

ANÁLISE DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS EM PLANTAS DE ARROZ

ANALYSIS OF SOLUBLE CARBOHYDRATES IN RICE PLANTS

Hélio Aparecido Matos Filho¹, Renata de Castro Marques Carvalho²

¹ Autor para correspondência; Universidade Federal de Goiás - heliomatos1010@gmail.com

² Universidade Federal de Goiás

Info

Recebido: 12/2019

Publicado: 04/2020

DOI: 10.29247/2358-260X.2020v7i1.4118

ISSN: 2358-260X

Palavras-Chave

teor de amido, estresse hídrico, glicose, frutose, sacarose

Keywords:

starch content, water stress, glucose, fructose, sucrose

Resumo

Oryza Sativa L. é uma planta cujo fruto, arroz, é um prato típico do brasileiro, e adaptado ao cerrado brasileiro. A planta de arroz é rica em carboidratos. Neste trabalho foi analisado os teores de carboidratos solúveis totais em plantas de arroz da cultivar BRS Primavera submetidas ou não ao estresse hídrico e verificar se as plantas sob restrição hídrica apresentam maior teor de carboidratos solúveis nas folhas. Utilizou-se amostras secas de folhas de plantas de arroz da cultivar BRS Primavera, com as seguintes identificações (72.3: amostra sem condições de estresse hídrico; 83.1 e 83.3: amostras sob condições de estresse hídrico). Verificou-se que as plantas de arroz da cultivar BRS Primavera que estavam em condições de estresse hídrico apresentaram 119,87 e 81,36 mg de carboidratos por grama de matéria seca, nas amostras 83.3 e 83.1, respectivamente. Já as plantas que foram mantidas sob

condições ótimas de umidade no solo apresentaram 49,45 mg. g⁻¹ de carboidratos solúveis. O teor de amido nas folhas de arroz foi maior nas plantas mantidas em condições de estresse hídrico. As amostras 83.1 e 83.3 apresentaram 3,62 e 11,12 mg de amido por grama de matéria seca a mais que a amostra 72.3 (sem restrição hídrica). Os resultados obtidos para o amido seguiram o mesmo comportamento dos resultados de glicose, frutose e sacarose, indicando que plantas de arroz cultivadas em condições de estresse hídrico tendem a aumentar o teor de carboidratos solúveis totais nas folhas como resposta de defesa às condições limitantes de umidade no solo. Conclui-se que plantas de arroz mantidas em condições de estresse hídrico apresentam maior teor de carboidratos não estruturais em suas folhas, quando comparadas às plantas cultivadas em condições ideais de água no solo.

Abstract

Oryza Sativa L. is a plant whose fruit, rice, is a typical Brazilian dish, and adapted to the Brazilian cerrado. The rice plant is rich in carbohydrates. In this work it was analyzed the total soluble carbohydrate contents in rice plants of cultivar BRS Primavera submitted or not to water stress and to verify if the plants under water restriction have higher soluble carbohydrate content in the leaves. Dry leaf samples of rice plants of cultivar BRS Primavera were used, with the following identifications (72.3: sample without water stress conditions; 83.1 and 83.3: samples under water stress conditions). Rice plants of cultivar BRS Primavera that were under water stress conditions were found to have 119.87 and 81.36 mg of carbohydrate per gram of dry matter, in samples 83.3 and 83.1, respectively. The plants that were kept under optimal conditions of soil moisture showed 49.45 mg. g⁻¹ of soluble carbohydrates. The starch content of rice leaves was higher in plants maintained under water stress conditions. Samples 83.1 and 83.3 showed 3.62 and 11.12 mg starch per gram of dry matter more than sample 72.3 (without water restriction). The results obtained for starch followed the same behavior as glucose, fructose and sucrose results, indicating that rice plants grown under water stress tend to increase the total soluble carbohydrate content in leaves as a defense response to moisture limiting conditions. in the ground. It was concluded that rice plants maintained under water stress conditions present higher non-structural carbohydrate content in their leaves when compared to plants grown under ideal soil water conditions.

