VASAL, S. K.; KASSAHUN, B.; SINGH, N. N. Quality protein maize. **Current Science**, v.81, n.10, 2001.
- RAMESH, S. A.; CHOIMES, S.; SCHACHTMAN, D. P. Over-expression of an arabidopsis zinc transporter in *hordeum vulgare* increases short-term zinc uptake after zinc deprivation and seed zinc content. **Plant Molecular Biology**, v.54, n.3, p.373-385, 2004.
- RADI, M.; MAHROUZ, M.; JAOUAD, A.; AMIOT, M.J. Influence of mineral fertilization (NPK) on the quality of apricot fruit (cv. Canino). The effect of the mode of nitrogen supply. **Agronomie**, v.23, p.737–745, 2003.
- RANDHIR, R.; KWON, Y.; SHETTY, K. Effect of thermal processing on phenolics, antioxidant activity and health-relevant functionality of select grain sprouts and

seedlings. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. Article in Press. 2007.

RAUT, N.; SITAULA, B. K.; BAJRACHARYA, R. M. Agricultural intensification: linking with livelihood improvement and environmental degradation in mid-hills of Nepal. **The Journal of Agriculture And Environment**, v.11, p.83-94, 2010.

REEVES, P. G.; GREGOIRE, B. R.; GARVIN, D. F.; HARELAND, G. A.; LINDLAUF, J. E.; JOHNSON, L. K.; FINLEY, J. W. Determination of selenium bioavailability from wheat mill fractions in rats by using the slope-ratio assay and a modified *Torula* yeast-based diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.516-522, 2007.

RHEE, Y.; SEKHON, R. S.; CHOPRA, S.; KAEPLER, S. Tissue culture-induced novel epialleles of a Myb transcription factor encoded by pericarp color1 in maize. **Genetics**, 2010.

RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J., PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v.2, p.152-159, 1997.

RIMBACH, G.; PALLAUF, J. Phytic acid inhibits free radical formation *in vitro* but does not affect liver oxidant or antioxidant status in growing rats. **Journal of Nutrition**, v.128, p.1950-1955, 1998.

ROCHEFORD, T. R.; WONG, J. C.; EGESEL, C. O.; LAMBERT, R. J. Enhancement of Vitamin E levels in corn. **Journal of the American College of Nutrition**, v.21, n.3, p.191S–198S, 2002.

RONDINI, L.; PEYRAT-MAILLARD, M. N.; MARSSET-BAGLIERI, A.; FROMENTIN, G.; DURAND, P.; TOME, D.; PROST, M.; BERSET, C. Bound ferulic acid from bran is more bioavailable than the free compound in rat. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.52, p.4338–4343, 2004.

SANTOCONO, M.; ZURRIA, M.; BERRETTINI, M.; FEDELI, D.; FALCIONI, G. Influence of astaxanthin, zeaxanthin and lutein on DNA damage and repair in UVA-irradiated cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology Biology**, v.85, p.205–215, 2006.

SAXON, M.E.; DAVIS, M.A.; PRITCHARD, S.G.; RUNION, G.B.; PRIOR, S.A.; STELZER, H.E.; ROGERS, H.H.; DUTE, R.R. Influence of elevated CO₂, nitrogen, and *Pinus elliotti* genotypes on performance of the redheaded pine sawfly *Neodiprion lecontei*. **Canadian Journal of Forest Research**, v.34, p.1007–1017, 2004.

