



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO AMIDO NOS
CORMOS DE *Trimezia juncifolia* (KLATT) BENTH & HOOK**

VIVIANE OVIDIO DE ALMEIDA CRUZ

GOIÂNIA-GO

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor

Viviane Ovidio de Almeida Cruz

3. Título do trabalho

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO AMIDO NOS CORMOS DE *Trimezia juncifolia* (KLATT) BENTH & HOOK

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Katia Flavia Fernandes Silva**, Professor do Magistério Superior, em 13/01/2021, às 11:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **VIVIANE OVIDIO DE ALMEIDA**, Discente, em 13/01/2021, às https://sei.ufg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=1886574&infra_sistema=1000... 1/2



16:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1727913 e o código CRC 70AF113A.

VIVIANE OVIDIO DE ALMEIDA CRUZ

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO AMIDO NOS
CORMOS DE *Trimezia juncifolia* (KLATT) BENTH & HOOK**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como pré-requisito para a defesa de produto final - Nível Doutorado.

Área de Concentração: Bioquímica

Orientadora: Prof. Dra. Kátia Flávia Fernandes

GOIÂNIA-GO

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

, VIVIANE OVIDIO DE ALMEIDA CRUZ
EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO AMIDO
NOS CORMOS DE *Trimezia juncifolia* (KLATT) BENTH & HOOK
[manuscrito] / VIVIANE OVIDIO DE ALMEIDA CRUZ . - 2019.
XXXIX, 39 f.

Orientador: Profa. Dra. Prof. Dra. Kátia Flávia Fernandes.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas, Goiânia, 2019.

Bibliografia.

Inclui siglas.

1. Amilose. 2. Amilopectina. 3. Catafilo. 4. Grau de polimerização. I.
Flávia Fernandes, Prof. Dra. Kátia , orient. II. Título.

CDU 57



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE Nº 79

1
2 Aos trinta dias do mês de agosto do ano de dois mil e dezenove, às catorze
3 horas, no Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas III da Universidade
4 Federal de Goiás, reuniram-se os componentes da banca examinadora: Profa.
5 Dra. Kátia Flávia Fernandes, Profa. Dra. Karla de Aleluia Batista, Profa. Dra.
6 Moemy Gomes de Moraes, Prof. Dr. Maurício Vicente Cruz, Dra. Maria Carolina
7 Bezerra Di Medeiros Leal para, em sessão pública presidida pela primeira
8 examinadora citada, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada
9 "EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO AMIDO NOS CORMOS
10 DE *Trimezia juncifolia* (KLATT) BENTH & HOOK", em nível de doutorado, área
11 de concentração em Bioquímica e Genética, de autoria de **Viviane Ovidio de**
12 **Almeida Cruz**, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências
13 Biológicas da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela
14 presidente, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a
15 seguir, foi concedida à autora da tese que em cerca de 40
16 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação,
17 cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de
18 diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da
19 tese. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº1491 de 2017 do
20 Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o
21 Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, a tese foi
22 aprovada, considerando-se integralmente cumprido este requisito
23 para fins de obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas pela
24 Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da
25 entrega da versão definitiva da tese na Secretaria do programa, com as
26 devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

27 contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 horas
28 e 50 minutos, encerrou-se a sessão de defesa de tese e, para constar, eu,
29 Renato César Rodrigues, Assistente em Administração da Universidade Federal
30 de Goiás, lavrei a presente ata que, após lida e aprovada, será assinada pelos
31 membros da banca examinadora em três vias de igual teor.

32

33

Kátia Flávia Fernandes
Profa. Dra. Kátia Flávia Fernandes

34

35

Presidente da Banca

36

Universidade Federal de Goiás

37

38

Karla A. Batista
Profa. Dra. Karla de Aleluia Batista

39

40

Instituto Federal de Goiás – Campus Goiânia

41

42

Moemy Gomes de Moraes
Profa. Dra. Moemy Gomes de Moraes

43

44

Universidade Federal de Goiás

45

46

Maurício Vicente Cruz
Prof. Dr. Maurício Vicente Cruz

47

48

Instituto Federal de Goiás – Campus Uruaçu

49

50

Maria Carolina Bezerra Di Medeiros Leal
Dra. Maria Carolina Bezerra Di Medeiros Leal

51

52

Dedicatória

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus por me conceder saúde e força para trilhar essa jornada, ao meu esposo e a minha mãe pelo apoio e incentivo.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	X
LISTA DE FIGURAS	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DO AMIDO	17
1.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICA DO AMIDO	18
1.3 ENZIMAS DE SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE AMIDO	20
1.4 EFEITO DO ESTRESSE HÍDRICO NA SÍNTESE E PROPRIEDADES DO AMIDO	21
1.5 <i>TRIMEZIA JUNCIFOLIA</i>	22
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 COLETA DO MATERIAL	27
3.2 EXTRAÇÃO DE AMIDO	27
3.3 MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA	29
3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	29
3.5 FRACIONAMENTO DO AMIDO POR LIXIVIAÇÃO AQUOSA	29
3.6 DETERMINAÇÃO DE AMIOSE POR LIGAÇÃO DE IODO.....	30
3.7 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.....	30
3.8 CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA DE ALTO DESEMPENHO COM DETECÇÃO POR PULSO AMPEROMÉTRICO	31
3.9 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL	31
3.10 DIFRATOMETRIA DE RAIO-X	32
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32

4 RESULTADOS.....	33
5 CONCLUSÃO	33
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC – do inglês Association of *Official* Analytical Chemists / Associação oficial de química analítica

AGPase - ADP-glicose pirofosforilase

CRTI - Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação

DBEs – do inglês debranching *enzyme* / enzima desramificadora do amido

DP – do inglês degree of polymerization / grau de polimerização

DSC – do inglês Differential Scanning Calorimetry / calorimetria exploratória diferencial

DSS - do inglês dry season starch / amido coletado na estação seca

GBSS – do inglês granule-bound starch synthase / Amido sintase ligadas ao grânulo

HPAEC-PAD – do inglês high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) / Cromatografia de troca aniônica de alto desempenho, com detecção por pulso amperométrico

ISA – Isoamilase

ISO – do inglês International Organization for Standardization / Organização Internacional para Padronização

SEM – do inglês Scanning Electron Microscopy / Microscopia Eletrônica de Varredura

SBE- do inglês Starch-branching *enzymes* / enzima ramificadora

SS – do inglês Starch Synthase / Amido sintase

UV-Vis – ultravioleta visível

WSS – do inglês wet season starch/ amido coletados na estação chuvosa.