INTRODUÇÃO

A cultura do arroz (*Oryza sativa* L.) possui grande importância, pois é fonte primária de alimentação para mais de um terço da população mundial. Sua produção global em 2018 foi de 475,8 milhões de toneladas, o que corresponde por cerca de 22% da produção de grãos no cenário mundial (USDA, 2019). O Brasil participa com 12,43 milhões de Mg (2,17% da produção mundial) e destaca-se como único país não-asiático entre os 10 maiores produtores (CONAB, 2018). Apesar de sua importância, o setor sofre com a competitividade de outras culturas mais rentáveis, tais como a soja (Freitas & Mendonça, 2016), milho (CONAB, 2019), além de restrições ambientais, principalmente em função da temperatura do ar (Santos & Santiago, 2014) e irradiação solar (Heinemann, 2010) e déficit hídrico (Kadam, 2015).

A deficiência hídrica é a principal responsável pela baixa produtividade e instabilidade de produção do arroz de sequeiro. Os períodos de estiagem são caracterizados pela alta demanda evaporativa do ar, altos níveis de radiação solar e temperaturas elevadas (Steinmetz & Meireles, 1999), podendo até causar a perda total da lavoura (Crusciol et al., 2003). A cultura do arroz apresenta sistema radicular superficial e alta exigência de água, sendo, portanto, pouco tolerante a períodos longos de deficiência hídrica (Wreger et al., 2001).

Alguns mecanismos morfofisiológicos podem estar relacionados com a tolerância à deficiência hídrica, tais como o uso moderado de água pela planta, habilidade de as raízes explorarem camadas mais profundas do solo, diminuição no volume das células, aumento na concentração do protoplasto, diminuição no tamanho das folhas, maior espessura e cerosidade da cutícula foliar, ângulo de inclinação da folha, além de acúmulo de compostos, como sacarose, frutose, amido, entre outros (Nguyen et al., 1997).

Estudos demonstram que plantas em condições de estresse hídrico tendem a aumentar os teores de carboidratos solúveis totais. Chaves Filho & Seraphin (2001), verificaram que plantas de lobeira submetidas ao estresse hídrico (40% da capacidade de campo) tiveram aumento no teor de carboidratos solúveis totais de 17,96 mg. g⁻¹ de MS nas folhas e 38 mg. g⁻¹ de MS nas raízes comparadas ao tratado sem estresse hídrico. O aumento no teor de carboidratos solúveis totais foi observado por Irigoyen et al. (1992) em folhas de alfafa (*Medicago sativa*) como resposta ao estresse hídrico. Os teores de carboidratos solúveis totais foram de 90 mgg⁻¹ de MS para um potencial hídrico de -1,5 MPa e de 170 mg. g⁻¹ de MS para um potencial hídrico de -2,8 MPa nas folhas. O objetivo deste trabalho foi analisar os teores de carboidratos solúveis totais em plantas de arroz da cultivar BRS Primavera submetidas ou não ao estresse hídrico.

MATERIAL E MÉTODOS

As análises de carboidratos solúveis foram feitas no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, durante a disciplina de Tópicos Especiais em Produção Vegetal. Utilizou-se amostras secas de folhas de plantas de arroz da cultivar BRS Primavera submetidas ou não ao estresse hídrico.

As amostras correspondiam às seguintes identificações:

1. 72.3: amostra seca de folhas de arroz da BRS Primavera sem condições de estresse hídrico (umidade do solo mantida na capacidade de campo);
2. 83.1 e 83.3: amostra seca de folhas de arroz da BRS Primavera sob condições de estresse hídrico.