- SCALBERT, A.; JOHNSON, I. T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.81, n.1, p.215S-217S, 2005.
- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v.130, p.2073-2085, 2000.
- SCHURE, M.; WESSLER, S.; FEDEROFF, N. Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. **Cell**, v.35, p.225–233, 1983.
- SCOTT, C. E.; ELDRIDGE, A. L. Comparison of carotenoid content in fresh, frozen and canned corn. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, i.6, p.551-559, 2005.
- SEDDON, J. M.; AJANI, U. A.; SPERDUTO, R. D.; HILLER, R.; BLAIR, N.; BURTON, T. C.; FARBER, M. D.; GRAGOUDAS, E. S.; HALLER, J.; MILLER, D. T. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group. **JAMA**, v.272, n.18, p.1455-6, 1994.
- SEETHARAMAN K.; TZIOTIS A.; BORRAS F.; WHITE P. J.; FERRER M.; ROBUTTI J. Thermal and functional characterization of corn from the Argentinean germplasm. **Cereal Chemistry**, v.78, p.379–386, 2001.
- SERPEN, A.; CAPUANO, E.; FOGLIANO, V.; GOKMEN, V. A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.7676-7681, 2007.
- SEGAL, G.; SONG, R.; MESSING, J. A new opaque variant of maize by a single dominant RNA-interference-inducing transgene. **Genetics**, v.165, p.387–397, 2003.
- SEMBA, R. D.; DAGNELIE, G. Are lutein and zeaxanthin conditionally essential nutrients for eye health? **Medical Hypotheses**, v.61, n.4, p.465–472, 2003.
- SHAHIDI, F. Nutraceuticals and functional foods: Whole versus processed foods. **Trends in Food Science & Technology**. Article in Press, 2008.
- SHARMA, A.; CHAUHAN, R. S. Identification of candidate gene-based markers (SNPs and SSRs) in the zinc and iron transporter sequences of maize (*Zea mays* L.). **Current Science**, v.95, n.8, 2008.
- SHEWRY, P. R. Improving the protein content and composition of cereal grain. **Journal of Cereal Science**, v.46, p.239-250, 2007.

SHKOLNIK, M.Y. **Trace Elements in Plants**; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1984.

SIMIC, D.; SUDARA, R.; LEDENCANA, T.; JAMBROVICA, A.; ZDUNICA, Z.; BRKICA, I.; KOVACEVICB, V. Genetic variation of bioavailable iron and zinc in grain of a maize population. **Journal of Cereal Science**, v.50, i.3, p.392-397, 2009.

SLAVIN, J. Why whole grains are protective: biological mechanisms. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.62, p.129-134, 2003.

SLAVIN, J. L.; MARTINI, M. C.; JACOBS JR. D. R.; MARQUART, L. Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, p.459-463, 1999.

SOMMERBURGB, O.; KEUNENC, J. E. E.; BIRDD, A. C.; KUIJKA, F. J. G. M. Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes. **British Journal of Ophthalmology**, v.82, p.907-910, 1998.

SONG, R.; LLACA, V.; LINTON, E.; MESSING, J. Sequence, regulation, and evolution of the maize 22-kDa α zein gene family. **Genome Research**, v.11, p.1817-1825, 2001.

SONG, R.; SEGAL, G.; MESSING, J. Expression of the sorghum 10-member kafirin gene cluster in maize endosperm. **Nucleic Acids Research**, v.32, p.189, 2004.

SORS, T. G.; ELLIS, D. R.; SALT, D. E. Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. **Photosynthesis Research**, v.86, n.3, p.373-389, 2005.

SOSULSKI, F.; KRYGIER, K.; HOGGE, L. Free, esterified, and insolublebound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.30, p.337-340, 1982.

STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1740, p.101-107, 2005.

STANGOULIS, J. C. R.; HUYNH, B. L.; WELCH, R. M.; CHOI, E. Y. GRAHAM, R. D. Quantitative trait loci for phytate in rice grain and their relationship with grain micronutrient content. **Euphytica**, v.154, n.3, p.289-294, 2007.

