Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Análise das alterações no perfil amino-proteico em acessos de arroz
(*Oryza sativa* L.) em função da diversidade do acúmulo de zinco em grãos

Mônica Regina Franco

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2018

Mônica Regina Franco
Bióloga

**Análise das alterações no perfil amino-proteico em acessos de arroz (*Oryza sativa* L.) em
função da diversidade do acúmulo de zinco em grãos**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Franco, Mônica Regina

Análise das alterações no perfil amino-proteico em acessos de arroz (*Oryza sativa* L.) em função da diversidade do acúmulo de zinco em grãos / Mônica Regina Franco - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

88 p.

Tese (Doutorado) - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Proteínas de reserva 2. Aminoácidos totais livres 3. Metabolismo da lisina
4. Fitato 5. Grão integral e polido I. Título

Dedico esse trabalho para minha família, que sempre esteve ao meu lado,

nunca me permitindo abandonar meu sonho.

Todos eles, sem exceções, foram essenciais para que esse trabalho tivesse fim, e

para que essa etapa da minha vida fosse concluída com êxito.

Saiam que vocês sempre serão meu porto seguro, para aqueles que sempre

remete meus bons pensamentos e minha gratidão.

Ofereço meu trabalho e esforço de mais de quatro anos à minha filha Alice;

Que ela possa sentir orgulho de sua mãe, e que essa minha realização seja um

exemplo de persistência e dedicação.

Foi o seu amor que não me permitiu desistir minha pequena!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente meu orientador, Prof. Ricardo. Obrigado por depositar sua confiança em mim, por me apoiar quando passei por dificuldades em meu trabalho, por estar ali sempre pronto para ajudar no que fosse possível. Nunca vou esquecer o que fez por mim, principalmente por permitir fazer parte dessa equipe, na qual encontrei grandes exemplos de profissionalismo, e ainda mais gratificante, grandes amigos!

Agradeço imensamente à Dra. Salete Ap. Gaziola ou simplesmente “Sal”, como é carinhosamente chamada por aqueles que a conhecem e, passam então a admirar a mulher forte e dedicada que está diariamente exercendo o seu melhor junto à equipe do professor Ricardo, dando apoio técnico, e no meu caso particular, emocional também. Essa mulher, que hoje tenho o prazer de dizer que é minha amiga, me ensinou mais que o científico, sempre esteve ao meu lado na bancada, e espero que também sempre esteja presente na minha vida.

Agradeço especialmente ao Prof. Fernando A. Piotto, por sua colaboração imprescindível no meu trabalho. Por sempre me apoiar com ideias, com projetos e realizações, e principalmente por seus conselhos e grande amizade.

Também gostaria de agradecer a paciência da amiga Daiana Schmidt, que mesmo de longe, com tantos compromissos assumidos como mãe e professora, conseguiu tirar um tempo para me ajudar nas infinitas dúvidas.

Deixando também minha declaração de amizade e gratidão para Lucélia Borgo (Xuxu), Márcia Eugênia e Katherine (Kathy), cada uma de seu jeito, me deu suporte emocional e acadêmico, sendo o ombro amigo ou aquela que ajudou ali e aqui. Deixo meu forte abraço, contem comigo para sempre!

Não posso deixar de agradecer a amizade e colaboração de todos os meus colegas de laboratório, aqueles que felizmente, em sua maioria, se encontram atualmente exercendo a função merecida no mercado de trabalho, pois realmente são exemplos de profissionais. Meu muito obrigada a Berenice, Bertha, Carolina, Deyvid, Elcio, Fabiana, Fernanda, Flávia, Flávio (Cumpadi), Franz, Gabriel, Giselle (Gicka), Karina, Leila (Xiuá), Lucas, Manuella, Marina, Mayara, Paula, Priscila, Rogério e Tiago.

Ao Departamento de Genética, todos os seus professores e funcionários, agradeço pela estrutura e conhecimentos transmitidos. Principalmente aos profissionais do campo que me auxiliaram na condução dos experimentos, especialmente ao João, Zé e Mineiro. Meu muito obrigado ao Cláudio Segatelli e Aparecido, por sempre estarem presentes e tirarem minhas dúvidas.

À ESALQ/USP, por permitir que eu também faça parte da história dessa escola centenária e de tão estimada valia para nosso país.

À CNPq pela concessão de bolsa, e também a CAPES e FAPESP pelo apoio à pesquisa.

“O que sabemos é uma gota,
o que desconhecemos é um oceano”

Issac Newton

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. ZINCO E SUA RELAÇÃO ESSENCIAL NO METABOLISMO DAS PLANTAS	11
2.2. ARROZ, ZINCO E A NUTRIÇÃO HUMANA	12
2.3. A QUESTÃO NUTRICIONAL DO ARROZ.....	14
2.4. A ESTRUTURA DO GRÃO DE ARROZ	15
2.5. METABOLISMO DO ÁCIDO ASPÁRTICO	16
2.6. PROTEÍNAS DE RESERVA	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. EXPERIMENTO I: TESTANDO O ACÚMULO DE ZINCO POR ADUBAÇÃO FOLIAR	21
3.1.1. Material vegetal.....	21
3.1.2. Modelo experimental.....	23
3.1.3. Tratamentos e delineamento experimental	23
3.1.4. Determinação das características do solo e adubação	24
3.1.5. Extração das proteínas do grão.....	25
3.1.6. Determinação de proteína.....	26
3.1.7. Extração de aminoácidos livres totais	27
3.1.7.1. Quantificação de aminoácidos livres totais (ALT).....	27
3.1.7.2. Determinação da composição de aminoácidos livres por UPLC.....	27
3.1.8. Extração e purificação parcial das enzimas da via do ácido aspártico	28
3.1.8.1. AK, HSDH e DHDPS	28
3.1.8.1.1. Determinação da atividade das enzimas AK, HSDH e DHDPS.....	29
3.1.8.1.2. Síntese do aspartatosemialdeído (substrato da DHDPS)	29
3.1.8.2. LOR e SDH	30
3.1.8.2.1. Atividade da enzima LOR	30
3.1.8.2.2. Atividade da enzima SDH	30
3.1.9. Determinação de fitato nos grãos	31
3.1.10. Determinação de macro e micronutrientes	31
3.1.11. Análise estatística	32
3.2. EXPERIMENTO II: ANALISANDO A VARIABILIDADE DE UM BANCO DE GERMOPLASMA DE ARROZ PARA CARACTERES NUTRICIONAIS PROTEICOS	32
3.2.1. Material vegetal.....	32
3.2.2. Modelo e delineamento experimental	33
3.2.3. Determinação das características do solo e adubação	34
3.2.4. Análises das proteínas do grão	35
3.2.5. Análises dos aminoácidos solúveis totais.....	35
3.2.6. Determinação de fitato nos grãos	35
3.2.7. Determinação de macro e micronutrientes no grão	35
3.2.8. Análise estatística.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. EXPERIMENTO I.....	37
4.2. EXPERIMENTO II	55
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
REFERÊNCIAS.....	75
APÊNDICES	83

RESUMO

Análise das alterações no perfil amino-proteico em acessos de arroz (*Oryza sativa* L.) em função da diversidade do acúmulo de zinco em grãos

O arroz está entre os cereais mais consumidos do mundo. A desnutrição por micronutrientes como zinco (Zn) e ferro (Fe) é generalizada, especialmente em populações pobres, cujas calorias diárias são obtidas principalmente pelo consumo de cereais. Apesar de o arroz ser diferenciado por possuir maior quantidade de lisina em seus grãos em comparação ao trigo, milho ou cevada, a sua quantidade de proteínas representa somente de 8-9% do grão. Sendo o Zn é um micronutriente correlacionado com o funcionamento vital de plantas e animais, e estando relacionado direta e indiretamente com a síntese e funcionamento de várias proteínas, a proposta deste trabalho foi analisar a possível correlação da quantidade de Zn encontrado no grão com o perfil das proteínas de reserva, aminoácidos solúveis, enzimas envolvidas no metabolismo do ácido aspártico e do fator antinutricional ácido fítico, nos grãos de diferentes genótipos de arroz, avaliando primordialmente as diferenças inerentes de cada material genético a fim de agregar conhecimentos que possam ser utilizados como ferramenta para o melhoramento dessa espécie, visando ganho nutricional em seu grão. Para tanto, foram executados dois experimentos distintos. No primeiro foram avaliados três genótipos, os quais foram expostos à adubação foliar com sulfato de zinco, nas concentrações 0, 2 e 4 kg.ha⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O, buscando aumentar-se o nível de Zn nos grãos. No entanto não se verificou incremento significativo do metal na porção de interesse alimentar, sendo a variação encontrada nas concentrações de Zn em grãos integrais e polidos foram inerentes aos genótipos. Ainda assim, foram verificados os outros aspectos nutricionais, para os quais os resultados apontaram diferenças significativas entre os tipos de grãos analisados, sendo indicado o consumo de grão integral ao polido, destacando-se o genótipo Primavera, que apresentou maior concentração de proteínas e menor quantidade de fitato. Esse experimento ainda confirmou que o catabolismo da lisina é a principal via de modulação para o acréscimo desse aminoácido no grão. Para a execução do segundo experimento foram utilizados 16 genótipos cultivados no Brasil, buscando caracterizar a diversidade genética em relação às principais propriedades do grão relacionadas à qualidade nutricional humana. Os dados mostraram que apesar do Zn estar correlacionado positivamente com fitato, não há relação direta entre a concentração desse elemento com a síntese e concentração de aminoácidos e nem com a concentração total de proteínas de reserva. No entanto, com os resultados obtidos para grão integral em relação às características nutricionais, permite apresentar os genótipos Carolino e Goiano como os de melhor desempenho, além de ressaltar a importância da camada da aleurona do grão, já que está relacionada com todas as características nutricionais importantes para um projeto de biofortificação, indicando que estudos devem ser intensificados para entender o transporte de nutrientes até o interior do endosperma, ou ainda, que o consumo de arroz integral deve ser mais reforçado.

Palavras-chave: Proteínas de reserva; Aminoácidos totais livres; Metabolismo da lisina; Fitato; Grão integral e polido

ABSTRACT

Analyses of alterations in the amino-proteic profile in rice (*Oryza sativa* L.) accessions with different Zn accumulation in grains

Human malnutrition due to low intake of the micronutrients zinc (Zn) and iron (Fe) is relatively common in poor population, who uses cereals as main sources of calories. Currently, rice is one of the most consumed cereals worldwide but, despite its high lysine concentration in comparison to other cereal crops, rice grains have low protein contents (8-9%). Therefore, the current work aimed to evaluate the influence of additional Zn supply on amino acid profile, storage proteins, macro- and micronutrients, as well as on phytate concentration, and on activity of enzymes from lysine metabolism in grains of different rice genotypes, primarily evaluating the inherent differences of each genetic material in order to aggregate knowledge like a tool for the improvement of this species, aiming nutritional gain in its grain. For this purpose, two different experiments were performed. First of all, three genotypes were evaluated and exposed to foliar fertilization with zinc sulfate, in the concentrations 0, 2 and 4 kg.ha⁻¹ of ZnSO₄.7H₂O, seeking to increase the level of Zn in the grains. However, there was no significant increase of the metal in the grain, and the variation found in Zn concentrations in brown and polished grains was according to the genotypes. Nevertheless, the other nutritional aspects were verified, for which the results indicated significant differences between the types of grains analyzed, being indicated the consumption of brown grain to instead polished one, and the genotype 'Primavera' stood out with higher concentration of proteins and smaller amount of phytate. This experiment also confirmed that lysine catabolism is the main modulation pathway to increase this amino acid in the grain. For the second experiment 16 genotypes cultivated in Brazil were used to characterize the genetic diversity in relation to the major grain properties related to human nutritional quality. Zinc concentration was positively correlated to phytate, but no direct association between Zn and synthesis and concentration of amino acids or storage proteins was detected. Based on results, 'Carolino' and 'Goiano' rice cultivars presented the best performance. Moreover, due to the relevance of aleurone layer in retaining important nutritional features in rice grains, biofortification programs should investigate nutrient transportation from this region to endosperm in order to achieve better results.