Método para extração e quantificação dos carboidratos solúveis nas folhas de arroz

Para a extração e quantificação dos carboidratos nas folhas de arroz pesou-se 30 mg de matéria seca de folha de arroz que foram armazenadas em tubo falcon e adicionou-se 3 ml de etanol 80%. As amostras foram agitadas manualmente, a fim de garantir a homogeneização. Em seguida, as amostras foram levadas ao banho maria por 15 minutos a uma temperatura de 80°C. Após, foi realizada a centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos a 25°C. O sobrenadante foi reunido em um tubo falcon de 15 ml. O procedimento foi repetido por mais quatro vezes, com o intuito de garantir a realização da extração exaustiva. O resíduo foi levado a estufa a uma temperatura de 50°C por 24 horas para posterior extração de amido. Ao fim deste procedimento tinha-se um volume total de 15 ml de extrato bruto etanólico. Adicionou-se ao extrato bruto clorofórmio (10% do volume do extrato bruto) para realizar a purificação. O extrato foi levado para a centrífuga durante 10 minutos a uma rotação de 2500 rpm para a separação de fases e eliminação dos constituintes apolares.

Para realizar a leitura das amostras no espectrofotômetro, utilizou-se 10 µl da fração aquosa e 490 µl de água deionizada, totalizando 500 µl de amostra. Adicionou-se às amostras 2,5 ml de ácido sulfúrico e 500 µl de fenol sulfúrico. Em seguida, realizou-se a leitura no espectrofotômetro a 490 nm. Cada amostra foi feita em triplicata. Após a leitura, fez-se os cálculos de carboidratos solúveis presentes nas amostras, com base na equação obtida na solução padrão (Eq. 1). $Y = 0,0221x + 0,0329$, em que Y= Absorbância e x= Concentração de Glicose

Método para análise de açúcares neutros

Para analisar os açúcares neutros e suas respectivas quantidades presentes nas amostras,

utilizou-se 3 ml de extrato que foram purificadas em uma coluna de troca iônica. Para isso, utilizaram-se seringas de 10 ml preenchidas com resinas catiônicas e aniônicas. Colocou-se nas seringas um disco de lã de vidro, a fim de evitar a perda da resina. Após o preenchimento das colunas, a amostra foi aplicada primeiramente na seringa que contém resina na forma catiônica, localizada acima da seringa contendo resina aniônica. Colocaram-se as amostras dos extratos concentrados no topo das colunas e deu-se a eluição com água deionizada. Em seguida, verificou-se o pH das amostras, ajustando-o para uma faixa entre 6,9 e 7,2.

Após o ajuste do pH, as amostras foram secas em evaporador rotativo, a uma temperatura de 40 °C. Assim que se verificou que as amostras estavam secas, retirou-as do evaporador e procedeu-se a ressuspensão, utilizando 3 ml de água ultrapura.

A partir da amostra ressuspensa, fez-se a análise qualitativa dos carboidratos, por meio da Cromatografia de Troca Aniônica de Alto Desempenho Acoplado à Detecção Eletroquímica Pulsada (HPAEC/PAD). Utilizou-se 1 ml de amostra que foi filtrada, a fim de garantir maior grau de pureza. As amostras foram comparadas com a solução padrão contendo glicose, sacarose e frutose.

Método para quantificação enzimática de amido

A análise de amido presente na amostra foi feita a partir do resíduo sólido obtido após a extração exaustiva dos carboidratos solúveis totais. Pesou-se 10 mg de cada amostra e adicionou-se 0,4 ml da enzima α -amilase. Em seguida, fez-se a incubação do material por 30 minutos a 75° C. As amostras foram resfriadas até atingir 50 °C, acrescentando-se 0,4 ml de amilglucosidase com posterior incubação por 30 minutos a 50 °C. O procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 60 U/ml. Após as incubações acrescentou-se 100 µl de ácido perclórico e fez-se a

centrifugação por 2 minutos. O precipitado formado foi descartado e o sobrenadante utilizado para a quantificação de amido.