XDR – do inglês X-Ray Diffraction / Difração de raio-X

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação esquemática do grânulo de amido.....18
- Figura 2** Representação esquemática da amilopectina indicando o padrão de ramificação de cadeias α -(1,4) unidas por ligações α - (1,6).....19
- Figura 3** *Trimezia juncifolia* (Klatt) Benth & Hook.....24

RESUMO

A família Iridaceae tem como característica o armazenamento de carboidratos em órgãos subterrâneos. Algumas espécies podem armazenar mais de um tipo de carboidrato, sendo o amido o principal composto de reserva. *Trimezia juncifolia* pertence à família Iridaceae e possui um cormo como órgão subterrâneo de reserva que possui catafilos fibrosos, onde se encontra uma grande quantidade de amido. Além de atuar como fonte energética durante todas as fases fenológicas, essa reserva é utilizada para fornecer energia durante o início do crescimento vegetativo e para a manutenção do metabolismo durante períodos de estresse como a seca sazonal, momento em que a planta entra no estágio fenológico de dormência, interrompendo seu crescimento e reduzindo seu metabolismo. O amido é um polissacarídeo semi-cristalino composto por dois tipos de polímeros: a amilose e amilopectina. O amido se encontra na forma de grânulos e, dependendo da origem botânica, pode apresentar diferença na morfologia, estrutura cristalina, proporção de amilose e amilopectina, tamanho da cadeia de amilose e amilopectina. Assim, o objetivo deste trabalho foi extrair e caracterizar quimicamente o amido do cormo de *T. juncifolia* nas estações seca e chuvosa. O rendimento da extração do amido resultou em 57,2% na estação chuvosa e 69,2% na estação seca. Os grânulos de amido apresentaram uma distribuição bimodal em relação ao tamanho, sendo que o tamanho dos grânulos da estação seca foi maior (3.69-33.75 μm) que na estação chuvosa (2.78-14.4 μm) e com formato similar ao de trigo. A análise de birrefringência foi maior na estação chuvosa. O teor de amilose foi de 44% para amido de cormos coletados na estação seca e 41% na estação de chuva. Os estudos com análise por cromatografia de troca aniônica de alto desempenho, com detecção por pulso amperométrico (HPAEC-PAD) mostraram pouca diferença entre os amidos, sendo os valores de grau de polimerização de amilopectina da estação chuvosa 81 e da seca 80. A amilose foi o polímero que apresentou diferença mais acentuada no grau de polimerização, com valores de 51 na estação de chuva e 41 na estação seca. As análises de raio-X revelaram que o amido na estação seca apresentou semelhança com polimorfo

do tipo-A mais compacto e aqueles extraídos na estação chuvosa com o polimorfo do tipo-C que é a mistura de A e B. Os valores de cristalinidade foram 27% na estação chuvosa e 25.9 na estação seca. Análises de DSC revelaram que as temperaturas de transição endotérmica também apresentaram diferenças, sendo na chuva $T_o = 39.7\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_p = 84.1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_c = 157.4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\Delta T = 117.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ e na seca $T_o = 27.6\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_p = 73.9\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_c = 116.6\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\Delta T = 89\text{ }^{\circ}\text{C}$. O valor da entalpia também variou, sendo na chuva $\Delta H = 84.9\text{ J g}^{-1}$ e na seca $\Delta H = 54.9\text{ kJ g}^{-1}$. Os resultados obtidos no trabalho sugerem a ocorrência de alterações nas características bioquímicas do amido de *T. juncifolia* em função da disponibilidade de água no ambiente.

Palavras-Chave: Amilose; Amilopectina; Catafilo; Cadeias; Grau de polimerização.

ABSTRACT

The members of Iridaceae family have the storage of carbohydrates in underground organs as main characteristic. Some Iridaceae species might store more than one type of carbohydrate, being starch the main reserve compound. *Trimezia juncifolia* belongs to the Iridaceae family and has a corm as an underground reserve organ and has fibrosis cataphylls, which presents a large amount of starch. This starch reserve is used to provide energy during the onset of vegetative growth and to maintain metabolism during periods of stress, such as the seasonal drought, when the plant is under the phenological stage of dormancy, interrupting its growth and reducing its metabolism. Starch is a semi-crystalline polysaccharide composed of two types of polymers: amylose and amylopectin. The starch is stored as granules and may present differences in morphology, crystalline structure, amylose and amylopectin ratio and chain size, depending on the botanical origin. In this sense, the objective of this work was to extract and characterize the starch from corms of *T. juncifolia* collected in the dry and wet season. Results evidenced a yield of starch extraction in the range of 57.2% in the wet season and 69.2% in the dry season. The starch granules presented a bimodal size distribution. The size of starch extracted in the dry season was higher (3.69-33.75 μm) than extracted in the wet season (2.78-14.4 μm) and both presented shape similar to wheat starch. The content of amylose was 44 % and 41 % for starch from corms collected in dry season and wet season, respectively. The birefringence of starch granules was higher in wet season. The degree of polymerization of amylopectin analyzed through chromatography showed a slight difference between starch from wet (DP 81) and dry (DP 80) season. Amylose branches showed higher difference in the degree of polymerization between wet (DP 51) and dry (DP 41) season. X-ray analysis revealed differences in starch stored in the corms. Starch from dry season presented similarity with type-A polymorph more compact whereas a C-type polymorph a mixture of type-A and type-B was observed in the wet season. The crystallinity values were 27% and

25.9% for wet and dry season starches, respectively. The endothermic transition temperature were: wet season $T_o = 39.7\text{ }^\circ\text{C}$, $T_p = 84.1^\circ\text{C}$, $T_c = 157.4\text{ }^\circ\text{C}$ and $\Delta T = 117.7\text{ }^\circ\text{C}$; dry season: $T_o = 27.6\text{ }^\circ\text{C}$, $T_p = 73\text{ }^\circ\text{C}$, $T_c = 116.6\text{ }^\circ\text{C}$ and $\Delta T = 89\text{ }^\circ\text{C}$. Furthermore, the enthalpy changes (wet season: $\Delta H = 84.9\text{ J g}^{-1}$ / dry season: $\Delta H = 54.9\text{ kJ g}^{-1}$) were accessed by DCS analysis. In conclusion, the results of this study indicate that the water availability in the environment results in biochemical changes in the characteristics of the starch stored in the cataphylls from *T. juncifolia*.

Keywords: Amylose; amylopectin; season; chains; degree of polymerization.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estrutura e composição do amido

Dentre os carboidratos de reserva, o amido é o polissacarídeo mais importante nas plantas, por sua ampla distribuição entre diferentes espécies vegetais. O amido tem ainda grande importância comercial por sua utilização na fabricação de bebidas, colas, cosméticos, detergente, têxtil, papel e na produção de embalagens biodegradáveis (1, 2). O amido é um polissacarídeo semi-cristalino composto por dois tipos de polímeros: a amilose e amilopectina. Ambos os polímeros possuem ligações α -1,4 e α -1,6 entre unidades de α -D-glicopirranose, porém, a amilose é um polímero majoritariamente linear ou pouco ramificado formado principalmente por unidades de α -D-glicopirranose ligadas em α -1,4 e a amilopectina que é o polímero altamente ramificado, formado por unidades de α -D-glicopirranose com ligações α -1,4 na cadeia principal e α -1,6 nas ramificações (3).

O amido ocorre na forma de grânulos e pode apresentar, dependendo da origem botânica, diferenças na morfologia, estrutura cristalina, proporção de amilose e amilopectina, tamanho da cadeia de amilose e amilopectina.

O grânulo de amido possui um arranjo estrutural com uma região altamente ordenada e empacotada e uma região menos ordenada. A região mais empacotada é formada por polímeros de amilopectina e é, portanto, responsável pela cristalinidade do grânulo (4). A cristalização ocorre pela associação de duas cadeias de amilopectina formando dupla hélice ou "clusters". Estes clusters se orientam paralelamente para formar a lamela cristalina. A região amorfa é a porção menos ordenada do grânulo, composta pela amilose com uma conformação em hélice na qual a região interna é mais hidrofóbica do que a região externa que é mais hidrofílica (5, 6).