- TESSERAUD, S.; COUSTARD, S. M.; COLLIN, A.; SEILIEZ, I. Role of sulfur amino acids in controlling nutrient metabolism and cell functions: implications for nutrition. **British Journal of Nutrition**, v.101, p.1132–1139, 2009.
- SASAKI, T.; BURR, B. International Rice Genome Sequencing Project: the effort to completely sequence the rice genome. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3, i.2, p.138-142, 2000.
- THOMPSON, D. B. Strategies for the manufacture of resistant starch. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, i.7, p.245-253, 2000.
- THOMPSON, L. U.; ROBB, P.; SERRAINO, M.; CHEUNG, F. Mammalian lignan production from various foods. **Nutrition Cancer**, v.16, p.43–52, 1991.
- TOPPING, D. L.; CLIFTON, P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiological Reviews**, v.81, p.1031–1064, 2001.
- TRABER, M. G. Vitamin E regulatory mechanisms. **Annual Review of Nutrition**, v.27, p.347-362, 2007.
- TREUTTER, D. Managing phenol contents in crop plants by phytochemical farming and breeding—visions and constraints. **International Journal of Molecular Science**, v.11, p.807-857; 2010.
- TSAI, C. The function of the *Waxy* locus in starch synthesis in maize endosperm. **Biochemical Genetics**, v.11, n.2, p.83-96, 1974.
- UAUY, C.; DISTELFELD, A.; FAHIMA, T.; BLECHL, A.; DUBCOVSKY, J. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. **Science**, v.314, p.1298–1301, 2006.
- URBANO, G.; LÓPEZ-JURADO, M.; ARANDA, P.; VIDAL-VALVERDE, C.; TENORIO, E.; PORRES, J. The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function? **Journal of Physiology and Biochemistry**, v.56, n.3, p.283-294,
- USDA – United States Department of Agriculture. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov>. Acesso em: 10 março 2011.
- VALLABHANENI, R.; WURTZEL, E. T. Timing and biosynthetic potential for carotenoid accumulation in genetically diverse germplasm of maize. **Plant Physiology**, v.150, p.562–72, 2009a.

- VALLABHANENI, R.; GALLAGHER, C. E.; LICCIARDELLO, N.; CUTTRISS, A. J.; QUINLAN, R. F.; WURTZEL, E. T. Metabolite sorting of a germplasm collection reveals the Hydroxylase3 locus as a new target for maize provitamin A biofortification. **Plant Physiology**, v151, p.1635–45, 2009b.
- VALLEJO, F.; VIGUERA, C. G.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Changes in broccoli (*Brassica oleracea* L. Var. italica) health-promoting compounds with inflorescence development. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, n.13, p.3776–3782, 2003.
- VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidants activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.6, p.4113–4117, 1998.
- VENN, B. J.; MANN, J. I. Cereal grains, legumes and diabetes. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.58, p.1443-1461, 2004.
- XU, J. G.; HU, Q. P.; WANG, X. D.; LUO, J. Y.; LIU, Y.; TIANJ, C. R. Changes in the main nutrients, phytochemicals, and antioxidant activity in yellow corn grain during maturation. **Agricultural Food Chemistry**, v.58, p.5751–5756, 2010.
- XU, J.; MESSING, J. Organization of the prolamin gene family provides insight into the evolution of the maize genome and gene duplications in grass species. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.105 n.38 p.14330-14335, 2008.
- YAN, J.; YANG, X.; BAI, L.; KANDIANIS, C. B.; BRUTNELL, T.; BUCKLER, E. S.; HARJES, C. E.; FU, Z.; LI, J.; MITCHELL, S.; FERNANDEZ, M. G. S.; ZAHARIEVA, M.; PALACIOS, N.; WARBURTON, M.; ROCHEFORD, T. HYDB1 and its interaction with LCYE influence β -carotene synthesis and improve provitamin A content in maize. **Maize Genetics Conference Abstracts** 50:T9, 2008.
- YILMAZ, A.; EKIZ, H.; TORUN, B.; GULTEKIN, I.; KARANLIK, S.; BAGCI, S. A.; CAKMAK, I. Effect of different zinc application methods on grain yield and zinc concentration in wheat grown on zinc-deficient calcareous soils in Central Anatolia. **Journal of Plant Nutrition**, v.20, p.461–471, 1997.
- YU, L.; HALEY, S.; PERRET, J.; HARRIS, M. Comparison of wheat flours grown at different locations for their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v.86, p. 11–16, 2004.