Para a confecção da curva padrão utilizou-se alíquotas de 10 µl de solução padrão de glicose (100 ml. dL⁻¹), nas concentrações de 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 µg ml⁻¹. Adicionou-se 300 µl de GOD/POD e fez-se a incubação em microplacas por 15 min a 37 °C. Depois da incubação o teor de glicose foi determinado em leitor de microplacas de ELISA em comprimento de onda 490 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de carboidratos solúveis nas folhas de arroz foi maior nas plantas que estavam em condições de estresse hídrico (Tabela 1). Verificou-se que as plantas de arroz da cultivar BRS Primavera que estavam em condições de estresse hídrico apresentaram 119,87 e 81,36 mg de carboidratos por grama de matéria seca, nas amostras 83.3 e 83.1, respectivamente. Já as plantas que foram mantidas sob condições ótimas de umidade no solo apresentaram 49,45 mg. g⁻¹ de carboidratos solúveis.

Tabela 1. Teor de carboidratos solúveis totais em folhas de arroz da cultivar BRS Primavera mantidas sem restrição hídrica e com restrição hídrica.

Carboidratos	83.3	83.1	72.3
	Com restrição hídrica		Sem restrição hídrica
Carb. Solúveis (µg. µL ⁻¹)	0,60739	0,440723	0,248899
Açúcar no extrato (mg)	3,64434	2,64434	1,493396
Matéria seca extrato (g)	0,0304	0,0325	0,0302
mg. g ⁻¹ MS	119,8796	81,3643	49,45021

Os resultados obtidos corroboram com Marur (1998) em plantas de *Gossypium hirsutum* L. sob condições de estresse hídrico. O autor verificou que o teor de amido e os níveis de açúcares redutores aumentaram significativamente nas plantas submetidas ao estresse hídrico. Charles Filho & Seraphin (2001), também verificaram o mesmo comportamento em plantas de *Solanum lycocarpum* com restrição hídrica. O teor de carboidratos solúveis teve aumento de 17,96 mg. g⁻¹ de MS nas plantas sob estresse hídrico. Segundo Kramer (1995), a seca exerce importante influência no teor de carboidratos em diversas espécies. Em virtude do efeito da seca o amido é degradado nos tecidos que o acumulam. A redução na quantidade de amido é uma consequência da atividade da amilase, sendo acompanhada por um aumento da quantidade de açúcares solúveis redutores. Na maioria das plantas, a sacarose é o principal açúcar exportado dos locais de síntese (folhas) para as regiões de consumo (caule,

raízes, raízes e órgãos reprodutivos) onde será utilizada para o crescimento e/ou armazenamento. As hexoses liberadas a partir da hidrólise de sacarose podem ser utilizadas em processos anabólicos e catabólicos e também fornecendo açúcares redutores para o processo de ajustamento osmótico. Dentre as enzimas que participam dessa hidrólise, as invertases parecem ser mais ativas do que a sacarose sintase (Kingston-Smith et al., 1999).

Segundo Zhong et al. (2018), as atividades de glutamato desidrogenase, transaminase glutâmico-oxalacética e transaminase glutâmico-pirúvica são aumentadas em condições de menor disponibilidade de água no solo. Como consequência, os aminoácidos e o açúcar solúvel são significativamente aumentados. Os açúcares podem agir como protetores osmóticos durante a desidratação celular causada por estresses abióticos, tal como o estresse hídrico. Os açúcares induzem as atividades de outros componentes do

sistema antioxidante de uma planta. Nos últimos anos, estudos tem mostrado que os açúcares também têm sido caracterizados por sua via de sinalização, que modula a expressão de importantes genes que fornecem tolerância ao estresse abiótico para a planta (Gangola & Ramadoss, 2018).

Os perfis cromatográficos dos carboidratos solúveis das folhas de amostras estão representados nas

figuras 1, 2 e 3. Em todas foram identificadas glicose, sacarose e frutose. As amostras 8 G 83.3 submetidas a restrição hídrica apresentaram picos de retenção e condutividade semelhantes quando comparadas à amostra 72.3 (sem restrição hídrica) (Figuras 1, 2 e 3, respectivamente). Os picos correspondem à glicose; frutose e sacarose, respectivamente.