Quando o grânulo de amido de milho ceroso foi observado em um corte ultrafino através de microscopia eletrônica de transmissão, o grânulo de amido apresentou camadas alternadas de porções amorfas e porções semi-cristalinas, criando a aparência de anéis de crescimento (7). Esse crescimento se inicia a partir do hilo (centro) no qual se encontra uma grande proporção de

terminais redutores das moléculas de amido, e é normalmente menos organizado que o resto do grânulo, sendo que o número e tamanho dos anéis dependem da origem botânica (Figura 1) (8).

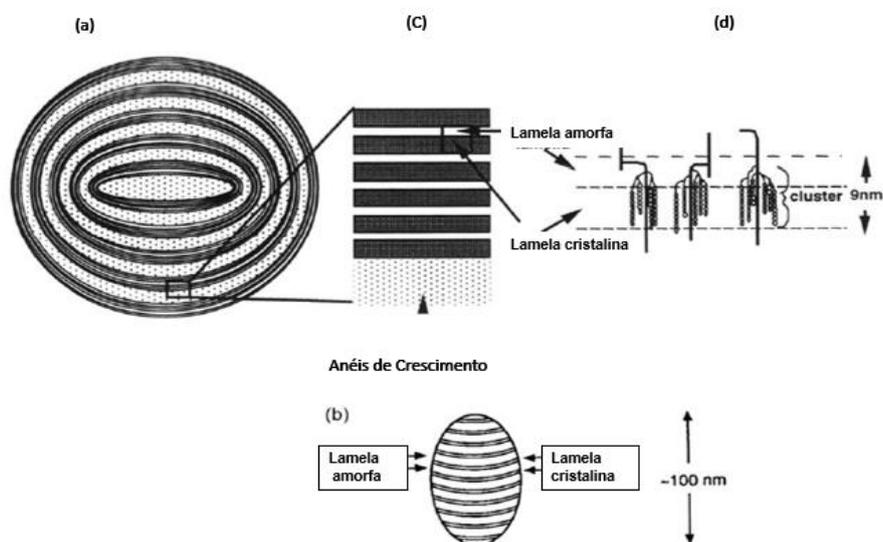


Figura 1. Representação esquemática do grânulo de amido: (a) anéis de crescimento com região amorfa e semi-cristalina no grânulo de amido, (b) blocos (c) lamelas amorfa e lamelas cristalinas dispostas em camadas e uma parte do anel de crescimento amorfo (d) Dupla hélices alinhadas (de cadeias laterais de amilopectina) dentro de uma lamela cristalina e pontos de ramificação da amilopectina dentro de uma lamela amorfa. Adaptado de Vandeputte e Delcour, (2004).

1.2 Características físico-química do amido

A amilopectina é dividida em três classes de cadeias de glicose: A, B e C. A cadeia-A se liga apenas a clusters de cadeia-B, a cadeia-B se liga a clusters de cadeia-B e a cadeia-C é aquela que possui o final redutor (9). Hanashiro, Abe e Hizukuri. (10) investigaram a distribuição do comprimento da cadeia usando cromatografia de troca aniônica de alto desempenho, com detecção por pulso amperométrico (HPAEC-PAD). Nestes estudos a amilopectina foi fracionada conforme o grau de polimerização (referente a quantidade de resíduos de glicose e classificada em: tipo-A (6-12), tipo B₁ (13-24), tipo B₂ (25-36) e tipo B₃ >36 (Figura 2). O grau de polimerização refere-se

ao número de moléculas de glicose presentes no polímero. Para essa análise é necessário o uso de enzimas desramificadoras como, por exemplo, isoamilase ou pululanase, que quebram as ligações α -1,6 (11).

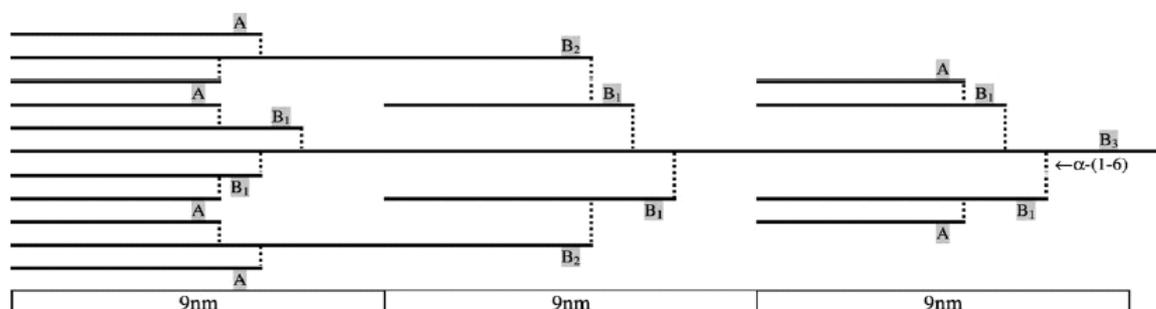


Figura 2. Representação esquemática da amilopectina indicando o padrão de ramificação de cadeias α 1,4 unidas por ligações α 1,6 A, B1-B3. Adaptado de Hizukuri, (1986).

O tamanho da cadeia de amilopectina varia de acordo com a origem botânica e pode definir a cristalinidade do grânulo. Outro fator que influencia a cristalinidade dos diferentes tipos de amido é o teor de amilose, sendo que a cristalinidade pode ser menor em amidos que possuem um maior teor de amilose (12).

A cristalinidade pode ser observada quando o amido é submetido à microscopia de luz polarizada e isso confere ao grânulo, uma propriedade de birrefringência. A birrefringência do grânulo é observada nas porções cristalinas que promovem a refração da luz polarizada devido a um alinhamento radial das cadeias dos polímeros, resultando em uma cruz escura no centro do grânulo conhecida como Cruz de Malta (5). Uma menor birrefringência pode indicar uma menor cristalinidade do amido (6).

A cristalinidade do grânulo de amido também pode ser classificada em diferentes tipos de acordo com as análises de difração de raio-X, sendo os amidos classificados em polimorfo tipo A, tipo B e tipo C, este último uma mistura dos tipos A e B. O tipo A é mais encontrado em sementes de cereais; o

tipo B em tubérculos e cereais que possuem maior proporção de amilose; e o tipo C em rizomas e sementes de leguminosas (12-14). Existem alguns autores que propõe adicionalmente a existência de cadeias do tipo V, que é formada pela amilose complexada com outras substâncias como lipídeos, iodo, alcoóis e fenóis (5).

Amidos apresentando polimorfo do tipo A possui cadeia mais curta, enquanto que polimorfo do tipo B possui cadeia mais longa. O amido que se apresenta como polimorfo do tipo C possui cadeias intermediárias (9). Além de apresentarem cadeias mais curtas, os amidos do tipo A também apresentam uma estrutura mais compacta que as do tipo-B, que apresenta uma estrutura mais aberta com maior hidratação (8).

Em geral, o grau de cristalinidade varia entre 10 a 50% dependendo da origem botânica do amido (15). Por exemplo, amidos de órgãos subterrâneos como o de batata, apresentam 26% de cristalinidade (16), enquanto o da raiz tuberosa de mandioca tem valor de cristalinidade de 40% (17).