- YU, L.; PERRET, J.; HARRIS, M.; WILSON, J.; HALEY, S. Antioxidant properties of bran extracts from “Akron” wheat grown at different locations. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p.1566–1570, 2003.
- YUN, S. H.; TRUSWELL, A. S. Cereal grains and coronary heart disease. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.56, p.1-14, 2002.
- YURI, A.; SCHMITT, E.; FEUCHT, W.; TREUTTER, D. Metabolism of Prunus tissues affected by Ca²⁺-deficiency and addition of prunin. **Journal of Plant Physiology**, v.135, p.692–697, 1990.
- WANG, L.; XUA, C.; QUA, M.; ZHANG, J. Kernel amino acid composition and protein content of introgression lines from *Zea mays* ssp. mexicana into cultivated maize. **Journal of Cereal Science**, v.48, i.2, p.387-393, 2008.
- WATERS, B. M.; SANKARANB, R. P. Moving micronutrients from the soil to the seeds: Genes and physiological processes from a biofortification perspective. **Plant Science**. Article in Press, 2010.
- WATTENBERG, L. W. Chemoprevention of cancer. **Preventive Medicine**, v.25, p.44-45, 1996.
- WELCH, R. M.; GRAHAM, R. D. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.396, p.353-364, 2004.
- [WHO] World Health Organization. 2000. Nutrition for health and development. In: Turning the tide of malnutrition: responding to the challenge of the 21st century. Geneva, Switzerland.
- [WHO/FAO] World Health Organization and Food and Agricultural Organization. 2009. Micronutrient malnutrition: a public health problem. In: Allen L, de Benoist B, Dary O, Hurrell R, editors. Guidelines on food fortification with micronutrients.
- WILSON, L. M.; WHITT, S. R.; IBA, A. M.; ROCHEFORD, T. R.; GOODMAN, M. M.; BUCKLER, E. S. Dissection of maize kernel composition and starch production by candidate gene association. **The Plant Cell**, v.16, p.2719–2733, 2004.
- WITZELL, J.; SHEVTSOVA, A. Nitrogen-induced changes in phenolics of *Vaccinium myrtillus*—Implications for interaction with a parasitic fungus. **Journal of Chemical Ecology**, v.30, p.1937–1956, 2004.

- 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**, v.13, p. 2297–2317, 2001.
- WU, Y.; HOLDING, D. R.; MESSING, J. γ -Zeins are essential for endosperm modification in quality protein maize. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.107, n.29, p.12810-12815, 2010.
- ZHANG, Y.; DARLINGTON, H.; JONES, H. D.; HALFORD, N. G.; NAPIER, J. A.; DAVEY, M. R.; LAZZERI, P. A.; SHEWRY, P. R. Expression of the *gamma-zein* protein of maize in seeds of transgenic barley: effects on grain composition and properties. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, p.1139–1146, 2003.
- ZHANG, J.; WU, L.; WANG, M. Can iron and zinc in rice grains (*Oryza sativa* L.) be biofortified with nitrogen fertilisation under pot conditions? **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, i.7, p.1172–1177, 2008.
- ZHAO, J.; PANG, Y.; DIXON, R. A. The mysteries of proanthocyanidin transport and polymerization. **Plant Physiology**, v.153, p.437–443, 2010.
- ZHAO, Z. Q.; ZHU, Y. G.; LI, H. Y.; SMITH, S. E.; SMITH, F. A. Effects of forms and rates of potassium fertilizers on cadmium uptake by two cultivars of spring wheat (*Triticum aestivum*, L.). **Environment International**, v.29, i.7, p.973-978, 2004.
- ZHAO, F.; MCGRATH, S.; GRAY, C.; LOPEZ-BELLIDO, J. Selenium concentrations in UK wheat and biofortification strategies. **Comparative Biochemistry and Physiology and Molecular & Integrative Physiology**, v.146, p.246-246, 2007.
- ZHOU, K.; YU, L. Antioxidant properties of bran extracts from trego wheat grown at different locations. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.52, p.1112–1117, 2004.
- ZHU, C.; NAQVI, S.; GOMEZ-GALERA, S.; PELACHO, A. M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. Transgenic strategies for the nutritional enhancement of plants. **Trends on Plant Science**, v.12, p.548–55, 2007.
- ZHU, C.; NAQVI, S.; BREITENBACH, J.; SANDMANN, G.; CRISTOU, P.; CAPELL, T. Combinatorial genetic transformation generates a library of metabolic phenotypes for the carotenoid pathways in maize. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.105, p.18232–7, 2008.