Keywords: Storage proteins; Free amino acids; Lysine metabolism; Phytate; Hulled and polished grain

1. INTRODUÇÃO

A carência de micronutrientes, como ferro (Fe) e zinco (Zn), na base da alimentação humana é considerada caso de saúde pública. A chamada *fome oculta* está presente em aproximadamente um terço da população mundial (Bashir *et al.*, 2013; Phattarakul *et al.*, 2012).

Parte representativa do índice de mortalidade infantil, em países em desenvolvimento, está relacionada com a deficiência de Zn na alimentação de gestantes e crianças na primeira infância. A referida ausência de Zn na dieta de crianças pode acarretar sérios problemas em seu desenvolvimento, como: ineficiência do sistema imunológico, retardo mental e susceptibilidade a doenças infecciosas (Dipti *et al.*, 2012; Henriques *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2012).

O problema da carência nutricional de Zn em países, como China, Índia, Paquistão e Turquia, está correlacionado com a condição financeira da população, baixa disponibilidade de Zn no solo e também com o tipo de alimentação base (Henriques *et al.*, 2012). Na maioria desses países, a principal fonte proteica é conferida pela ingestão de cereais, como trigo e arroz, que representam 70% das calorias obtidas diariamente, sendo que esse tipo de alimento é pobre na oferta de Zn em seus grãos (Rehman *et al.*, 2012).

Para que essa problemática fosse solucionada, se iniciaram pesquisas com adubação e correção de solos. Dentro desse quesito, vários estudos mostraram que com o acréscimo de fontes de Zn para planta, aumenta seu acúmulo no grão, sendo essa estratégia denominada *biofortificação*.

No decorrer do tempo, as pesquisas de biofortificação buscaram variedades naturalmente acumuladoras de metais no grão e pelo entendimento de como esses micronutrientes são transportados na planta, como ocorre seu acúmulo no grão e qual fonte e maneira é mais eficiente para adubação. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos da bioacumulação do Zn sobre o metabolismo dos aminoácidos e proteínas de reserva, que também são essenciais na alimentação humana.

Entre os aminoácidos que constituem as proteínas, nove são denominados essenciais, pois não podem ser sintetizados por animais monogástricos, tais como, lisina, treonina e triptofano, que são pouco obtidos por ingestão de cereais (Schmidt *et al.*, 2016). Assim, estudos investigam a rota metabólica do aspartato, responsável pela síntese lisina, metionina, treonina e isoleucina, a fim de compreender o mecanismo regulatório e usar essas

informações a favor do melhoramento genético, buscando aprimorar o valor nutricional dos grãos (Azevedo *et al.*, 2006).

Dessa forma, pensando no papel fisiológico que o Zn desempenha na síntese de proteínas e na sua vitalidade para o funcionamento de mais de 3000 enzimas (Maret, 2012; Palmgren *et al.*, 2008), a proposta deste trabalho foi analisar as influências/alterações que o Zn provoca sobre as proteínas de reserva e aminoácidos solúveis de grãos de arroz, a fim de agregar conhecimentos que possam ser utilizados como ferramenta para o melhoramento genético, visando ganho nutricional no grão de arroz.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Zinco e sua relação essencial no metabolismo das plantas

O micronutriente Zn possui grande importância nutricional, tanto para o bom desenvolvimento e regulação do metabolismo de plantas, quanto dos animais, que o obtém por meio da ingestão de vegetais (Ishimaru *et al.*, 2011).

A essencialidade que o Zn exerce nos organismos vivos advém de seus atributos químicos. Ele é classificado como ácido forte de Lewis, possui reflexibilidade geométrica e é um ligante de troca rápida. Dessa forma, é utilizado na catalise de reações hidrolíticas e de oxidoredução, tendo como vantagem a ausência de atividade redox, o que o permite participar de interações entre proteínas e também de sua estrutura (Krämer; Clemens, 2005).

Os papéis fisiológicos desempenhados por esse elemento nas plantas são amplos. Pode-se citar a participação na regulação do crescimento através da modulação de hormônios como auxina, da transformação e consumo de carboidratos, da integridade funcional e estrutural da membrana celular, além de estar relacionado com aproximadamente 2800 proteínas ao desempenhar papel estrutural ou como cofator enzimático (Boonchuay *et al.*, 2013; Cakmak, 2000; Hänsch; Mendel, 2009; Mousavi *et al.*, 2013).

Estudos demonstram que a indisponibilidade de Zn acarreta várias alterações prejudiciais às plantas, ocasionando redução de produtividade e da qualidade dos produtos (Cakmak, 2000). A sua ausência confere a diminuição da taxa fotossintética e, conseqüentemente, leva à decadência na produção de biomassa (Mousavi *et al.*, 2013). Em nível molecular, foi observada a desintegração dos ribossomos 80s (Hänsch; Mendel, 2009), degradação de RNA (Suzuki *et al.*, 2012) e aumento na concentração de alguns aminoácidos, sendo efeitos negativos diretamente relacionados ao decréscimo na síntese de proteínas (Mousavi *et al.*, 2013).

O Zn também possui correlação importante na manutenção da integridade física da célula, ao se ligar com grupo sulfidrila dos fosfolipídios da membrana (Mousavi *et al.*, 2013), ou ainda formar ligações tetragonais com resíduos de cisteína, histidina, aspartato ou glutamato, de modo que lipídeos e proteínas ficam protegidos contra os danos ocasionados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) (Cakmak, 2000).

O desequilíbrio no metabolismo redox pode ser gerado na ausência de Zn, existindo aumento na utilização do ferro como catalisador de reações (Cakmak, 2000), tais como a Fenton ou de Haber-Weiss (Kehrer, 2000). Estudos demonstram que o Zn ocupa o sítio de

ligação do Fe nos resíduos de histidina e cisteína, quando o organismo está em homeostase para esses micronutrientes (Cakmak, 2000).

O papel de proteção do Zn contra as ERO vai adiante. Plantas deficientes em Zn são mais afetadas por estresse oxidativo, pois a atividade das enzimas de membrana tipo NADPH oxidase são responsivas a presença desse íon, controlando a geração do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). O Zn além de atuar na repressão de síntese de ERO, também atua na desintoxicação dessas, através da indução de genes que codificam enzimas do sistema antioxidante, como ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR) (Cakmak, 2000).

Atuando na primeira linha de defesa da célula contra radicais livres, temos a enzima superóxido dismutase (SOD), que possui como um dos seus cofatores metálicos o Zn. A SOD atua na remoção do $O_2^{\cdot-}$ através da sua dismutação em H_2O_2 e O_2 , interferindo diretamente nas concentrações das ERO presentes no meio celular e evitando a formação do radical $\cdot OH$, pois sem os substratos $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , a reação de Haber-Weiss não ocorre (McCorde, 1969; Alsche *et al.*, 2002; León *et al.*, 2002).

O Zn também atua na modulação de expressão de genes, interferindo diretamente na síntese de proteínas. A atividade enzimática de RNA e DNA polimerases necessitam da presença de Zn, assim como os próprios DNA e RNA mantêm sua estrutura e estabilidade pela atuação das *proteínas dedo de Zn* (Henriques *et al.*, 2012). Sendo estimada a participação essencial do metal em 10% das proteínas envolvidas nos sistemas biológicos, desde que seu correto funcionamento exige a manutenção estrutural dessas moléculas, que lhe é conferida pela presença do íon (Boonchuay *et al.*, 2013).

Desta maneira, nota-se que, apesar de ser requerido em pequenas quantidades (30-100 μg por grama de peso seco) para promover o bom desenvolvimento de plantas, a ausência do Zn é muito significativa, sendo enaltecida a sua importância no equilíbrio de proteínas. Estas, por sua vez, juntamente com outros micronutrientes, desempenham grande papel nutricional, o que leva esse projeto a representar avanço dentro dos estudos com biofortificação.

2.2. Arroz, Zinco e a nutrição humana

Assim como nas plantas, o Zn desempenha funcionalidade essencial no metabolismo animal (Cakmak, 2008). Então, a ingestão de alimentos ricos em Zn, é de suma importância para suprir as necessidades nutricionais diárias humana. A baixa biodisponibilidade do Zn na cadeia alimentar leva 1/3 da população mundial a sofrer com essa deficiência, se agravando principalmente em países subdesenvolvidos (Cakmak, 2008; Boonchuay *et al.*, 2013).

Pesquisas apontam que o Zn está relacionado ao desenvolvimento infantil, e que sua ausência acarretam graves problemas de saúde, como a própria desnutrição, diarreia, retardo do desenvolvimento mental, impactos no sistema imunológico, e infelizmente, sendo responsável por aproximadamente quinhentos mil mortes de crianças a cada ano (Cakmak; Kutman, 2017; Harvest Zinc Fertilizer Project, 2018).

Nesse sentido, percebe-se que a real causa da desnutrição de Zn humana tem início na baixa disponibilidade do elemento nos solos agricultáveis (Figura 1), que apresentam alcalinidade elevada em 30% de sua totalidade, o que influencia negativamente na absorção de Zn pelas plantas (Cakmak; Kutman, 2017). Esse problema se agrava, pois esses solos se encontram em regiões desfavorecidas, como países da África e Ásia, onde se soma a restrição na variedade de fontes alimentares, que é basicamente composta por grãos, como o arroz, que possui baixo teor proteico e mineral (Johnson-Beebout *et al.*, 2016).

Figura 1. Áreas mundiais afetadas por deficiência de zinco (Zn) no solo. (Alloway 2004 em Cakmak, 2008)

Em curto prazo, a fertilização se mostrou uma estratégia eficaz, por ter rápido retorno quando comparado ao melhoramento. Então projetos de pesquisas, foram financiados por países como Estados Unidos da América, Canadá e Inglaterra, a fim de observar cultivares responsivas à fertilização com Zn. O programa Harvest Zinc, é coordenado pelo professor Ismail Cakmak, da Universidade da Turquia, e pesquisou o incremento de Zn nos grãos de

variedades de arroz, milho e trigo em diferentes países, utilizando estratégias de fertilização (Harvest Zinc Fertilizer Project, 2018).

Os resultados dessas pesquisas demonstraram que a fertilização foliar aumenta significativamente a proporção de Zn armazenado no grão. Porém, percebe-se que a resposta positiva está acoplada à capacidade de absorção, transporte e armazenamento oriundo de cada cultivar utilizado, tornando os resultados de biofortificação inconsistentes. Assim sendo, a genética se torna aliada a biofortificação, quando as pesquisas se voltam a reconhecer quais as variedades que carregam a capacidade inerente de serem responsivas às doses de Zn adicionais (Swamy *et al.*, 2016).

De acordo com Cakmak (2008), da área disponível para cultivo, 30% possui baixa disponibilidade de Zn, sendo metade dessa área destinada à plantação de cereais, que por sua vez servem de base alimentar de grande parcela da população mundial, principalmente da fatia menos abastada financeiramente e residentes de áreas rurais.

Todos os cereais são considerados como fonte ineficiente de Zn, e contribuem fortemente para os casos de deficiência de Zn, especialmente o arroz, por possuir alto consumo exclusivo (Boonchuay *et al.*, 2013). No entanto o que é problema pode se tornar solução, levando em consideração que proporções variadas no conteúdo de Zn foram encontradas para arroz integral, devido exclusivamente às diferenças genéticas contidas nos genótipos do banco de germoplasma do Instituto Internacional de Pesquisa do Arroz (International Rice Research Institute - IRRI) (Boonchuay *et al.*, 2013).