Outra característica do amido é que quando aquecido na presença de água acontece uma ruptura estrutural do grânulo. Essa ruptura dá início ao processo de gelatinização, que ocorre primeiro na região amorfa do grânulo, onde as moléculas de água se ligam por interação de hidrogênio aos grupos hidroxila expostos de amilose e amilopectina (18). O tamanho da cadeia de amilopectina e o grau de cristalinidade influenciam na temperatura de gelatinização. Segundo Liu et al. (19), a entalpia de gelatinização depende da proporção de amilose e amilopectina. Amilopectina com cadeia curta tem menor temperatura de gelatinização, devido à tendência a não formar dupla hélice (8). Quando o amido possui maior quantidade de amilopectina, a entalpia de gelatinização é mais alta do que para amidos que possuem maior proporção de amilose (20).

1.3 Enzimas de síntese e degradação de amido

A síntese do amido ocorre pela ação de quatro enzimas:

1- ADP-glicose pirofosforilase: esta enzima catalisa a conversão de glicose-1-fosfato em ADP-glicose;

2- amido sintase: as amido sintases incluem 5 classes de enzimas que são divididas em 2 isoformas de amido sintase ligadas ao grânulo (GBSS I e GBSS II), responsáveis pelo alongamento da amilose, e 4 isoformas de amido sintase livres (SS I, SS II, SS III e SS IV);

3- enzima ramificadora do amido: esta enzima está presente como 2 isoformas (SBE I e SSBE II) que clivam ligações α -1,4 para transferir unidades de glicose para a posição C6 e;

4- enzima desramificadora do amido ou DBEs: estas se apresentam como 3 isoformas de isoamilase (ISA I, ISA II e ISA III) que hidrolisam ligações α -1,6 e parecem ser um componente essencial na formação cristalina da amilopectina. (21-23).

1.4 Efeito do estresse hídrico na síntese e propriedades do amido

Estudos mostram que a biossíntese e o armazenamento do amido podem ser afetados por fatores ambientais externos, incluindo a seca (24). As enzimas que catalisam a síntese do amido são sensíveis às mudanças ambientais. Alterações nas atividades das enzimas responsáveis pela síntese do amido podem alterar substancialmente a estrutura e composição do grânulo (25, 26).

Ahmadi e Baker (27) mostraram que o estresse hídrico durante o desenvolvimento de grãos causa grandes perdas de rendimento em cereais, incluindo o trigo. Isto ocorre devido a um declínio na atividade de muitas enzimas (AGPase, SS, GBSS) relacionadas com a síntese de amido, devido à redução no conteúdo de água nos grãos, sendo que a SS é a enzima com maior declínio na atividade.

Estudos com tubérculos de batata mostraram que em condições de estresse hídrico severo a SS perde afinidade pela ADP-glicose, que acumula na célula, causando uma inibição também da AGPase. No entanto, a atividade da sacarose sintase aumenta, o que pode ser em decorrência da inibição da SS (28).

O estresse hídrico pode alterar a cristalinidade do amido. Isso porque uma redução na atividade da GBSS pode causar uma diminuição na síntese de amilose e conferir maior cristalinidade, que também influencia na temperatura de gelatinização (29), como foi verificado em trigo (30) e arroz (31). Outros estudos mostraram alterações em seis variedades de milho ceroso submetidos ao alagamento. Neste estudo, a cristalinidade foi reduzida na maioria das variedades devido a uma diminuição das cadeias longas de amilopectina (32).

O estresse hídrico pode causar uma redução no tamanho dos grânulos de amido do tipo-A (maiores que 10 µm de diâmetro) e um aumento significativo no tamanho dos grânulos de amido do tipo-B (menores que 10 µm de diâmetro) (32), provavelmente pela degradação dos grânulos maiores com o propósito de manter os processos fisiológicos como a respiração, já que ocorre uma diminuição na capacidade fotossintética (25, 33, 34).

É comum ocorrer alterações no fluxo de carbono e no crescimento de plantas expostas ao déficit hídrico devido à diminuição na fixação de carbono em decorrência do fechamento dos estômatos nas folhas, uma estratégia para evitar a perda de água (34). O amido extraído de mandioca cultivada em condições de estresse hídrico apresentou uma menor proporção de grânulos menores (35). Estudos com grânulos de amido de trigo apresentaram uma maior proporção de grânulos do tipo-B em solos não irrigados (36). Esses estudos mostram a influência da água na síntese do amido e nas suas características físico-químicas. No entanto, a compreensão dos efeitos do estresse hídrico nas propriedades morfológicas e físico-química do amido ainda é limitada.

1.5 *Trimezia juncifolia*

A família Iridaceae compreende um grupo de plantas monocotiledôneas da ordem Asparagales, com mais de 2030 espécies, sendo amplamente distribuída pelo mundo (37). No Brasil, a família Iridaceae possui 11 gêneros e 50 espécies (38). As Iridaceae são ervas perenes ou anuais, com um sistema subterrâneo do tipo cormo, bulbo ou rizoma (37, 39).

As espécies que pertencem à família Iridaceae têm sua fenologia adaptada à variação sazonal (40) e estão incluídas no grupo das geófitas que

armazenam carboidratos em órgãos subterrâneos durante o período de crescimento vegetativo, mobilizam os carboidratos de reserva para suprir as necessidades fisiológicas quando entram na fase de dormência, rebrotando quando as condições são favoráveis (41). A dormência é a fase fenológica sem organogênese visível, sendo considerada uma estratégia adaptativa para sobreviver a condições ambientais extremas. Quando as condições ambientais são favoráveis (como na estação chuvosa), a dormência é quebrada resultando em um crescimento contínuo (42-44).

Algumas espécies podem armazenar mais de um tipo de carboidrato, sendo o amido o principal composto de reserva em Iridaceae, como mostra o estudo de Ranwala e Miller, (2008) com quatro espécies do gênero *Iris*. Estudos realizados com espécies de Iridaceae encontradas no Cerrado (*Cipura paludosa*, *Cipura paludosa* e *Trimezia juncifolia*) mostraram que o amido é o principal carboidrato de reserva destas espécies (45).

As plantas da espécie *Trimezia juncifolia* (Klatt) Benth. & Hook (Figura 3) se destacam por ser amplamente distribuída no Brasil, sendo encontradas principalmente nos campos rupestres do Cerrado, devido à adaptação dessa espécie ao ambiente xérico. Suas folhas são cilíndricas e rígidas, com considerável quantidade de células esclerenquimáticas, e o sistema subterrâneo é formado por um cormo alongado com catafilos fibrosos (38). O cormo é um local importante de reserva de carboidratos não estruturais, e essa reserva é utilizada para fornecer energia durante o início do crescimento vegetativo e para a manutenção do metabolismo durante períodos de estresse como a seca sazonal. Este tipo de estresse hídrico é característico no bioma Cerrado, que possui duas estações bem definidas, a de seca e a de chuva (40, 46-48).