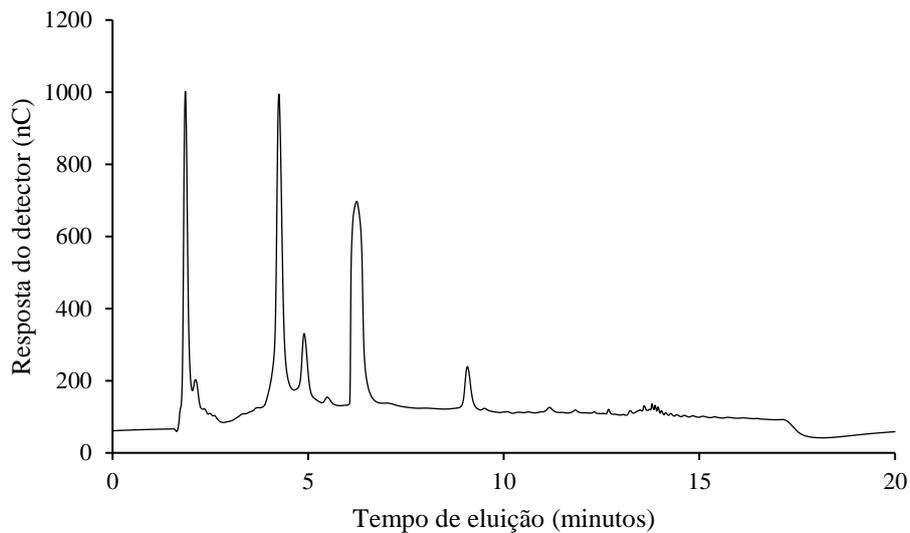


Figura 1. Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD em folhas de plantas de arroz da BRS Primavera sem estresse hídrico (Amostra 72.3) (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose. Amostra 72.3.

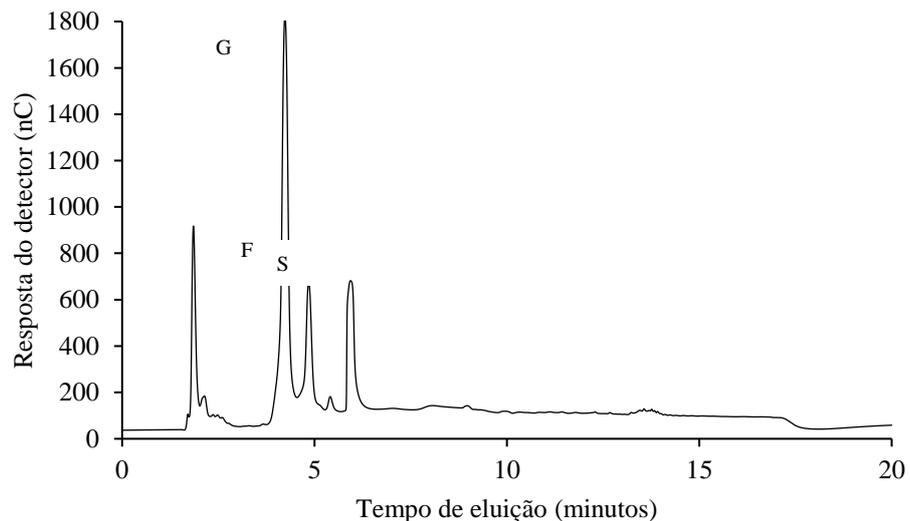


Figura 2. Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD em folhas de plantas de arroz da BRS Primavera sob estresse hídrico (Amostra 83.1). (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose.