Eliminar a deficiência nutricional de Zn em países com elevado índice de população demográfica, como Índia e China, pode custar anualmente a quantia de 25 milhões de dólares. Sendo assim, a estratégia de elevar a concentração do metal apenas por fertilização, se torna demasiadamente cara. Por isso, o foco é criar alternativas de baixo custo e fácil aplicabilidade para suprir as necessidades da saúde humana (Cakmak, 2008).

Para tanto, lançou-se mão dos conhecimentos de engenharia genética, genética clássica e fertilização de solos, em busca de selecionar cultivares que sejam aptas a suprir as necessidades acima citadas. A busca através do conhecimento do acúmulo natural de Zn, na população já existente se mostrou eficaz tanto para arroz, como para outros cereais, como trigo e milho (White; Broadley, 2005).

2.3. A questão nutricional do arroz

O aprimoramento das culturas para atender a necessidade do crescimento populacional foi o carro chefe das pesquisas por muito tempo, porém, as manipulações genéticas e o

decorrente processo de domesticação, realizado para galgar o aumento da produtividade, ocasionaram uma perda da qualidade nutricional dos alimentos.

O arroz é tido como alimento básico em mais de 100 países (Rehman *et al.*, 2012), sendo que grande porcentagem desta população sofre com doenças relacionadas à desnutrição (Henriques *et al.*, 2012). Estes são países localizados na África, Oriente Médio, Ásia e América Latina (Dipti *et al.*, 2012), e têm como característica comum serem classificados economicamente como em desenvolvimento e possuem solos com baixa disponibilidade de Zn (Henriques *et al.*, 2012).

Além dessas questões, o arroz é uma cultura que apresenta baixo teor de Zn em seus grãos, e dessa pequena porção, pouco estará disponível para o processo de digestão e absorção dos nutrientes. Então, a estratégia de biofortificação se torna altamente interessante, procurando sanar os males dessa desnutrição, que atinge principalmente às mulheres grávidas e crianças com menos de cinco anos (Wei *et al.*, 2012).

Ao fornecer 21% de energia e 15% das exigências proteicas para população mundial, o arroz (Rehman *et al.*, 2012), como todo cereal, apresenta baixa qualidade nutricional. Essa característica está associada com a concentração reduzida de lisina e outros aminoácidos essenciais encontrados na semente, principalmente no endosperma (Medici *et al.*, 2015).

O valor nutritivo de uma proteína está relacionado à proporção de aminoácidos que a compõe (Molina *et al.*, 2001). O desequilíbrio de aminoácidos em proteínas de reserva de grãos, combinada com dieta restritiva, leva a desnutrição que acomete 30% da população de países em desenvolvimento (Medici *et al.*, 2015).

2.4. A estrutura do grão de arroz

O fruto do arroz é monospermo, seco e indeiscente, também vulgarmente chamado de grão. Morfologicamente caracteriza-se por ser uma cariopse, a qual é formada da junção de uma única semente com o seu fino pericarpo, este último estando envolto por tecido de proteção, denominado popularmente de casca ou palha (constituídos pela lema e pálea) (Abreu; Oliveira, 2015; Juliano, 2016).

Subsequentemente ao pericarpo, encontram-se o tegumento e a aleurona. A aleurona, por sua vez, corresponde a parte que retém o maior valor nutricional da semente, sendo rico em corpos lipídicos e proteicos. Esse fato ocorre devido à função de nutrição do embrião desempenhado pela aleurona (Abreu; Oliveira, 2015; Juliano, 2016).

Já abaixo dessa camada nutritiva é contido o endosperma, responsável pelo armazenamento de energia em forma de amido. Por último, protegido, encontra-se o embrião

(Abreu; Oliveira, 2015; Juliano, 2016). O arroz é comumente consumido em forma de grãos inteiros, principalmente em sua versão polida (o conhecido arroz branco). O seu processamento para o consumo humano, consiste da retirada da casca e polimento do grão, em que ocorre uma espécie de lixamento da parte mais externa, resultando na eliminação de 1% do embrião, 2-3% de grãos quebrados e 5-9% de farelo do grão, ao final sendo obtido 61-72% de grãos brancos inteiros (Prakash; Ramaswamy, 1996).

Nesse procedimento de transformação de grão integral ao grão polido, ocorre a produção do farelo de arroz, e esta porção do processamento ganhou notoriedade na pesquisa sobre nutrição humana, já que retém considerável porção proteica (Juliano, 1985). No processo abrasivo de polimento, separa-se do grão integral o pericarpo e o tegumento, além de ocorrer a extração da maior parte da camada de aleurona (Prakash; Ramaswamy, 1996), esta última rica em proteínas (Juliano, 1985; Bhullar; Gruissem, 2013).

2.5. Metabolismo do ácido aspártico

A via metabólica do ácido aspártico (Figura 1), que em plantas tem o aspartato como precursor comum, sintetiza quatro dos nove aminoácidos essenciais, lisina, treonina, metionina e isoleucina (Azevedo *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2015). A regulação desta via se faz em determinados pontos chaves, através da regulação das enzimas que catalisam estes pontos. Várias destas enzimas são reguladas por retro-inibição/ativação pelos aminoácidos, produtos finais ou seus análogos (Azevedo *et al.*, 2003) e por interações gênicas (Brennecke *et al.*, 1996).

A primeira enzima da via é a aspartato quinase (AK; EC 2.7.2.4), a qual converte o ácido aspártico em β -aspartil fosfato. A AK tem sido bem caracterizada em várias espécies de plantas e tem mostrado a existência de três formas isoméricas da enzima. Duas destas isoformas podem ser inibidas somente pela lisina ou sinergicamente com S-adenosilmetionina, e a terceira pela treonina (Azevedo *et al.*, 1992; Azevedo; Lea, 2001; Schmidt *et al.*, 2015). Esta última trata-se de um polipeptídeo bifuncional com a isoenzima homoserina desidrogenase (HSDH; EC 1.1.1.3) sensível à treonina. A HSDH se apresenta em duas isoformas, sendo uma resistente e a outra sensível à inibição pela treonina (Azevedo *et al.*, 1997). O terceiro ponto de controle da via do aspartato envolve a enzima atuante na síntese da lisina, a dihidrodipicolinato sintase (DHDPS; EC 4.2.1.52), a qual sofre *feedback* negativo através de baixas concentrações de lisina. A atividade desta enzima (DHDPS) tem se mostrado ser a peça chave reguladora da via de biossíntese da lisina (Azevedo *et al.*, 1997).

Figura 2. Via do ácido aspártico em plantas superiores (a); Via da degradação da lisina (b) (Schmidt *et al.*, 2015)

Duas principais enzimas fazem parte da via catabólica da lisina em animais, micro-organismos e em plantas. A primeira delas é a lisina 2-oxoglutarato redutase (LOR; EC 1.5.1.8; também conhecida como lisina α -cetoglutaratoredutase - LKR) que é a primeira enzima da via, a qual condensa a lisina e o 2-oxoglutarato para formar a sacaropina, que é então hidrolisada formando ácido α -aminoadípico e ácido glutâmico na reação catalisada pela enzima sacaropina desidrogenase (SDH; EC 1.5.1.9) (Azevedo; Lea, 2001; Schmidt *et al.*, 2015). A quantidade de lisina transportada para o endosperma em desenvolvimento em função da síntese de proteínas de reserva é até três vezes maiores do que o necessário (Arruda; Da Silva, 1983). Entretanto, o teor deste aminoácido nos grãos é pequeno, que demonstra o acúmulo desse aminoácido é regulado por seu catabolismo (Arruda *et al.*, 2000), tornando-o alvo primordial para estudos de melhoramento nutricional.

2.6. Proteínas de reserva

Os cereais em geral constituem importante parcela de energia na dieta de seres humanos e na alimentação animal em praticamente todos os países do mundo (Bean; Lookhart, 2000). Além de importante fonte de energia, os cereais também são fontes primárias de proteínas e contém propriedades funcionais importantes para muitos alimentos, como por exemplo, as proteínas de glúten no trigo, que por apresentar propriedades

viscoelásticas, permitem a confecção de pães e muitos outros produtos alimentícios (MacRitchie, 1992).

Por este e outros fatores, as proteínas de cereais tem sido extensivamente estudadas há muitos anos e foram classificadas em relação à quantidade, composição e estrutura pelos trabalhos pioneiros de Beccari de Bologna, em 1728, (Bailey, 1941) e Osborne, em 1909. Desde então, estas proteínas tem sido divididas virtualmente para todos os cereais em quatro classes de acordo com a sua solubilidade em água, sal, álcool e ácido. De acordo com este fracionamento proposto por Osborne (1909), estas classes correspondem respectivamente às albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas; sendo possível realizar a extração destas proteínas de maneira sequencial. Entretanto, classificações alternativas foram descritas para muitos cereais, como por exemplo, para as proteínas de reserva de trigo, milho e sorgo (Shewry *et al.*, 1986; Esen, 1987).

São conhecidas como proteínas de reserva, aquelas presentes no grão, e que são acumuladas principalmente durante o desenvolvimento da semente e que posteriormente serão utilizadas durante a germinação. Constituem ao redor de 10% do peso seco da semente, variando de acordo com a espécie e genótipo, sendo predominantemente encontradas nas camadas de aleurona e subaleurona do endosperma (Lee *et al.*, 2015). Estas proteínas de reserva se transformam posteriormente nas reservas de aminoácidos e nitrogênio orgânico para a plântula em desenvolvimento (Shewry; Halford, 2002; Lee *et al.*, 2015). Por este motivo, as vias de biossíntese e processos de acúmulo se dão exclusivamente na semente e não em outros órgãos/tecidos. Além disso, não possuem outra atividade funcional fora da semente, onde são depositadas principalmente em organelas especiais chamadas de corpos proteicos (Shewry; Halford, 2002).

As proteínas de reserva do arroz são produzidas nos ribossomos aderidos ao retículo endoplásmico (RER), e direcionadas aos compartimentos celulares pela via de transporte de membranas. Essas proteínas podem ser estocadas em forma de corpos proteicos (*protein body*- PB), que em sua configuração esférica contém prolaminas e são denominados de PB I. Os PB II ricos em glutelinas revestidas por camada externa de globulina, não possuem forma regular e se originam do vacúolo (Krishnan; White, 1995; Kim *et al.*, 2013).

Em arroz, as proteínas de reserva em grãos polidos são constituídas majoritariamente por glutelinas. Entretanto, isto pode variar de acordo com a base genética de diferentes cultivares assim como com as condições ambientais (Silveira *et al.*, 2010). Neste cereal, as glutelinas são agrupadas em tipo A, B, C e D de acordo com análises de homologia de sequências. A maioria dos genes que codificam para glutelinas é expressa no endosperma dos

grãos de arroz (Lee *et al.*, 2015). Segundo Doroshenk *et al.* (2014), o perfil proteico de glutelinas demonstrado ao longo do tempo, indica que a abundância desta proteína de reserva aumenta constantemente no desenvolvimento da sementes de arroz de 7 a 23 dias após a floração (DAF).

As prolaminas podem ser agrupadas em relação às suas mobilidades eletroforéticas em géis de poliacrilamida SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) nos domínios: 10, 13 e 16 KDa (Ogawa *et al.*, 1987). As prolaminas pertencentes ao domínio 13 KDa, ainda são subdivididas em: 13 kDa-I, 13 kDa-IIa, 13 kDa-IIb, and 13 kDa-III. Os genes que codificam para prolaminas são expressos de forma cronológica durante o desenvolvimento da semente, com os níveis máximos de expressão de 8 a 20 DAF com contínuo acúmulo de prolaminas até 21 DAF (Nagamine *et al.*, 2011).