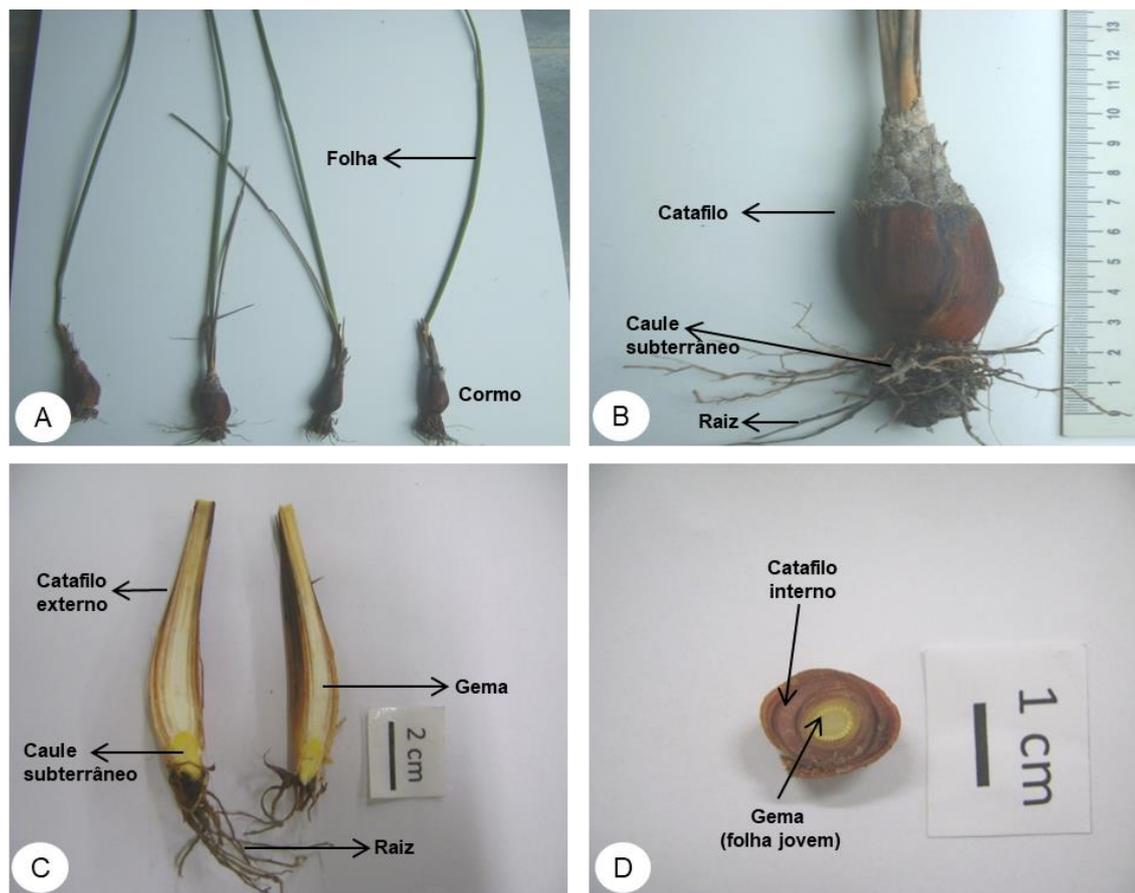


Figura 3. *Trimezia juncifolia* (Klatt) Benth & Hook. (A). Visão geral da espécie. (B). Vista geral do cormo. (C). Corte longitudinal do cormo. (D). Corte transversal do cormo.

Os açúcares simples são produzidos pela fotossíntese nos cloroplastos, onde podem ser convertidos em amido, o qual pode ser armazenado temporariamente nestas estruturas durante o período de luz. O amido sintetizado nos cloroplastos é convertido em sacarose, que é o principal carboidrato de transporte dos órgãos fonte para os órgãos drenos como, por exemplo, os órgãos subterrâneos de armazenamento, onde ocorrerá a conversão da sacarose em amido de reserva dentro dos amiloplastos (23, 49-51). Os sistemas subterrâneos das plantas, como os tubérculos, bulbos, cormos, raízes tuberosas e rizomas, funcionam como um dos principais locais de armazenamento a longo prazo dessas biomoléculas (52, 53).

Neste sentido, os estudos dessas alterações estruturais nos grânulos de amido influenciadas pelas alterações ambientais, tais como períodos de seca e

de chuva, fornecem informações importantes, não apenas de como essa principal reserva de energia é modificada quimicamente para garantir a sobrevivência da planta, mas também sobre as rotas metabólicas utilizadas para a manutenção deste estoque de energia para dar suporte à rebrota no período de chuva. Para tal, o estudo das alterações estruturais nos grânulos de amido de *T. juncifolia* influenciado pelas alterações ambientais mostra-se valioso, uma vez que esta planta é uma espécie que sobrevive em ambiente de extremos, com uma estação chuvosa e outra de longa estiagem, e utiliza-se de amido como carboidrato de reserva.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliação do efeito do estresse hídrico nas propriedades físico-químicas de amidos extraídos do catafilo de *Trimezia juncifolia*.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a morfologia e o tamanho do grânulo de amido de *T. juncifolia*.
- Avaliar o grau de pureza do amido extraído de *T. juncifolia*.
- Analisar o teor de amilose do grânulo de amido.
- Identificar o comprimento da cadeia do polímero de amilose e amilopectina.
- Identificar o grau de cristalinidade e o tipo de polimorfo do amido de *T. juncifolia*.
- Analisar as características térmicas dos amidos de *T. juncifolia*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material

Os cormos *Trimezia juncifolia* foram coletados na Reserva Biológica Professor José Angelo Rizzo (16°22'-15°48'S e 50°44'-49°55'W), localizada na Serra Dourada, próximo ao município de Mossâmedes, GO, Brasil, em altitudes entre 700-1.080m. As coletas foram feitas no mês de fevereiro de 2016, na estação chuvosa, com precipitação média de 100 mm no mês, quando a planta se encontrava na fase fenológica de crescimento vegetativo. Uma segunda coleta foi feita no mês de junho de 2016, na estação seca, com precipitação média de 0 mm no período, quando a planta se encontrava na fase fenológica de dormência. Os dados de médios de precipitação foram obtidos do Instituto Nacional de Meteorologia (54).

Os cormos coletados foram embalados em sacos plásticos e transportados para o Laboratório de Química de Polímeros, da Universidade Federal de Goiás, onde os catafilos que compõe o corno foram separados do caule subterrâneo e da raiz e foram lavados em água corrente. Posteriormente, os catafilos foram acondicionados em sacos de polietileno e armazenados em freezer -20 °C até a extração do amido.

3.2 Extração de amido

Os catafilos foram cortados e triturados em um liquidificador de inox (Spolu SPL- 022) com uma solução de ácido cítrico 0,8% (p/v) em uma proporção de 100 g de matéria-prima para 200 mL de solução (55). Em seguida a solução de amido foi separada usando uma peneira (32 mesh), para retenção das fibras existentes no catafilo. A suspensão obtida na peneiragem foi deixada em recipiente de polipropileno *overnight*, em geladeira a 4°C. O precipitado obtido foi centrifugado a 1430 g por 5 min e o sobrenadante descartado. O precipitado de amido foi seco em temperatura de 25°C, até a obtenção de peso constante.

A determinação de massa seca foi medida usando 2 g de amostra de catafilo previamente pesados e posteriormente deixados em estufa a 40 °C,

durante 24 h. Após esse período a amostra foi pesada novamente e a massa seca foi calculada como mostrado abaixo:

$$\text{Massa seca: } \text{massa inicial} - \text{massa final} \quad \text{Equação 1}$$

A massa inicial é a massa fresca e a massa final é a massa após o tempo de 24 h na estufa.

O rendimento do amido total extraído (baseado em massa seca) do catafilo de *T. juncifolia* na estação de seca e de chuva foi calculado através da seguinte equação:

$$\text{Rendimento do amido total (\%)} = \frac{S}{P_i} \cdot 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde S é a quantidade em gramas de amido extraído e Pi é o peso inicial em massa seca da amostra.