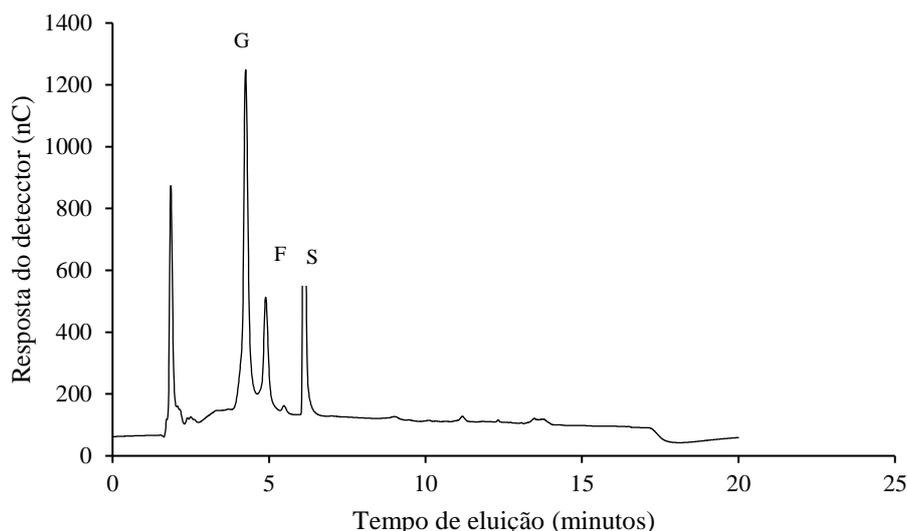


Figura 3. Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD em folhas de plantas de arroz da BRS Primavera sob estresse hídrico (Amostra 83.3). (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose.

Verificou-se que plantas de arroz mantidas em condições ótimas de água no solo, apresentaram menor teor de carboidratos totais (89.33), quando comparadas às plantas mantidas em condições limitantes de umidade no solo (138.39 e 121.34, para as amostras 83.1 e 83.3, respectivamente (Tabela 2).

Os açúcares, álcoois de açúcar e amido são os principais componentes do pool de carbono móvel nas plantas. O estresse hídrico afeta substancialmente o balanço de carbono nas plantas, bem como as reservas de carbono móvel, podendo levar à sua exaustão e ao

desenvolvimento de carência de carbono. Além de sua função como compostos de reserva, muitos açúcares e álcoois de açúcar desempenham funções específicas de proteção sob estresse hídrico, atuando como compostos osmoticamente ativo. Pode-se supor que a rafinose (polímeros naturais de frutose que usualmente são encontrados ligados a uma molécula inicial de glicose) e os álcoois de açúcar não cíclicos desempenham um papel na resposta de muitas espécies ao estresse hídrico (Ivanov et al., 2019).

Tabela 2. Carboidratos solúveis (Sacarose, Frutose e Glicose) presentes em folhas de plantas de arroz da cultivar BRS Primavera sem e com restrição hídrica, obtidas por HPAEC/PAD.

Amostras	Carboidratos ($\mu\text{g/ml}$)			
	Sacarose	Frutose	Glicose	Total
Sem restrição hídrica (72.3)	43.36	13.84	32.13	89.33
Com restrição hídrica (83.1)	61.62	21.80	54.97	138.39
Com restrição hídrica (83.3)	89.14	7.04	25.16	121.34

O teor de amido nas folhas de arroz foi maior nas plantas mantidas em condições de estresse hídrico (Tabela 3). As amostras 83.1 e 83.3 apresentaram 3.62 e 11.12 mg de amido por grama de matéria seca a mais que a amostra 72.3 (sem restrição hídrica). Os resultados obtidos para o amido seguiram o mesmo comportamento dos resultados de glicose, frutose e

sacarose, indicando que plantas de arroz cultivadas em condições de estresse hídrico tendem a aumentar o teor de carboidratos solúveis totais nas folhas como resposta de defesa às condições limitantes de umidade no solo. Segundo Tretheway & Smith (2000), o amido é o carboidrato de reserva mais abundante nas plantas em termos quantitativos. É constituído por diferentes