A principal globulina em arroz (α -globulin) contém 186 aminoácidos, formando uma proteína de 21 KDa. A expressão temporal do mRNA de globulinas aumenta a partir de 5 DAH (*days after heading* – dias após a panícula estar completamente visível) e atinge seu nível mais alto em 30 DAH (Yoon *et al.*, 2012). Qu *et al.* (2004) demonstraram que o promotor do gene que codifica para esta proteína é ativo em quase todo o endosperma de arroz, indicando a expressão generalizada de globulina no endosperma de arroz durante o desenvolvimento da semente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Experimento I: Testando o acúmulo de zinco por adubação foliar

3.1.1. Material vegetal

Para o primeiro experimento foram utilizados três cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.), Cateto Seda, BRS Primavera e BRS Sertaneja.

Para o estudo das enzimas envolvidas no metabolismo da lisina foram utilizadas sementes imaturas, estágio de grão leitoso (Figura 3 a), e para a análise das proteínas de reserva foram utilizadas sementes maduras (Figura 3 b) e secas, em sua forma integral e polida (Figura 4). As sementes maduras e secas também foram utilizadas para as análises de ácido fítico e quantificação de micronutrientes no grão.

Um montante de folhas bandeiras (Figura 3 b) foi separado em seguida a colheita de panículas de arroz com grãos maduros, que serviram para aferir o teor de Zn no material. Estas foram secas em estufa de circulação forçada, a 60 °C, até atingirem massa constante, sendo após moídas a textura de fino pó.

Figura 3. Material vegetal obtido de *Oryza sativa* L., utilizado para as análises. (A) Sementes imaturas em estágio de grão leitoso, observar o ponto na seta vermelha. (B) Ponto de coleta das sementes maduras, que após foram secas em temperatura ambiente para as análises, observar na seta azul; e exemplo de folha bandeira coletada, observar na seta vermelha.

Grão de arroz	com casca	integral	polido
Cateto Seda
Primavera
Sertaneja

Figura 4. Representação do tipo de grão utilizado para análises, oriundos de três cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.)

3.1.2. Modelo experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Departamento de Genética da ESALQ/USP-Piracicaba/SP (Figura 5). As plantas foram obtidas via sementes; cinco sementes foram semeadas diretamente em solo contido em vasos de 10 L, sendo realizado desbaste após a germinação, mantendo-se apenas três plântulas por vaso.

Figura 5. Sistema de cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) em vasos, com irrigação por aspersão. Experimento em casa de vegetação, no Departamento de Genética, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, campus Piracicaba/SP da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP)

3.1.3. Tratamentos e delineamento experimental

Os tratamentos consistiram de aplicações diferenciais de Zn, na forma de sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), via adubação foliar: (i) aplicação de água, sem presença de Zn (controle); (ii) aplicação de concentração regular de Zn – equivalente a $2 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Zn-1) e (iii) aplicação do dobro da concentração regular de Zn – equivalente a $4 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Zn-2).

A adubação foliar foi realizada na fase de pré-enchimento dos grãos. A solução foi nebulizada sobre as folhas (Phattarakul *et al.*, 2012) nas primeiras horas do dia, focando o estágio de abertura dos estômatos (Figura 6).

Figura 6. Aplicação de adubação foliar de zinco (Zn) via aspersão em arroz (*Oryza sativa* L.) realizada através de utilização de soluções de sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 3 x 3 (tratamentos x cultivares), com quatro repetições, totalizando 36 parcelas. Cada parcela foi composta por cinco vasos contendo três plantas.

3.1.4. Determinação das características do solo e adubação

Antes da instalação do experimento, averiguaram-se as propriedades químicas e físicas do solo que foi utilizado para enchimento dos vasos, a fim de efetuar a correção e adubação do mesmo. Para isso foram coletadas amostras de solo na profundidade de 0-20 cm, da área experimental “Sertãozinho” pertencente ao departamento de Genética e Melhoramento da ESALQ/USP, na cidade de Piracicaba/SP.

A amostra de solo foi mandada para análise em laboratório especializado, e de posse dos dados (Tabelas 1 e 2) os vasos foram preenchidos com o solo devidamente adubado segundo as necessidades da cultura, aplicando-se 2,5 g por vaso da formulação NPK 4-14-8 para adubação de plantio, correspondente a 500 kg.ha⁻¹ da formulação.

Após germinação das sementes, foram realizadas duas adubações de cobertura com aplicação de 1 g por vaso da formulação NPK 20-0-20, uma após 30 dias da germinação e outra posteriormente a 60 dias da germinação, os quais correspondem aos estádios de desenvolvimento críticos: o perfilhamento ativo e a diferenciação do primórdio floral, respectivamente. Essas adubações visaram principalmente o fornecimento de nitrogênio na dosagem equivalente a 30 kg.ha⁻¹, o que corresponde o fornecimento final ao equivalente a 90 kg.ha⁻¹, que foram distribuídas nas três aplicações, de acordo com Fageria et al. (2018).

Tabela 1. Caracterização química do solo utilizado no preenchimento dos vasos utilizados na condução experimental, dentro de casa de vegetação, no plantio de arroz (*Oryza sativa* L.)

pH	M.O	P	K	Ca	Mg	H+Al	Al	Soma	CTC	Sat.	Sat.	S
CaCl ₂		resina						bases S.B.		bases	Al	SO ₄
	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	-----				mmolc dm ⁻³	-----		V%	m%	mg dm ⁻³
4,8	21	24	2,1	16	6	34	0	24	58	41	0	3
Cu			Fe		Zn			Mn		B		
			----- DTPA* -----						(água quente)			
			----- mg dm ⁻³ -----									
0.8			38		2.0			17.6		0.17		

* Ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA-TEA; pH 7,3)

Tabela 2. Caracterização física do solo utilizado no preenchimento dos vasos utilizados na condução experimental, dentro de casa de vegetação, no plantio de arroz (*Oryza sativa* L.)

Argila	Silte	Areia Total	Areia Grossa	Areia Fina
<0,002mm	0,053-0,002mm		2,00-0,210mm	0,210-0,053mm
----- g kg ⁻³ -----				
198	12	790	390	400

3.1.5. Extração das proteínas do grão

Pesou-se 0,25 g de farinha integral de arroz maduro, e a essa foi adicionado 1 mL de hexano. A solução foi homogeneizada com a ajuda de vortex e mantida por 15 min em temperatura ambiente. Após, procedeu-se a centrifugação em 10.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado, e a farinha foi deixada secar *overnight* em capela. Esse processo é necessário para remoção de lipídeos da farinha, os quais interferem na extração proteica.

As proteínas de reserva apresentam quatro frações proteicas, classificadas pela primeira vez por Osborne em 1909 de acordo com sua solubilidade, sendo elas: albuminas solúveis em água, as globulinas solúveis em solução salina, as prolaminas solúveis em álcool e as glutelinas solúveis em solução alcalina. O protocolo utilizado para o material em questão, foi definido com base nas pesquisas apresentadas por Landers e Hamaker (1994), Landry *et al.* (2000) e Santos *et al.* (2013), e está apresentado em sua integralidade nos parágrafos a seguir.

A obtenção das frações é iniciada pela extração da albumina. Assim, à farinha (sem lipídeos) foi acrescido 1 mL de água ultrapura (Milli-Q). A solução foi mantida por 30 min no gelo e em constante agitação, sendo fortemente agitada com o auxílio de vortex a cada 15 min. Esse processo deve ser repetido, e os sobrenadantes guardados juntos após centrifugação a 10.000 rpm por 10 min.

Para a extração das globulinas, à farinha resultante da etapa anterior foi adicionado 1 mL de solução 0,5 M de NaCl, mantido nas condições descritas acima, também repetindo o processo por mais uma vez. Os sobrenadantes obtidos após centrifugação devem ser misturados e armazenados em ultra freezer.

As prolaminas foram extraídas ressuspensando o *pellet* anterior em 1 mL de solução 60% (v/v) 2-propanol e 0,6% (v/v) 2-mercaptoetanol (2ME) por 30 minutos à temperatura ambiente, este processo deve ser repetido por mais duas vezes, mantendo a agitação constante e a forte agitação a cada 15 min. Os sobrenadantes obtidos após a centrifugação foram misturados e armazenados à -70 °C.

A última fração proteica, glutelina, foi obtida pela extração do *pellet* anterior com 1 mL de solução contendo 0,5% de SDS e 0,6% 2ME em tampão 0,025 M borato de sódio, ao repetir a manipulação descrita no último parágrafo por três vezes.

Ao final da extração sequencial obtiveram-se quatro tubos; estes contendo os sobrenadantes combinados de cada fração de proteína, as quais foram adicionados o dobro de volume de acetona gelada, homogeneizando por inversão do tubo e mantido por 24 h em freezer -20 °C. Para recuperação das proteínas precipitadas, centrifugou-se os tubos por 20 min a 8.000 rpm a 4 °C, retirando a acetona e solubilizando o *pellet* formado com 300 µL de ureia 2M.

3.1.6. Determinação de proteína

A concentração de proteína em todas as amostras foi quantificada utilizando-se o Kit da Bio-Rad, segundo o método de Bradford (Bradford, 1976) e soro albumina bovina (BSA)

como padrão. Os valores foram determinados em relação à curva padrão de concentrações conhecidas através de regressão linear.

3.1.7. Extração de aminoácidos livres totais

Para extração dos aminoácidos livres totais pesou-se 0,25 g de farinha integral, obtida dos grãos maduros de arroz, em 1,5 mL de MCW (metanol:clorofórmio:água, na proporção 12:5:3), e o homogeneizado permaneceu a 4 °C, *overnight*. Centrifugou-se a 10.000 rpm por 20 min e retirou-se o sobrenadante ao qual foi adicionado 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água para cada 4 mL de MCW. Centrifugou-se novamente retirando-se cuidadosamente a fase aquosa formada, a qual permaneceu por uma hora a 38 °C, sendo após totalmente concentrada por evaporação a vácuo.

O *pellet* enfim foi ressuspenso em 200 µL de água ultra pura e a amostra foi utilizadas nas duas análises descritas a seguir.

3.1.7.1. Quantificação de aminoácidos livres totais (ALT)

A concentração de aminoácidos livres totais foi determinada segundo o método descrito por Yemm *et al.* (1955). A reação para a quantificação foi realizada em tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 25 µL da amostra, 975 µL água ultra pura (Milli-Q), 0,5 mL de 0,2 M citrato de sódio (pH 5,0), 0,2 mL de reativo de ninidrina 5% em metilglicol e 1 mL de 0,2 mM KCN. Os tubos de ensaio foram tampados com bolas de vidro, para evitar perdas por evaporação e deixados em banho-maria a 100 °C por 20 min. A seguir, deixou-se atingir a temperatura ambiente completando o volume para 4 mL com etanol 60%.

As concentrações de aminoácidos solúveis totais foram determinadas utilizando-se uma curva padrão de concentrações conhecidas de leucina (40, 80, 120, 160 e 200 nmol/mL). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm.

3.1.7.2. Determinação da composição de aminoácidos livres por UPLC

A análise de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) foi realizada com o sistema Acquity (Waters), coluna BEH c18 (100 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 µm), fluxo de 0,7 mL min⁻¹ e temperatura de coluna de 46 °C.

Foi utilizado para derivatização 70 µL de tampão borato, 10 µL da amostra contendo os aminoácidos (ou 10 µL do padrão de aminoácidos em várias concentrações conhecidas) e 20 µL do derivatizante (AccQ – flúor).

Após, a mistura foi colocada em banho seco a 55 °C por 10 min e inserida em *vials* para injeção da amostra. O volume da injeção foi de 1 µL e a detecção foi realizada por comprimento de onda de 260 nm.

As concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas em relação à curva padrão de concentração conhecidas dos aminoácidos através do programa Empower3 da Waters.

3.1.8. Extração e purificação parcial das enzimas da via do ácido aspártico

Os grãos imaturos coletados e armazenados em -70 °C foram macerados à textura de pó fino, com auxílio de nitrogênio líquido e moinho. E para que se mantivesse a atividade enzimática, todos os processos de extração, quantificação proteica e ensaios foram realizados em baixas temperaturas.