O grau de pureza do amido extraído foi avaliado por meio do método multienzimático oficial AOAC 996.11 (56). Para isto foram pesados 50 mg de amido, aos quais foram adicionados 0,1 mL de etanol a 80% (v/v) e 1,5 mL de α -amilase (1:10 v/v) preparada em tampão acetato de sódio pH 5,6. Seguiram-se três etapas de incubação e agitação: incubação de 50 mmol L⁻¹ a 100 °C por 2 min e agitação por 30 s; a incubação a 100 °C por 3 min e agitação por 30 s; e, incubação a 50 °C por 10 min. Em seguida adicionou-se 4 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 4,5 e 0,1 mL de glicoamilase. Incubou-se a 50 °C por 30 min. Em seguida o material foi centrifugado (1430 x g, 5 min) e o sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL. O volume foi ajustado com água destilada e a glicose da solução foi dosada. As dosagens de glicose foram feitas usando o Kit comercial de determinação de glicose por glicose-oxidase (Gold Analisa Diagnóstica). Foram adicionados 2 mL de hidróxido de potássio 2 mol L⁻¹ ao precipitado e agitou-se por 20 min. Em seguida foram repetidos os procedimentos de hidrólise com α -amilase (sem diluir) e glicoamilase sem diluir. A amostra foi novamente centrifugada (1430 x g, 5 min) e o sobrenadante foi transferido novamente para um balão volumétrico de 10 mL. O volume foi ajustado com água destilada e foi feito a

segunda dosagem de glicose.. O conteúdo de amido total foi calculado usando a seguinte equação:

$$Pureza\ do\ amido\ (\%) = A \cdot \frac{F}{W} \cdot \frac{162}{180} \quad \text{Equação 3}$$

Onde A é a absorbância da amostra; F é o fator de conversão do valor de absorbância em microgramas de glicose; W é peso em miligramas do amido analisado; e a constante 0,9 refere-se ao fator de conversão de glicose em amido.

3.3 Microscopia de luz polarizada

As análises foram feitas usando amido de *T. juncifolia* coletados durante a estação seca e de chuva. Foi colocada uma alíquota do amido sobre a lâmina e a ele adicionou-se uma gota de água. Em seguida, foi colocada uma lamínula sobre a amostra e as imagens foram obtidas com o aumento de 40x usando o microscópio Leica com câmera digital modelo ICC50, com programa de captura de imagem LAD EZ versão 1.8.1, sendo as escalas obtidas nas mesmas condições ópticas.

3.4 Microscopia eletrônica de varredura

A análise foi feita no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) localizado na Universidade Federal de Goiás, GO, Brasil. A amostra de amido em pó foi fixada com fita dupla face, em suportes de alumínio e posteriormente metalizada com uma camada de ouro de 350 Å de espessura. As análises dos grânulos foram feitas usando um detector com 15 kV de aceleração (JEOL, JSM – 6610).

3.5 Fracionamento do amido por lixiviação aquosa

A amilose e amilopectina foram separadas segundo método de Mua e Jackson, (1998). Foram pesados 400 mg de amido e adicionado 10 mL de água destilada a 60 °C, em constante agitação por 1 h. Após a centrifugação a 1430 g por 5 min, retirou-se o sobrenadante e colocou-se em um frasco

separado. A extração foi repetida por mais três vezes utilizando o mesmo resíduo e o mesmo volume. A amilopectina precipitada foi liofilizada. Em seguida, a amilose contida no sobrenadante foi precipitada pela adição de butanol na proporção de 3:1 e liofilizada.

3.6 Determinação de amilose por ligação de iodo

Foi utilizado 1 mg de amilose, 90 µL de hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹, 15 µL de etanol a 95% (v/v) e 895 µL de água destilada. A solução foi fervida a temperatura de 90 °C por 10 min. Para a determinação de amilose foram usados 300 µL da amostra, 100 µL de ácido acético 1 mol L⁻¹, 200 µL de iodo a 0,2% (p/v) e 4,4 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi feita no espectrofotômetro a 620 nm (ISO 2015).

O conteúdo de amilose foi calculado inserindo-se os valores das absorbâncias de cada amostra na equação da reta obtida através de uma curva de calibração usando padrão de amilose extraída de batata (Sigma-Aldrich) na faixa de 5-30 µg mL⁻¹ ($r^2 = 0,9887$).

3.7 Preparo das amostras para análises cromatográficas

As reações enzimáticas de desramificação foram feitas usando a enzima isoamilase (EC 3.2.1.68 - glicogênio-6-glicano-hidrolase) Sigma.

Para a desramificação da amilopectina 10 mg de amostra foram solubilizadas com 988 µL de tampão acetato 50 mM, pH 4,5 e pré-gelatinizadas a 80 °C. Após resfriar, foram adicionadas 6 U de isoamilase e a suspensão foi incubada em banho-maria a 45 °C por 15 h (57). A amostra retirada do banho foi centrifugada a 1430 g por 10 min, e purificada usando um filtro de 0.45 µm e em seguida injetada no cromatógrafo.

O preparo da amilose seguiu protocolo semelhante. A 1 mL de água ultrapura foram adicionados 10 mg de amilose e a suspensão foi fervida a 80 °C por 5 min. A amostra foi centrifugada 1430 g por 10 min, passada por filtro de 0.45 µm e em seguida injetada no cromatógrafo.

3.8 Cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detecção por pulso amperométrico

As análises foram feitas por cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detecção por pulso amperométrico (HPAEC-PAD) em um sistema de cromatografia Dionex ICS-5000, usando uma coluna CarboPac PA-100 (4 x 250 mm) acoplado a coluna guarda.

A coluna foi equilibrada com uma com uma solução resultante da mistura do eluente B (150 mmol L⁻¹ de hidróxido de sódio) e do eluente C (500 mmol L⁻¹ de acetato de sódio em 150 mmol L⁻¹ de hidróxido de sódio). Todas as amostras foram filtradas em membranas de 45 µm antes da injeção. As amostras foram eluídas em um gradiente de acetato de sódio em hidróxido de sódio 150 mmol L⁻¹, como segue: 0 - 10 min, 5 mmol L⁻¹; 10.1-20 min, 15 mmol L⁻¹; 20.1- 95 min 25 mmol L⁻¹; 95.1-120 min 165 mmol L⁻¹; 120.1-130 min 500 mmol L⁻¹; 130.1-145 min 5 mmol L⁻¹. A vazão do eluente foi de 1 cm³ min⁻¹. Os potenciais aplicados seguiram as recomendações do fabricante.

A identificação da do grau de polimerização das amostras foi feita com base na comparação nos tempos de retenção de padrões de 3-6 malto-oligossacarídeos (Sigma Aldrich) na concentração de 160 µg mL⁻¹ obtidos nas mesmas condições cromatográficas.

3.9 Calorimetria Exploratória Diferencial

As análises foram feitas no Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação – CRTI. Os termogramas foram obtidos pela técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC), usando um equipamento Shimadzu DSC-60 PLUS. As medidas foram feitas no intervalo de temperaturas de 25 a 250 °C, usando uma taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹, fluxo de nitrogênio 200 mL min⁻¹ em cadinhos de alumínio selado. A partir da curva, obteve-se a entalpia de gelatinização (ΔH), a temperatura de gelatinização (ΔT), as temperaturas no início de gelatinização (T_o), temperatura no pico (T_p) e temperatura final (T_c). A região sombreada no gráfico de DSC (inserção) é proporcional à entalpia calorimétrica de fusão, ΔH^{exp} . A entalpia de fusão de

Van't Hoff, ΔH^{VH} foi determinada conforme descrito por Mantveev et al. (58) e está representada na seguinte Equação:

$$\Delta H^{VH} = 2 \cdot T_m \cdot R^{1/2} (\Delta C_p^* - 0,5 \cdot \Delta C_p^{exp})^{1/2} \quad \text{Equação 4}$$

Onde R é a constante dos gases, T_m representa a temperatura de fusão dos amidos, ΔC_p^* é a ordenada máxima do traço DSC, e ΔC_p^{exp} refere-se à diferença nas capacidades caloríficas dos estados fundido e nativo das dispersões.