- genético. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 29 - 36, 2010.
- IVANOV, Y. V., KARTASHOV, A. V., ZLOBIN, I. E., SARVIN, B., STAVRIANIDI, A. N., & KUZNETSOV, V. V. Water deficit-dependent changes in non-structural carbohydrate profiles, growth and mortality of pine and spruce seedlings in hydroculture. **Environmental and experimental Botany**, v. 157, p. 151 - 160, 2019.
- IRIGOYEN, J.J., EMERICH, D.W. & SÁNCHEZ-DÍAZ, M. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. **Physiolgia Plantarum** 84:55-60, 1992.
- Jl, K. X.; WANG, Y. Y.; SUN, W. N.; LOU, Q. J.; MEI, H. W.; SHEN, S. H.; CHEN, H. Drought-responsive mechanisms in rice genotypes with contrasting drought tolerance during reproductive stage. **Journal Plant Physiology**, v. 169, p. 336 – 344, 2012.
- KADAM, NN, YIN, X., BINDRABAN, PS, STRUIK, PC E JAGADISH, KS. A plasticidade morfológica e anatômica durante o estágio vegetativo torna o trigo mais tolerante ao estresse hídrico que o arroz. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 167, n. 4, p. 1389-1401, 2015.
- KATHIRESAN A, LAFITTE H. R, CHEN J. X, MANSUETO L, BRUSKIEWICH, R, BENNETT, J. Gene expression microarrays and their application in drought stress research. **Field Crop Research**, v. 97, p. 102 – 110, 2006.
- KRAMER, P. J. **Water relations of plants and soils**. Academic Press, London, 1995.
- MARUR, C. J. Fotossíntese e translocação de carboidratos em algodoeiros submetidos a déficit hídrico após a aplicação de cloreto de mepiquat. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, p. 59 – 64, 1998.
- NGUYEN, H. T.; BABU, R. C.; BLUM, A. Breeding for drought resistance in rice: physiology and molecular genetics considerations. **Crop Science**, v. 37, n. 5, p. 1426-1437, 1997.
- PREISS, J. Plant starch synthesis. In: Eliasson, A. C. (Ed.). **Starch in food-structure, function and applications**. Boston: New Yorj; Washington: CRC Press, 2004. p. 3 – 49.
- RICH, S. M.; WATT, M. Soil conditions and cereal root system architecture: review and considerations for linking Darwin and Weaver. **Journal Experimental Botany**, v. 64, p. 1193 – 1208, 2013.
- SANTOS, A. B.; SANTIAGO, C. M. **Informações técnicas para a cultura do arroz irrigado nas regiões norte e nordeste do Brasil**. Embrapa Arroz e Feijão. Santo Antônio de Goiás, 2014.
- STEINMETZ, S.; MEIRELES, E.J.L. Clima. In: VIEIRA, N. R.A. **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. cap.3, p.58-87.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. *Rice outlook:2018*. Disponível em:< <https://www.ers.usda.gov/publications/pub-details/?pubid=92852>>. Acesso em 03 set. 2019.
- TRETHERWAY, R.; SMITH, A. M. Starch metabolism in leaves. In: LEEGOOD, R. C.; SHARKEY, T.; VON CAEMMERER, S. **Photosynthesis: Physiology and Metabolism**. Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 205 – 231.
- ZHONG, C., CAO, X., BAI, Z., ZHANG, J., ZHU, L., HUANG, J., & JIN, Q. O metabolismo do nitrogênio se correlaciona com a aclimação da fotossíntese ao estresse hídrico de curto prazo no arroz (*Oryza sativa* L.). **Fisiologia vegetal e Bioquímica**, v. 125, p. 52-62, 2018.
- WREGER, M.S.; CARAMORI, P. H.; GONÇALVES, S. L.; COLASANTE, L. O.; FUKOSHIMA, M. T.; ABUD, N. S. Determinação das melhores épocas de semeadura do arroz de sequeiro, *Oryza sativa*, no Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, v.23, n.5, p.1179-1183, 2001.