3.1.8.1. AK, HSDH e DHDPS

As enzimas AK e HSDH foram extraídas conforme Azevedo et al. (2003) em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) contendo 200 mM de cloreto de potássio (KCl), 0,1 mM de PMSF, 0,1 mM de EDTA, 1 mM DTT, 2 mM de L-lisina, 2 mM de L-treonina, 10% (v/v) glicerol e 5% (m/v) polivinilpolipirrolidona (PVPP). Após homogeneização com cadinho e pistilo, o extrato foi filtrado e centrifugado a 10.000 rpm por 30 min. Ao extrato foi adicionado sulfato de amônio para saturação a 30% e, a seguir, o extrato foi colocado sob agitação por 30 min. Após agitação a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 min e o sobrenadante submetido a uma segunda saturação com sulfato de amônio a 60%. A amostra foi precipitada por centrifugação a 10.000 rpm por 30 min e o *pellet* dissolvido em 25 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,4) contendo 1 mM de DTT, 0,1 mM de L-lisina, 0,1 mM de L-treonina e 10% (v/v) de glicerol. A amostra foi desalinizada em coluna Sephadex G-25 equilibrada com o mesmo tampão e coletada para análise da atividade da AK e HSDH.

A enzima DHDPS foi extraída em tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de PMSF, 2 mM de EDTA, 1,4% (p/v) de ácido ascórbico e 5% (m/v) de PVPP. Após maceração, o extrato foi filtrado e centrifugado a 10.000 rpm por 30 min. Ao extrato foi adicionado sulfato de amônio para saturação a 30% e o extrato foi colocado sob agitação por 30 min. Após agitação, a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 min e o sobrenadante submetido a uma segunda saturação com sulfato de amônio a 60%. A amostra foi precipitada por centrifugação a 10.000 rpm e o *pellet* dissolvido em tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,5) contendo 2 mM de EDTA e 1,4% (p/v) de ácido ascórbico. A amostra foi desalinizada em

coluna Sephadex G-25 equilibrada com o mesmo tampão e coletada para análise da atividade da DHDPS.

3.1.8.1.1. Determinação da atividade das enzimas AK, HSDH e DHDPS

O ensaio da atividade da AK foi realizado como descrito por Azevedo *et al.* (2003), em tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,4) contendo 1mM de DTT, 20% (v/v) de glicerol; 500 mM de ácido aspártico; 125 mM de sulfato de magnésio; 200 mM de adenosina trifosfato (ATP); 4 M de hidroxilamina e amostra. O ensaio foi iniciado pela adição de ATP e incubado a 35°C por 30 min. Após incubação, o ensaio foi interrompido pela adição de solução de cloreto férrico (670 mM FeCl₃ e 20% de ácido tricloroacético). Após centrifugação a 10000 rpm por 10 min, a absorbância foi determinada a 505 nm. Controles contendo 1,0 e 5,0 mM de L-lisina, L-treonina e L-lisina + L-treonina foram incluídos em diferentes ensaios para determinar a atividade da AK e para identificar as isoenzimas sensível a inibição por lisina e treonina. A atividade da AK foi expressa em nmol.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína.

A atividade da enzima HSDH foi determinada em espectrofotômetro a 340 nm como descrito previamente por Azevedo *et al.* (2003), em tampão Tris-HCl 100 mM (pH 9,0) contendo 150 mM de KCl, 1 mM de DTT, 0,5 mM de EDTA; 200 mM de DL-homoserina; 4,8 mM de NADPH e extrato. A atividade da HSDH foi expressa em nmol.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína.

A atividade da enzima DHDPS foi determinada como descrito por Wallsgrove e Mazelis (1981) com modificações de acordo com os resultados obtidos. O ensaio irá conter tampão Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), 100 mM de piruvato, 10 mM de ASA (neutralizado com NaOH antes do uso) e extrato. O ensaio foi incubado a 35 °C por 1 h. Após incubação, o ensaio foi interrompido pela adição de tampão de parada (0,22 M ácido cítrico, 0,55 M de fosfato de sódio e 0,25 mg.mL⁻¹ de *o*-aminobenzaldeído). Após centrifugação a 12.000 g por 10 min, a absorbância foi determinada a 520 nm. A atividade específica da enzima foi determinada em unidades.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína), sendo uma unidade definida como o aumento da absorbância de 0,001/min.

3.1.8.1.2. Síntese do aspartatosemialdeído (substrato da DHDPS)

O aspartato semialdeído (ASA) foi obtido pela ozonólise da DL-alilglicina. Para a produção do ASA, 2,3 g (20mM) de DL-alilglicina foram dissolvidos em 20 mL de HCl 1M e submetido ao processo de ozonólise, sendo a solução mantida em banho de gelo durante 120 minutos até a conversão completa da DL-alilglicina a aspartato semialdeído (Black; Wright,

1955). A solução contendo ASA foi subdividida em frações contendo 1,0 mL e mantidas congeladas em meio ácido para que sua estabilidade possa ser mantida, sendo neutralizada pela adição de KOH, somente durante a condução dos ensaios.

3.1.8.2. LOR e SDH

Os grãos imaturos moídos foram homogeneizados na proporção de 1g:2ml de tampão de extração, contendo 100 mM fosfato de potássio, pH 7.0, 50mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT e 10% de glicerol, 0,1 mM de PMSF e 5% de PVP (m/v) em almofariz. Os homogeneizados foram filtrados em gaze e centrifugados por 30 min a 10.000 rpm. Os extratos brutos foram submetidos duas vezes à precipitação com sulfato de amônio (faixa de 0-20% e 20-50%), sendo centrifugados ao final de cada procedimento.

Os *pellets* obtidos da extração das enzimas e purificados parcialmente foram ressuspensos no tampão de extração. Os extratos foram desalinizados em coluna Sephadex G25 equilibrada com tampão 100 mM de Tris-HCl para posteriormente serem utilizadas nos ensaios enzimáticos de acordo com Gaziola *et al.* (1999) e Brennecke *et al.* (1996).

3.1.8.2.1. Atividade da enzima LOR

Os ensaios para atividade de LOR seguiram a metodologia descrita por Gaziola *et al.* (1999) e, foram realizados mediante incubação, por 15 min a 30 °C, de uma mistura contendo 100 mM de tampão Tris-HCl pH 7.4, 10mM de ácido α -cetoglutárico neutralizado com KOH, 20 mM de lisina, 0,14 mM de NADPH e a preparação da enzima num volume final de 0,9 mL. Nos controles foi medida a atividade residual ocorrida pela oxidação inespecífica da NADPH sem adição do substrato lisina (branco).

A atividade da LOR foi verificada pela queda da absorbância em 340 nm por um período de 15 minutos. Para o cálculo da atividade utilizaremos a diferença entre a absorbância no tempo zero, e em 15 min, descontando-se os brancos. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima necessária para a oxidação de 1,0 nmol de NADPH/min à 30 °C.

3.1.8.2.2. Atividade da enzima SDH

Os ensaios para atividade da SDH foram executados como descrito para LOR, de acordo com Gaziola *et al.* (1999) num volume final de 0,9 mL, contendo 100 mM de tampão Tris-HCl pH 8,4, 2 mM de NAD, 2 mM de sacaropina e a preparação da enzima. No ensaio

controle foi medida a atividade residual ocorrida pela redução inespecífica do NAD sem adição do substrato sacaropina (branco).

A atividade da SDH foi verificada pelo aumento da absorbância em 340 nm. Para o cálculo da atividade utilizaremos a diferença entre a absorbância no tempo zero, e em 15 min, descontando-se os brancos. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima necessária para a redução de 1,0 nmol de NAD/min à 30 °C. A atividade específica das enzimas foram descritas em nmoles de NADPH ou NAD oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

3.1.9. Determinação de fitato nos grãos

O método utilizado foi segundo Latta e Eskin, (1980), o qual se baseia na formação de um composto ferro-ácido-sulfossilissílico de coloração azul escuro denominado de reagente de Wade. Na presença de fitato o ferro é deslocado, reduzindo a intensidade da coloração. A extração foi pela adição de 10 mL de HCl 2,4 % para 0,25 g de amostra sob agitação por três horas. Posteriormente foi adicionado a amostra 3 mL de solução aquosa contendo resina trocadora de ânions (Dowex 1X 200-400 aniônica - Sigma), previamente preparada para a retenção do fitato. A eluição das impurezas (fósforo inorgânico e outros compostos com menor afinidade) da resina foi feita com NaCl diluído (0,07 M). Em seguida, os fosfatos de inositol foram eluídos com NaCl 0,7 M. A leitura das amostras e da curva padrão foi realizada após adição do reagente de Wade, em espectrofotômetro a 500 nm. Os valores foram determinados em relação à curva padrão de concentrações conhecidas de fitato de sódio por regressão linear.

3.1.10. Determinação de macro e micronutrientes

Para essa análise foram utilizados materiais secos e moídos em textura de pó fino de folha bandeira e grão maduro (em sua forma integral e polida).

O nitrogênio analisado no material vegetal foi determinado por meio do extrato obtido via digestão sulfúrica, sendo determinada a concentração desse elemento pelo método analítico de micro-Kjeldahl (Malavolta *et al.*, 1997). Assim como foram determinadas as concentrações de P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn, Zn e Ni. O extrato para determinação dos nutrientes foi obtido via digestão nítrico-perclórica a partir do qual foram determinados os nutrientes usando a visualização radial do espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado (ICP-OES) equipado com câmara de nebulização. As seguintes linhas de emissão foram utilizadas: P I 213.618 nm; K I 769.897 nm; Ca I 422.673 nm; Mg I 280.270 nm;

S_I 181.972 nm; B_I 249.773 nm; Cu_I 324.754 nm; Fe_{II} 259.940 nm; Mn_{II} 259.373 nm; Zn_{II} 231.865 nm e Ni_{II} 231.604.

3.1.11. Análise estatística

Após a coleta das amostras de tecidos foliares, grãos imaturos, grãos integrais e grãos polidos, os dados obtidos a partir das análises laboratoriais foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$), sendo as médias comparadas pela Diferença Mínima Significativa (DMS) de Fisher ($p < 0,05$). As Análises de Componentes Principais (ACPs) e Correlações de Pearson foram realizadas com base nas médias dos tratamentos. No caso das ACPs, foram apresentados apenas os gráficos do tipo Biplot. Todas as análises foram realizadas no software R versão 3.1.0 (R Core Development Team, 2014).

3.2. Experimento II: Analisando a variabilidade de um banco de germoplasma de arroz para caracteres nutricionais proteicos

3.2.1. Material vegetal

O segundo experimento foi composto por 16 genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), vide Tabela 3, que fazem parte do banco de germoplasma do Departamento de Genética da Esalq/USP e da Embrapa Arroz e Feijão, afim de analisar as características nutricionais proteicas e de acúmulo de zinco no grão inerente de cada genótipo em estudo.