3.10 Difratomia de raio-X

A análise de raios-X foi realizada em amostras de amido em forma de pó utilizando um difratômetro Bruker D8 Discover. Utilizou-se radiação monocromática de um tubo com ânodo de cobre acoplado a um monocromador Johansson para K1 operando em 40kV e 40mA, configuração Bragg-Brentano - 2, detector unidimensional Lynxeye, intervalo de 2 de 3° a 80°, com passo de 0,01°. As amostras foram mantidas em rotação de 15 rpm durante a medida. A cristalinidade das amostras foi calculada utilizando a ferramenta do software Bruker Diffrac.Eva. V 2.1, segundo a equação:

$$\% \text{ amorfa} = \frac{\text{Área global} - \text{Área reduzida}}{\text{Área global}} \cdot 100 \quad \text{Equação 5}$$

3.11 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

4 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho são apresentados em formato de artigo.

Carbohydrate Polymers 212 (2019) 304–311



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol



Effect of drought stress on the morphological and physicochemical properties of starches from *Trimezia juncifolia*



Viviane O. Almeida^a, Karla A. Batista^{a,b}, Maria C.B. Di-Medeiros^a, Moemy G. Moraes^c, Kátia F. Fernandes^{a,*}

^a Laboratório de Química de Polímeros, Instituto de Ciências Biológicas, ICB 2, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^b Departamento de Áreas Acadêmicas, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, Campus Goiânia Oeste, Goiânia, GO, Brazil

^c Laboratório de Fisiologia Vegetal, Instituto de Ciências Biológicas, ICB 1, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

5 CONCLUSÃO

- O rendimento de amido de *Trimezia juncifolia* obtido na extração foi maior que os obtidos de outras fontes tradicionais de amido, (seca 69,2% e chuva 57,2%) indicando que o corno de *T. juncifolia* é muito promissor como fonte de amido para o uso comercial.
- Os grânulos de amido de *T. juncifolia* são lisos, sem fissuras e apresentaram distribuição de tamanho bimodal. Embora a forma dos grânulos seja semelhante, o tamanho variou em função da estação em que foram coletados. O tamanho do amido da estação seca variou de 2,78 a 14,4 μm , enquanto o amido da estação chuvosa variou de 3,69 a 33,75 μm , sugerindo uma relação entre o tamanho médio do grânulo de amido e o estado fisiológico da planta em função da estação do ano.
- O conteúdo de amilose nos catafilos apresentou diferença em função da estação em que foram coletados e o maior rendimento de lixiviação da amilose foi observada no DSS (44%), enquanto na estação chuvosa foi de 41%.
- O termograma apresenta o padrão característico dos amidos, com um único pico de energia exortérmico com temperatura de pico de 84,1 °C para amido na estação seca e 73,9 °C para amido na estação chuvosa.
- O amido da estação seca apresentou um difratograma compatível com polimorfo tipo-A e o amido da estação chuvosa como polimorfo tipo-C, devido à presença de picos característicos do polimorfo do tipo-B e do tipo-A.
- O grau de polimerização da amilopectina do catafilo na estação de chuva foi maior (81) do que na estação seca (80). O grau de polimerização da amilose foi maior na estação chuvosa (51) do que na estação seca (40).
- Pelos resultados obtidos pode-se concluir que ocorrem alterações nas características bioquímicas do amido de *T. juncifolia* em função da disponibilidade de água no ambiente.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Davis JP, Supatcharee N, Khandelwal RL, Chibbar RN. Synthesis of Novel Starches in Planta: Opportunities and Challenges. 2003;55(3-4):107-20.
2. Martin C, Smith AM. Starch biosynthesis. The Plant cell. 1995 Jul;7(7):971-85.
3. Beninca C, Colman TAD, Lacerda LG, Filho MASC, Bannach G, Schnitzler E. The thermal, rheological and structural properties of cassava starch granules modified with hydrochloric acid at different temperatures. Thermochemica Acta. 2013 2013/01/20;552:65-9.
4. Jane J-I. Structure of Starch Granules. Journal of Applied Glycoscience. 2007;54(1):31-6.
5. Tester RF, Karkalas J. The Effects of Environmental Conditions on the Structural Features and Physico-chemical Properties of Starches. 2001;53(10):513-9.
6. Pérez S, Bertoft E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. 2010;62(8):389-420.
7. Gallant DJ, Bouchet B, Baldwin PM. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. Carbohydrate Polymers. 1997 1997/03/01;32(3):177-91.
8. Vandeputte GE, Delcour JA. From sucrose to starch granule to starch physical behaviour: a focus on rice starch. Carbohydrate Polymers. 2004 2004/11/25;58(3):245-66.
9. Hizukuri S. Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. Carbohydr Res. 1986 1986;147:342-7.
10. Hanashiro I, Abe J, Hizukuri S. A periodic distribution of the chain length of amylopectin as revealed by high-performance anion-exchange chromatography. Carbohydrate Research. 1996;283:151-9.
11. Van Hung P, Lan Phi NT, Vy Vy TT. Effect of debranching and storage condition on crystallinity and functional properties of cassava and potato starches. 2012;64(12):964-71.

12. Cheetham NWH, Tao L. Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. *Carbohydrate Polymers*. 1998 1998/08/01/;36(4):277-84.
13. Bogracheva TY, Morris VJ, Ring SG, Hedley CL. The granular structure of C-type pea starch and its role in gelatinization. 1998;45(4):323-32.
14. Pi-xin W, Xiu-li W, Xue D-h, Xu K, Tan Y, Du X-b, et al. Preparation and characterization of cationic corn starch with a high degree of substitution in dioxane–THF–water media. *Carbohydrate Research*. 2009 2009/05/12/;344(7):851-5.
15. Lopez-Rubio A, Flanagan BM, Gilbert EP, Gidley MJ. A novel approach for calculating starch crystallinity and its correlation with double helix content: A combined XRD and NMR study. 2008;89(9):761-8.
16. Yusuph M, Tester RF, Ansell R, Snape CE. Composition and properties of starches extracted from tubers of different potato varieties grown under the same environmental conditions. *Food Chemistry*. 2003 2003/08/01/;82(2):283-9.
17. Cooke D, Gidley MJ. Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinisation: origin of the enthalpic transition. *Carbohydrate Research*. 1992 1992/04/06/;227:103-12.
18. Singh N, Singh J, Kaur L, Singh Sodhi N, Singh Gill B. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*. 2003 2003/05/01/;81(2):219-31.
19. Liu H, Yu L, Xie F, Chen L. Gelatinization of cornstarch with different amylose/amylopectin content. *Carbohydrate Polymers*. 2006;65:357-63.
20. Wang TL, Bogracheva TY, Hedley CL. Starch: as simple as A, B, C? *Journal of Experimental Botany*. 1998;49(320):481-502.
21. He W, Wei C. Progress in C-type starches from different plant sources. *Food Hydrocolloids*. 2017;73:162-75.
22. Tetlow IJ. Understanding storage starch biosynthesis in plants: a means to quality improvement. *Botany*. 2006;84:1167-85.
23. Zeeman SC, Kossmann J, Smith AM. Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. 2010;61(1):209-34.
24. He J-F, Goyal R, Laroche A, Zhao M-L, Lu Z-X. Water stress during grain development affects starch synthesis, composition and physicochemical