ZIELINSKI, H.; KOZLOWSKA, H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.48, p.2008–2016, 2000.

ZOBEL, H. F. Molecules to granules: a comprehensive starch review. **Starch – Starke**, v.40, i.2, p.44–50, 1988.

ZORNOZA, P.; ESTEBAN, R. M. Flavonoids content of tomato plants for the study of the nutritional status. **Plant Soil**, v.82, p.269–271, 1984.

10. ANEXOS



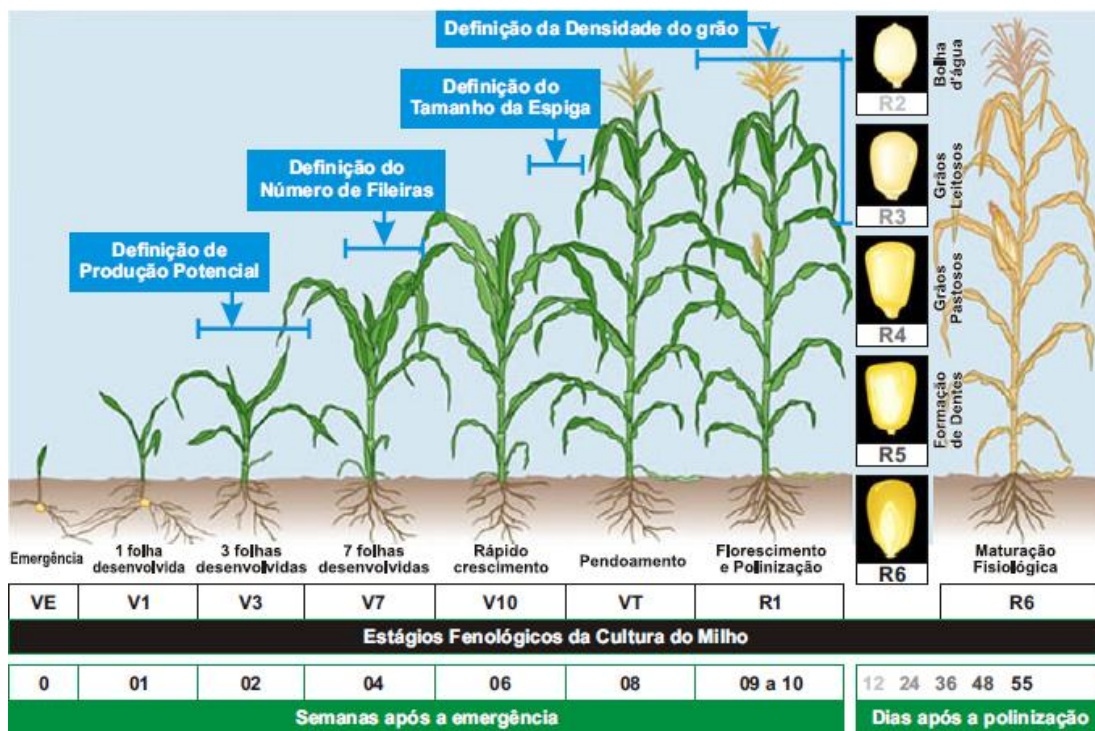
Anexo 1. Visão geral do experimento com a cultura da alface (Artigo 1).



Anexo 2. Terceira aplicação foliar dos tratamentos propostos para a cultura da alface (A) e detalhe da aplicação na folha de alface (B) (Artigo 1).



Anexo 3. Visão geral da área experimental com a cultura do milho em dois diferentes estádios de desenvolvimento (Artigo 3).



Anexo 4. Fenologia do milho: Estádios de desenvolvimento da cultura. Adaptado de Magalhães e Durães (2006), Fancelli (1986) e Iowa State University Extension (1993).



Anexo 5. Segunda aplicação foliar dos tratamentos propostos para a cultura do milho (A) e detalhe da aplicação na folha de milho (B) (Artigo 3).