Tabela 3. Genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.) utilizando para análise da diversidade genética relacionado a porção proteica de reserva dos grãos

n.	Nome original da cultivar	Nome fantasia tese	Entidade Criadora	Banco de Germoplasma de origem para plantio
1	Batatais	Batatais	ICA-SP ¹	Embrapa Arroz e Feijão
2	BRSMG Caravera	Caravera	Embrapa ²	ESALQ/USP ⁴
3		Carolino	Portugal	Embrapa Arroz e Feijão
4	Cateto Seda	Cateto Seda		Embrapa Arroz e Feijão
5	Dourado Precoce	Dourado Precoce	IAC-SP	Embrapa Arroz e Feijão
6		Filipino		ESALQ/USP
7		Goiano		ESALQ/USP
8	IAC 165	IAC 165	IAC-SP	ESALQ/USP
9	IAC 25	IAC 25	IAC-SP	ESALQ/USP
10	BRS Pampa	Pampa	Embrapa	ESALQ/USP
11	BRS Primavera	Primavera	Embrapa	Embrapa Arroz e Feijão
12	BRS Sertaneja	Sertaneja	Embrapa	Embrapa Arroz e Feijão
13	BRS Talento	Talento	Embrapa	Embrapa Arroz e Feijão
14	SCS 114 AndoSan	SCS 114	EPAGRI ³	ESALQ/USP
15	EPAGRI 109	EPAGRI 109	EPAGRI	ESALQ/USP
16	IRGA 417	IRGA 417	Sementes Ceratti	ESALQ/USP

¹Instituto Agronômico de Campinas, Estado de São Paulo

² Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

³ Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

⁴ Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Campus Piracicaba/SP da Universidade de São Paulo

Para esse experimento foram utilizadas as sementes maduras de todas as cultivares, que passaram por processamento após sua colheita, que se resumiu em: secagem a temperatura ambiente da panícula, triagem e separação da casca dos grãos. Consecutivamente, os grãos em sua forma integral foram moídos até textura de farinha fina, com auxílio de moinho elétrico, a qual foi utilizada para a quantificação de proteína de reserva, aminoácidos livres, ácido fítico, macro e micronutrientes.

3.2.2. Modelo e delineamento experimental

O experimento foi conduzido em campo experimental localizado no Departamento de Genética da ESALQ/USP-Piracicaba/SP. As plantas foram obtidas via sementes; por meio de semeadura manual, distribuindo aproximadamente 100 sementes ao longo de cada linha, contendo 3 m de extensão por 0,45 m de espaçamento entre linhas. Foi realizado em três blocos em látice quadrado (4x4), com adubação NPK de plantio e mais duas de cobertura ao longo do ciclo, com sistema de irrigação por aspersão (Figura 7).

Foi realizado controle de ervas daninhas por meio de defensivo pré-emergente e com capinas regulares. Também foi necessário fazer controle preventivo de brusone com aplicações de produtos específicos, indicado pelo engenheiro agrônomo responsável pelas áreas experimentais do Departamento de Genética.

Figura 7. Sistema de cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) em campo experimental, em delineamento láctice quadrado (4X4), com irrigação por aspersão. O experimento esteve localizado, no Departamento de Genética, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, campus Piracicaba/SP da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP)

3.2.3. Determinação das características do solo e adubação

Antes da instalação do experimento, averiguaram-se as características químicas do solo da área, a fim de efetuar a correção e adubação do mesmo. Para isso foram coletadas amostras de solo na profundidade de 0-20 cm, da área experimental, localizada a 22°42'S 47°38'O, pertencente ao departamento de Genética e Melhoramento da ESALQ/USP, na cidade de Piracicaba/SP.

A amostra de solo foi mandada para análise em laboratório especializado, e de posse dos dados (Tabela 4) o solo da área experimental foi devidamente corrigido e adubado. A adubação foi realizada conforme as necessidades da cultura, de acordo com o descrito no tópico 3.1.4. Assim sendo, a adubação de plantio com aplicação da formulação NPK 4-14-8 equivalente a 500 kg.ha⁻¹ foi realizada momento de abertura do sulco, e da formulação NPK 20-0-20 nas duas adubações por cobertura, utilizando-se 7,5 g.m⁻¹ ao longo das linhas de plantio.

Tabela 4. Caracterização química do solo do campo experimental utilizado para o plantio de arroz (*Oryza sativa* L.)

pH	M.O	P	K	Ca	Mg	H+Al	Al	Soma	CTC	Sat.	Sat.	S
CaCl ₂		resina						bases S.B.		bases	Al	SO ₄
	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	----- mmol _c dm ⁻³ -----							V%	m%	mg dm ⁻³
4,8	16	35	1,8	27	11	38	2	40	58	51	5	8
Cu			Fe			Zn		Mn		B		
			----- DTPA* -----			(água quente)						
						----- mg dm ⁻³ -----						
3,1			21			1,5		20,8		0,08		

* Ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA-TEA; pH 7,3)

3.2.4. Análises das proteínas do grão

O método utilizado para extração das proteínas de reserva foi baseado no trabalho de Landry *et al.* (2000) e Santos *et al.* (2013), contendo as modificações apresentadas no tópico 3.1.5 do presente trabalho, assim como se seguiu a metodologia para a determinação da concentração de proteínas, descrita no tópico 3.1.6.

3.2.5. Análises dos aminoácidos solúveis totais

Seguiu-se as etapas descritas no tópico 3.1.7 para se extrair os aminoácidos solúveis totais dos materiais obtidos no segundo experimento. Para isso também foram pesados 0,25 g de farinha integral, obtida dos grãos maduros de arroz, a qual foi acrescentada MCW (metanol:clorofórmio:água, na proporção 12:5:3).

A quantificação dos aminoácidos obtidos da extração, foram medidos como descrito no tópico 3.1.7.1, assim como a composição manteve a metodologia contida no tópico 3.1.7.2.

3.2.6. Determinação de fitato nos grãos

A determinação da concentração de fitato, para os 16 genótipos em estudo, foi realizada segundo o descrito no tópico 3.1.9.

3.2.7. Determinação de macro e micronutrientes no grão

A determinação dos nutrientes no grão maduro em sua forma integral dos 16 genótipos em estudo foi realizada segundo o descrito no tópico 3.1.10.

3.2.8. Análise estatística

Após a coleta das amostras de grãos integrais, os dados obtidos a partir das análises laboratoriais foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$), sendo as médias comparadas pela Diferença Mínima Significativa (DMS) de Fisher ($p < 0,05$). As Análises de Componentes Principais (ACPs) e Correlações de Pearson foram realizadas com base nas médias dos geótipos. No caso das ACPs, foram apresentados apenas os gráficos do tipo Biplot. Todas as análises foram realizadas no software R versão 3.1.0 (R Core Development Team, 2014).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimento I

Os resultados obtidos para concentração de zinco (Zn) nas diferentes cultivares estudadas (Cateto Seda “CS”, Primavera “Pr” e Sertaneja “Se”), em seus diferentes tecidos (Figura 8), mostram que os materiais estudados não apresentaram diferença significativa esperada entre si para essa variável em questão. De acordo com descrição informal, dado pelo curador do banco de germoplasma da Embrapa, os materiais em questão deveriam exibir o padrão de concentração de Zn em grãos como CS>Pr>Se, no entanto foi encontrado o inverso em grão integral, sendo CS<Pr<Se, e para grão polido só há diferença em CS, que obteve pior desempenho que as outras cultivares.

Ao analisar a folha bandeira, foi verificada uma tendência de acúmulo de Zn, conforme o aumento da dose do micronutriente aplicado, principalmente para as cultivares Sertaneja e Primavera (Figura 8 a). No entanto, quando observado os resultados para os tecidos de interesse para alimentação humana, ou seja, o grão integral (Figura 8 b) e polido (Figura 8 c), não houve redistribuição eficiente do micronutriente para as sementes, apesar da dose 2 kg. ha⁻¹ ZnSO₄.7H₂O ter exibido aumento significativo comparado ao controle, mas que não se manteve quando o grão passou por processo de polimento.

Considerando que praticamente não houve efeito significativo da aplicação foliar de Zn, relativo ao seu acúmulo em grãos integrais e polidos, prosseguiu-se as análises bioquímicas considerando somente as diferenças entre os genótipos em sua relação com o micronutriente em questão, utilizando então o materiais vegetais das parcelas representativas ao controle (sem tratamento com Zn).

Figura 8. Concentração de zinco em folhas bandeira (a), grão integral (b) e grão polido (c), após adubação foliar com sulfato de zinco (doses equivalentes a 0, 2 e 4 kg ha⁻¹ ZnSO₄.7H₂O), em três genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.). Letras maiúsculas comparação de médias entre genótipos e, letras minúsculas comparação de média entre tratamentos, em 5% de significância

Para o presente estudo, a média de concentração de Zn para grão integral foi de 14,12 mg.kg⁻¹ de Zn na cultivar Sertaneja, 13,74 mg.kg⁻¹ de Zn para Primavera e 12,80 mg.kg⁻¹ de Zn em Cateto Seda, independentemente do tratamento (Figura 8 b). Levando em consideração que as condições experimentais foram as mesmas para ambos os genótipos, as diferenças exibidas estão relacionadas com a capacidade de absorção e transporte de Zn inerentes à cada genótipo. Variações na concentração de Zn em grãos de arroz integral foram reportadas, para o amplo germoplasma de arroz do Instituto Internacional de Pesquisa do Arroz (IRRI), na qual a média de concentração de Zn é apenas de 25,4 mg.kg⁻¹ (Phattarakul *et al.*, 2012), o que seria maior que o encontrado para as três cultivares estudadas para essa tese, assim como outro estudo avaliando mil genótipos, apresentou amplitude de 13,5-58,4 mg.kg⁻¹ de Zn. Esse fato confirma a capacidade diferente de acúmulo de Zn segundo a diversidade genética, assim como diferentes resultados também são obtidos para mesmas cultivares, em condições de plantio diferenciadas (Fageria, 2001; Phattarakul *et al.*, 2012).

Nível crítico ou concentração, é o termo dado para definir a faixa de concentração do nutriente que corresponde a 90% do rendimento máximo da planta, seja em crescimento ou produtividade. Essa concentração essencial de Zn nos tecidos varia de acordo com as espécies, cultivares, idade, parte da planta e meio ambiente (Sadeghzadeh, 2013). As folhas são consideradas os tecidos mais adequados para definir o estado nutricional da planta, sendo que para plantas de arroz o valor esperado descrito por Sadeghzadeh (2013) é de 15 mg.kg⁻¹ de Zn. Por outro lado, Casarin *et al.* (2018) classificam a faixa de suficiência em folhas bandeiras de arroz irrigado entre 20-100 mg.kg⁻¹ de Zn, enquanto que Oliveira, *et al.* (2003), refere-se com valores de 10-50 mg.kg⁻¹ de Zn na folha bandeira, quando coletada no início do florescimento.

O presente trabalho apresentou aumento significativo na concentração de Zn nas folhas bandeira após adubação foliar, entre o controle (0 kg.ha⁻¹ ZnSO₄.7H₂O) e o tratamento com 2 kg.ha⁻¹ ZnSO₄.7H₂O (Figura 8 a), que foram colhidas juntamente à colheita dos grãos maduros. Assim como foi exibida uma tendência de aumento entre os tratamentos 2 e 4 kg.ha⁻¹ ZnSO₄.7H₂O, porém não demonstrou significância estatística. Os maiores valores de acúmulo de Zn em folhas bandeiras foram encontrados para a cultivar Sertaneja (25,04 mg.kg⁻¹ de Zn) na adubação correspondente a 4 kg.ha⁻¹ ZnSO₄.7H₂O, seguido por Cateto Seda (21,71 mg.kg⁻¹ de Zn) e Primavera (19,07 mg.kg⁻¹ de Zn) no mesmo tratamento (Figura 8 a). Na ausência de adubação foram verificados os menores valores de concentração, sendo o menor valor de 13,15 mg.kg⁻¹ de Zn para o acesso Primavera, e o maior em Cateto Seda contendo 14,21 mg.kg⁻¹ de Zn (Figura 8 a).

No trabalho realizado por Phattarakul *et al.* (2012), analisando sete cultivares de arroz, estabelecidas em nove lugares diferentes, verificou-se relação entre o Zn contido nas sementes com casca, e em grão integral, assim como em grão polido, quando houve tratamento com adubação foliar com sulfato de zinco. O impacto da adubação foi relevante nesse trabalho, no entanto, é essa íntima associação entre os tipos de grãos, que fez o autor sugerir que ocorre uma penetração do elemento via as camadas internas do endosperma. Tal dado pode sugerir, que no caso específico de arroz, a aquisição de Zn por meio de adubação foliar é efetiva somente se houver absorção do elemento via a casca do grão, sendo então transferido para as demais camadas internas da semente, não estando associado por um meio de redistribuição via floema, partindo da folha bandeira, a qual é fonte importante de nutrientes e fotoassimilados para o grão (Boonchuay *et al.*, 2013).