- properties in triticale. *Journal of Cereal Science*. 2012 2012/11/01/;56(3):552-60.
25. Beckles DM, Thitisaksakul M. How environmental stress affects starch composition and functionality in cereal endosperm. 2014;66(1-2):58-71.
26. Alvani K, Oi X, Tester RF, Snape CE. Physico-chemical properties of potato starches. *Food Chemistry*. 2011;125:958-65.
27. Baker AA, Miles MJ, Herbert W. Internal structure of the starch granule revealed by AFM. *Carbohydrate Research*. 2001;330:249-56.
28. Geigenberder P. Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. *Plant Physiology*. 2011;155:1566-77.
29. Bertoft E. Understanding Starch Structure: Recent Progress. 2017;7(3):56.
30. Singh S, Singh G, Singh P, Singh N. Effect of water stress at different stages of grain development on the characteristics of starch and protein of different wheat varieties. *Food Chemistry*. 2008 2008/05/01/;108(1):130-9.
31. Liu DH, Zhang, J. L., Cao, J. H., Wang, Z. H., Yu, C., & Jin, D. M. . The reduction of amylose content in rice grain and decrease of Wx gene expression during endosperm development in response to drought stress. . *J Food Agric Environ*. 2010;8:873-8.
32. Lu D, Cai X, Shi Y, Zhao J, Lu W. Effects of waterlogging after pollination on the physicochemical properties of starch from waxy maize. *Food Chemistry*. 2015 2015/07/15/;179:232-8.
33. Ceusters N, Van den Ende W, Ceusters J. Exploration of Sweet Immunity to Enhance Abiotic Stress Tolerance in Plants: Lessons from CAM. In: Cánovas FM, Lüttge U, Matyssek R, editors. *Progress in Botany Vol 78*. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 145-66.
34. Hu M, Shi Z, Xu P, Li H, Zhang ZJB. Wheat acclimate to water deficit by modifying carbohydrates metabolism, water use efficiency, and growth. [journal article]. 2015 September 01;38(3):505-15.
35. Santisopasri V, Kurotjanawong K, Chotineeranat S, Piyachomkwan K, Sriroth K, Oates CG. Impact of water stress on yield and quality of cassava starch. *Industrial Crops and Products*. 2001 2001/03/01/;13(2):115-29.

36. Dai Z-M, Yin Y-P, Zhang M, Li W-Y, Yan S-H, Cai R-G, et al. Distribution of Starch Granule Size in Grains of Wheat Grown Under Irrigated and Rainfed Conditions. *Acta Agronomica Sinica*. 2008 2008/05/01/;34(5):795-802.
37. Goldblatt P, Rodriguez A, Powell MP, Davies JT, Manning JC, van der Bank M, et al. Iridaceae 'Out of Australasia'? Phylogeny, Biogeography, and Divergence Time Based on Plastid DNA Sequences. *Systematic Botany*. 2008 //;33(3):495-508.
38. CHUKR NSG, A. M. . Revisão de *Trimezia* Salisb. ex Herb. (Iridaceae) para o Brasil. *Sitientibus Série Ciências Biológicas* 2008;08:15-58.
39. Goldblatt P, Manning JC. Radiation of pollination systems in the Iridaceae of sub-Saharan Africa. *Annals of botany*. [Article]. 2006 2006-03;2006 v.97 no.3(no. 3):pp. 317-44.
40. Ruiters C, Mckenzie B. Seasonal Allocation and Efficiency Patterns of Biomass and Resources in the Perennial Geophyte *Sparaxis-Grandiflora* Subspecies *Fimbriata* (Iridaceae) in Lowland Coastal Fynbos, South-Africa. *Annals of Botany*. 1994 Dec;74(6):633-46.
41. Khodorova NV, Boitel-Conti M. The Role of Temperature in the Growth and Flowering of Geophytes. 2013;2(4):699-711.
42. Rohde A, Bhalerao RP. Plant dormancy in the perennial context. *Trends in Plant Science*. 2007 2007/05/01/;12(5):217-23.
43. Horvath D. Common mechanisms regulate flowering and dormancy. *Plant Science*. 2009 2009/12/01/;177(6):523-31.
44. Shefferson RP. The evolutionary ecology of vegetative dormancy in mature herbaceous perennial plants. 2009;97(5):1000-9.
45. Almeida VO, Carneiro RV, Carvalho MAM, Figueiredo-Ribeiro RCL, Moraes MG. Diversity of non-structural carbohydrates in the underground organs of five Iridaceae species from the Cerrado (Brazil). *South African Journal of Botany*. 2015;96:105-11.
46. Hoffmann WA, Jackson RB. Vegetation–Climate Feedbacks in the Conversion of Tropical Savanna to Grassland. 2000;13(9):1593-602.
47. Stancato GC, Mazzafera P, Buckeridge MS. Effect of a drought period on the mobilisation of non-structural carbohydrates, photosynthetic efficiency and water status in an epiphytic orchid§1Part of the Ph.D. thesis of Giulio Cesare

- Stancato (Instituto de Biologia, UNICAMP). *Plant Physiology and Biochemistry*. 2001 2001/11/01/;39(11):1009-16.
48. Mittler R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*. 2006 2006/01/01/;11(1):15-9.
49. POLLOCK CJ. TANSLEY REVIEW NO. 5 FRUCTANS AND THE METABOLISM OF SUCROSE IN VASCULAR PLANTS. 1986;104(1):1-24.
50. Sauer N. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. 2007;581(12):2309-17.
51. Dietze MC, Sala A, Carbone MS, Czimczik CI, Mantooth JA, Richardson AD, et al. Nonstructural carbon in woody plants. *Annual Review of Plant Biology*. 2014;65:667-87.
52. Dietrich SMC, & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Carboidratos de reserva em plantas superiores e sua importância para o homem. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 1986;61:65-71.
53. Appezzato-da-Glória B, Cury G. Morpho-anatomical features of underground systems in six Asteraceae species from the Brazilian Cerrado. *An Acad Bras Cienc*. 2011 2011/09//;83(3):981-92.
54. Meteorologia) IINd. Instituto Nacional de Meteorologia. 2016 [cited 2016 02/08]; Available from: www.inmet.gov.br.
55. Pascoal AM, Di-Medeiros MCB, Batista KA, Leles MGI, Lião LM, Fernandes KF. Extraction and chemical characterization of starch from *S. lycocarpum* fruits. *Carbohydrate Polymers*. 2013;98:1304-10.
56. AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. Gaithersburg: AOAC Int. 2000.
57. Tako M, Hizukuri S. Molecular origin for the thermal stability of Koshihikari rice amylopectin. *Food Research International*. 2000 2000/01/01/;33(1):35-40.
58. Matveev YI, Soest JJGV, Nieman C, Wasserman LA, Protserov VA, Ezernitskaja M, et al. The relationship between thermodynamic and structural properties of low and high amylose maize starches. *Carbohydrate Polymers*. 2001;44:151-60.