A eficiência da adubação para a biofortificação de Fe e Zn é bem descrita pelos trabalhos realizados por Ismail Cakmak em trigo (Cakmak, 2008, 2010; Boonchuay *et al.*, 2013; Erenoglu *et al.*, 2015; Cakmak *et al.*, 2017), no entanto, há uma diferença anatômica entre essa espécie em relação a planta de arroz, que pode auxiliar a entender porque o mesmo sucesso em aquisição de nutrientes via fertilização foliar não ocorre para o gênero *Oryza*. Em trigo a fonte de remobilização de nutrientes para os grãos são as folhas bandeiras e as folhas mais baixas, já em arroz, o dreno principal de remobilização de Zn é o caule, sendo baixa a participação das folhas no transporte de nutrientes à semente (Waters; Sankaran, 2011).

Variedades de arroz cultivados no Brasil foram expostos aos níveis de 0 mg.kg⁻¹ e 10 mg.kg⁻¹ de Zn, e diferenças significativas foram observadas entre os genótipos em sua produtividade e outros atributos fisiológicos como altura de planta e número de panículas, o que permitiu classifica-los em eficientes ou não no uso de Zn (Fageria, 2001), indicando que ocorre diferenças entre as variedades de arroz cultivado sob o aspecto de eficiência do uso e absorção de Zn.

A absorção de Zn é influenciada principalmente por tipos de manejo de solo, clima, pH, temperatura, matéria orgânica contida, entre outros, a citar a interferência por outros elementos (Oliveira *et al.*, 2003; Sadeghzadeh, 2013; Casarin *et al.*, 2018). A adubação fosfatada e a calagem excessivas diminuem a capacidade de absorção de Zn pelas plantas, porém não alteram sua disponibilidade no solo (Lopez ; Malavolta, 1974), que tem o valor de 0,9 mg.dm⁻³ (Mehlich 1) como o teor crítico de Zn no solo para o arroz (Oliveira *et al.*, 2003).

Esse experimento foi conduzido em sistema fechado, em casa de vegetação com irrigação controlada e em vasos de 10 L contendo três plantas e com solo com a concentração de 2,0 mg.dm⁻³ de Zn (DTPA), considerado um valor alto para esse elemento pelo Boletim

Técnico 100 (Raij *et al.*, 1996). Assim sendo, a baixa concentração de Zn encontrado em grãos (Figura 8), nas cultivares estudadas (Cateto Seda, Primavera e Sertaneja) não está associado com deficiência desse metal, e com nenhum outro tipo de estresse, mas pode estar associada ao cultivo em vaso, que pode estar restringindo o potencial de absorção desse nutriente.

Como não foi apresentada a diferença esperada entre as cultivares em estudo para o teor de Zn contido nos grãos, assim como não houve incremento considerado importante no aspecto de biofortificação, existe a possibilidade do sistema de cultivo não ter sido adequando para a hipótese inicialmente levantada, assim sendo, um segundo experimento foi realizado para testar a resposta de 16 genótipos a concentração natural de Zn em campo agricultável. No entanto, as análises investigativas sobre as três cultivares continuaram, em via de caracterizar os três genótipos para o metabolismo de síntese e degradação de aminoácidos e constituição de proteínas de reserva, também observando diferenças entre grão integral e polido, porém descartando o tratamento por adubação foliar de Zn.

Possuir a glutelina como principal fração de proteína de reserva é uma particularidade do arroz em relação aos demais cereais, como aveia, cevada e trigo, que contém a prolamina como a maior porção (Amagliani *et al.*, 2017). Nas Tabelas 5 e 6 são apresentadas as concentrações das frações de proteínas de reserva no grão integral e polido. Para grão integral, não há alteração significativa entre os genótipos para as frações proteicas de glutelina e prolamina, porém a cultivar Primavera apresentou os menores valores para as frações albumina e globulina.

Ao comparar as concentrações de proteínas de reserva total para arroz integral e polido, verifica-se diminuição nas concentrações de proteína (Tabelas 5 e 6), principalmente em albuminas, que diminuiu em média de 6% de integral para polido, mas que fez a proporção de glutelina apresentar aumento médio de 1,88%, e prolamina em 1,5%. O fato descrito explica-se pelo processo de polimento retirar as camadas externas do grão, onde, segundo Amagliani *et al.* (2017) se concentram as maiores parcelas de proteínas. Sendo, os atributos estruturais, funcionais e nutricionais do arroz, fortemente influenciados pela sua composição proteica, estando associados à sua qualidade diante o seu processamento (porcentagem de grãos inteiros) e cocção (Amagliani *et al.*, 2017).

Amagliani *et al.* (2017) atribuiu o fato da concentração de lisina em farelo de arroz ser mais abundante que em farinha de arroz (arroz polido em forma de farinha), graças a elevada presença desse aminoácido na fração proteica albumina, que possui maior presença na camada externa do grão, da qual basicamente é constituído o farelo de arroz. O grão de Cateto

Seda possui diâmetro maior que o de sertaneja e primavera, que possuem grãos tipo agulhinha, e possivelmente o grão cateto perde maior quantidade de massa quando polido, para que esteja uniformemente branco, atendendo as necessidades comerciais. Dessa forma, pode ser explicada a única diferença significativa entre os genótipos, que se encontra na fração de prolamina para Cateto Seda.

Tabela 5. Concentração das frações de proteínas de reserva de grão integral de três genótipos de arroz (*Oriza sativa* L.), expresso em mg.mL⁻¹ e a proporção relativa em porcentagem (%)

Genótipos	Albumina		Globulina		Prolamina		Glutelina		Proteína total
	mg mL ⁻¹	%	mg mL ⁻¹	%	mg mL ⁻¹	%	mg mL ⁻¹	%	mg mL ⁻¹
Cateto Seda	2,44 a	18,05	3,06 ab	22,63	0,77 a	5,70	7,84 a	57,99	13,52 a
Primavera	1,54 b	9,99	2,55 b	16,54	0,87 a	5,64	10,47 a	67,90	15,42 a
Sertaneja	1,98 ab	14,52	3,6 a	26,39	0,76 a	5,57	7,31 a	53,59	13,64 a
Média	1,98		3,07		0,8		8,54		14,26
CV (%)	15,15		11,36		7,1		51,27		28,19

Nota: dados foram submetidos à análise de variância ($p<0,05$), sendo as médias comparadas pela Diferença Mínima Significativa (DMS) de Fisher ($p<0,05$). Letras representam comparações das médias entre os genótipos dentro de cada ensaio enzimático

Tabela 6. Concentração das frações de proteínas de reserva de grão polido de três genótipos de arroz (*Oriza sativa* L.), expresso em mg.mL⁻¹ e a proporção relativa em porcentagem (%)

Genótipos	Albumina		Globulina		Prolamina		Glutelina		Proteína total
	mg mL ⁻¹	%	mg mL ⁻¹	%	mg mL ⁻¹	%	mg mL ⁻¹	%	mg mL ⁻¹
Cateto Seda	0,38 a	4,59	1,94 a	23,46	0,48 b	5,80	5,48 a	66,26	8,27 a
Primavera	0,87 a	10,16	1,60 a	18,69	0,63 a	7,36	5,54 a	64,72	8,56 a
Sertaneja	0,71 a	9,44	2,12 a	28,19	0,62 a	8,24	4,07 b	54,12	7,52 a
Média	0,65		1,89		0,58		5,03		8,12
CV (%)	41,2		27,17		11,86		8,77		10,65

Nota: dados foram submetidos à análise de variância ($p<0,05$), sendo as médias comparadas pela Diferença Mínima Significativa (DMS) de Fisher ($p<0,05$). Letras representam comparações das médias entre os genótipos dentro de cada ensaio enzimático

As Figuras 9 e 10 apresentam correlação das frações proteicas e fitato, para grão integral e polido, respectivamente. Em grão integral e polido, é identificada correlação positiva com o conteúdo total de proteínas de reserva com glutelina, indicando que essa é a fração majoritariamente ligada ao teor final de proteína no grão, porém, em grão integral também há relação positiva com a prolamina, que não ocorre para grão polido. Assim sendo, percebe-se a real importância da fração prolamina na organização dos tecidos externos da semente de arroz.

Figura 9. Análise de componentes principais para três genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.): Cateto Seda - CS, Primavera - PR e Sertaneja -SE; para proteínas de reserva e fitato em grão integral

Figura 10. Análise de componentes principais para genótipos de arroz para três genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.): Cateto Seda - CS, Primavera - PR e Sertaneja -SE; para proteínas de reserva e fitato em grão polido

A correlação positiva entre as frações albumina e globulina, e ambas estão relacionadas positivamente com fitato para os dois tipos de grão, o que não é vantajoso do ponto de vista nutricional, uma vez que o fitato tem atuação antinutricional na digestão de animais monogástricos (Coelho *et al.*, 2007; Rasmussen; Ingvarsdén; Torp, 2010). A elaboração de estratégias de engenharia genética buscando elevar o conteúdo de aminoácidos essenciais através de alterações na porção proteica pode comprometer a disponibilidade digestiva de micronutrientes como Zn e Fe, já que aumentando as concentrações das frações proteicas estratégicas, albumina e globulina, aumentaria por consequência o teor de fitato, como exibido no gráfico de componentes principais. E mesmo em grão integral, no qual aparece interação negativa entre fitato e prolamina, ao reduzir a porção de prolamina em vias de aumentar o conteúdo de lisina no grão, ocorreria consequente elevação da concentração de fitato.

Segundo Juliano (1985), o farelo de arroz possui grande quantidade de albumina e globulina, proteínas com elevada concentração de lisina. Por outro lado, o arroz polido, basicamente constituído do endosperma do grão, possui 80% de glutelina, 15% de albumina+globulina, e 5% de prolaminas (Juliano, 1985). Mas, ainda que o arroz integral possua maior teor de lisina que o grão polido, a sua qualidade nutricional é afetada pela abundante presença de fatores antinutricionais, que se concentram na camada externa do endosperma. Dessa forma, a quantidade de nitrogênio ingerido, absorvido e retido (Net Protein Utilization -NPU) entre as duas formas do grão de arroz é semelhante (Juliano, 1985), mostrando que é necessário o estudo de variedades que possuam menores teores de antinutricionais, como o fitato.

Foi verificada uma variação na concentração de fitato entre as três cultivares (Figura 11), sendo o menor valor exibido em Primavera para grão integral (0.8%), e em Cateto Seda para grão polido (0,4%), independente do tratamento com Zn. Todos os genótipos apresentaram diminuição significativa na concentração de fitato do grão integral para polido, o que corrobora a informação contida no parágrafo acima. Dessa forma, afirma-se que em termos de qualidade nutricional, relacionando conteúdo de Zn e fitato, a cultivar Primavera demonstrou ser a melhor opção para o consumo de arroz em forma integral, por possuir maior quantidade de Zn e menos de fitato, em comparação com as demais cultivares. Já para o consumo de arroz em forma de grão polido, pode-se indicar a cultivar Cateto Seda dentre os genótipos estudados, que compensa seu baixo desempenho em Zn com a menor quantidade de fitato contidos para seus grãos polidos. Apesar do genótipo Sertaneja possuir a maior concentração de Zn, também apresenta a maior quantidade de fitato nas duas formas de grão, podendo sugerir que para essa cultivar o fitato tenha funcionado como principal composto armazenador de Zn no grão, assim como é descrito para trigo (Cakmak, 2008).

De acordo com a pesquisa realizada por Iwai *et al.* (2012), a qual verificou a distribuição de nutrientes nos tecidos da sementes de arroz, o Zn apresentou estar inicialmente (10 dias após o florescimento) associado à aleurona, porém com o desenvolvimento da semente, é observado a sua redistribuição para a parte mais interna do endosperma. Nessa mesma pesquisa foi comprovado que o Zn está fortemente ligado ao fitato, principalmente na parte externa da semente (Iwai *et al.*, 2012), o que pode ser verificado pelas variações na porcentagem de fitato encontradas para grão integral e polido do presente experimento (Figura 11). Porém, o fato de Zn também estar presente no endosperma, abre preceitos para as pesquisas que concluíram que este elemento pode ser armazenado na semente em conjunção

com peptídeos sulfurados, ou outros tipos de compostos, que requerem serem melhor estudados (Iwai *et al.*, 2012).

Figura 11. Concentração de fitato em porcentagem para três genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), em grãos em forma integral e polido. Letras maiúsculas comparação de médias entre genótipos e, letras minúsculas comparação de média entre tratamentos, em 5% de significância

O arroz é diferenciado entre os cereais por possuir maior concentração de lisina, devido as suas proporções de proteínas de reserva, com alta participação de glutamina e baixa prolamina (Shewry, 2007; Shewry e Halford, 2015). A lisina é sintetizada na via do ácido aspártico, juntamente com mais três aminoácidos essenciais, sendo eles, metionina, isoleucina e treonina. Essa via metabólica é catabolizada por diversas enzimas, tais como a aspartato kinase (AK, EC 2.7.2.4), homoserina desidrogenase (HSDH, EC 1.1.1.3) e dihidrodipicolinato sintase (DHDPS, EC 4.2.1.52), que sofrem modulação alostérica negativa pelos produtos finais de suas reações (Azevedo; Lea, 2001; Schmidt *et al.*, 2015).

A AK é a primeira enzima a atuar na via, atua na conversão do aspartato em β -aspartil fosfato, através de fosforilação utilizando-se ATP (Tsujimoto *et al.*, 2016). Dois tipos de isoformas são definidos para AK, sendo uma monofuncional e outra bifuncional, esta última caracterizada pela presença de domínio funcional para AK e HSDH (Medici *et al.*, 2015). A presença das duas isoformas já foi averiguada em diversos tipos de plantas (Schmidt *et al.*, 2015), incluindo o arroz (Teixeira *et al.*, 1998), e apresentam *feedback* negativo pela presença dos aminoácidos sintetizados pela rota, sendo a AK monofuncional inibida pela lisina e, a atividade de AK bifuncional modulada por treonina (Medici *et al.*, 2015).

No presente trabalho, a atividade de AK em grãos imaturos de arroz foi mensurada para os três genótipos em estudo (Tabela 7), sendo possível verificar que o aminoácido treonina apresentou maior atividade inibitória em Sertaneja (30,1%) do que em Cateto Seda e Primavera (16,8% e 16,1%, respectivamente). Observou-se também, que na presença simultânea de treonina e lisina, a resposta ao *feedback* negativo foi maior para Cateto Seda e Sertaneja (86,4% e 85,3%, respectivamente), em comparação a cultivar Primavera (54,1%). Já para o efeito de inibição de lisina não foi detectado diferenças significativas entre os genótipos, mas apresentou maiores porcentagens de inibição da atividade específica de AK (Cateto Seda 72,0%, Primavera 79,8% e Sertaneja 53,71%) do que quando treonina está presente, o que corrobora com o descrito por Azevedo e Lea (2001), quando afirmam que a presença da isoforma AK sensível a lisina é majoritária em plantas superiores, em relação a AK sensível a treonina. De qualquer forma, fica claro que existe variabilidade para a distribuição das diferentes isoenzimas entre os materiais analisados o que pode ser um fator determinante na composição dos aminoácidos.

A enzima aspartato semialdeído desidrogenase (ASADH, EC 1.2.1.11), transforma o β - aspartil fosfato em aspartatosemi-aldeído (ASA), que serve de substrato para duas enzimas diferentes, a HSDH e a DHDPS, fato que promove a divisão da via do ácido aspártico em dois ramos distintos (Azevedo, 2002). Em um dos caminhos, a enzima HSDH atua na redução do ASA em homoserina na presença de NADH (Azevedo; Lea, 2001) e, então a homoserina é fosforilada por meio da atividade da homoserina quinase (HK, EC 2.7.1.39) em o-fosfohomoserina (OPH), sendo substrato de duas novas rotas, que levarão a síntese de treonina e isoleucina em uma via e, de metionina em outra (Azevedo *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2015). Para esta tese, a atividade de HSDH não apresentou diferença significativa em sua atividade em relação aos genótipos de arroz estudados (Tabela 7), mas demonstrou inibição na presença de treonina, sendo as porcentagens de inibição para Cateto Seda, Primavera e Sertaneja de 13,24; 19,26 e 17,86, respectivamente.

Tabela 7. Atividade enzimática específica para as enzimas envolvidas na via do ácido aspártico em $\text{nmol.min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína em grãos imaturos (fase de grão leitoso), para três genótipos de arroz (*Oriza sativa* L.)

Genótipo	AK	AK *Lys	AK *Thr	AK *Lys Thr	HSDH	HSDH *Thr	DHDPS	DHDPS *1 mM Lys	DHDPS *5 mM Lys	DHDPS **5 mM EAC
Cateto Seda	2,79 a	0,78 a	2,32 a	0,41 b	3,85 a	3,34 a	9,83 a	1,85 a	1,84 a	1,94 a
Primavera	2,92 a	0,59 a	2,45 a	1,34 a	3,53 a	2,85 a	6,31 b	1,36 ab	1,23 a	2,01 a
Sertaneja	2,29 a	1,06 a	1,60 b	0,31 b	3,47 a	2,85 a	4,63 b	0,95 b	0,85 a	1,08 a
Média	2,67	0,81	2,13	0,72	3,62	3,03	6,92	1,39	1,30	1,68
CV (%)	12,87	36,45	15,22	45,01	15,57	8,81	23,13	23,61	36,24	51,85

Nota: dados foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$), sendo as médias comparadas pela Diferença Mínima Significativa (DMS) de Fisher ($p < 0,05$)

*Resultado da atividade na presença do aminoácido inibitório

** Resultado da atividade na presença de molécula análoga a lisina (Lys)

Tabela 8. Atividade enzimática específica para as enzimas envolvidas no catabolismo da lisina em $\text{nmol.min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína em grãos imaturos (fase de grão leitoso), para três genótipos de arroz (*Oriza sativa* L.)

Genótipo	LOR	SDH
Cateto Seda	6,56 a	11,23 a
Primavera	3,77 a	11,38 a
Sertaneja	2,70 a	14,01 a
Média	4,34	12,28
CV (%)	61,69	28,53

Nota: dados foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$), sendo as médias comparadas pela Diferença Mínima Significativa (DMS) de Fisher ($p < 0,05$)

A DHDPS atua no caminho paralelo à enzima HSDH na via do ácido aspártico, também utilizando o ASA, sendo o primeiro substrato para as reações subsequentes que levarão à síntese de lisina (Azevedo, 2002). A atividade específica de DHDPS exibida na Tabela 7, foi significativamente maior para Cateto Seda ($9.83 \text{ nmol.min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína) em relação aos genótipos Primavera e Sertaneja, que exibiram os valores de 6, 31 e $4,63 \text{ nmol.min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína, respectivamente. Entretanto, as porcentagens de inibição em relação a atividade específica da enzima sem lisina, foram similares na presença de diferentes concentrações de lisina: 1 mM lisina, 81,18%; 78,44% e 79,48%, e 5 mM lisina: 81,28%; 80,5%, 81,64%, para Cateto Seda, Primavera e Sertaneja, respectivamente.

Atuando no catabolismo da lisina temos a lisina 2-oxoglutarato redutase (LOR, EC 1.5.1.8) e sacaropina desidrogenase SDH (EC 1.5.1.9) (Gaziola *et al.*, 1997). Na Tabela 8 são apresentadas as atividades específicas destas enzimas, e ao comparar os valores obtidos entre os três genótipos de arroz estudados, verificou-se que não houve alteração significativa. A via de degradação da lisina possui papel essencial para o acúmulo desse aminoácido nos grãos, estando envolvido principalmente no mecanismo que controla a concentração de lisina no endosperma da semente (Azevedo; Lea, 2001).

Os gráficos de componentes principais a seguir, representam a relação entre as enzimas envolvidas no metabolismo do ácido aspártico com a concentração final dos aminoácidos sintetizados pela via, sendo que estes não se encontram integrados a proteínas, e sim livres em grão na forma integral (Figura 12) e polida (Figura 13). Para ambos os tipos de grão, as enzimas HSDH, DHDPS e LOR apresentam alta correlação positiva, e todas exibem correlação com AK, porém menos intensa. Já a relação de SDH com as demais enzimas é negativa, o que demonstra que SDH é um ponto chave a ser explorado na busca pelo aumento de concentração de lisina no grão de arroz.

Segundo Gaziola *et al.* (1996; 1997) a atividade de LOR-SDH é específica para o endosperma, dessa forma, era esperado encontrar menores valores para a concentração de lisina em grãos polidos, o que foi corroborado com os resultados exibidos nas Tabelas 9 e 10, em que exibem os valores médios entre as cultivares de $0,41 \text{ mg de AA}^{-1} \text{ g de farinha}$ para grão polido e de $1,50 \text{ mg de AA}^{-1} \text{ g de farinha}$ em grão integral. Os valores de lisina em ambos os tipos de grão (Tabelas 9 e 10) não diferem estatisticamente entre os genótipos, o que concorda com a ausência de significância entre os genótipos para as enzimas LOR-SDH (Tabela 8), reforçando as conclusões exibidas na revisão feita por Azevedo e Lea (2001), na qual descrevem a regulação do catabolismo de lisina como o ponto chave do conteúdo de lisina em grãos.

A estreita relação entre os aminoácidos sintetizados pela via do ácido aspártico e as enzimas responsáveis por catabolizar as reações, também é exibida nas Figuras 12 e 13, na qual lisina possui correlação positiva com DHDPS e LOR, em grão polido e integral, porém a sua relação com SDH passa de nula para positiva em grão polido, que é explicado pela maior atividade da enzima se dar no endosperma, como relatado acima.

Para os três aminoácidos restantes (Ile, Met e Thr), que são sintetizados na via, a relação com a enzima inicial da sua rota específica é variável (Figuras 12 e 13), sendo somente positiva em ambos os tipos de grão para metionina. Em grão integral Thr apresenta correlação negativa e Ile nula, ocorrendo inversão dessa correlação em grão polido. De acordo com os valores de concentração exibidos nas Tabelas 9 e 10 é verificado que houve diminuição para a concentração de todos os aminoácidos em grão polido, em relação ao grão integral. Para os aminoácidos em questão, a menor porcentagem de diminuição, em relação a grão integral para polido, foi para Sertaneja que exibiu taxa de diminuição igual à 36,43% para Thr, 14,83% para Ile, e de 26,60% em Met. Já a maior taxa de diminuição foi apresentada para Cateto Seda em Thr (76,47%) e Met (50,24%), sendo que para Ile as porcentagens de diminuição foram aproximadas para Cateto Seda (52,27%) e Primavera (57,27%).

Figura 12. Análise de componentes principais para três genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.): Cateto Seda - CS, Primavera - PR e Sertaneja - SE. Resultado obtido para relação de aminoácido livre (Isoleucina - Ile, Lisina - Lys, Metionina - Met, e Treonina - Thr) em grão de arroz integral, com as enzimas participativas da via do ácido aspártico: (AK, EC 2.7.2.4), homoserina desidrogenase (HSDH, EC 1.1.1.3) e dihidrodipicolinato sintase (DHDPS, EC 4.2.1.52); e do catabolismo de lisina: 2-oxoglutarato redutase (LOR, EC 1.5.1.8) e sacaropina desidrogenase SDH (EC 1.5.1.9)

Figura 13. Análise de componentes principais para três genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.): Cateto Seda - CS, Primavera - PR e Sertaneja - SE. Resultado obtido para relação de aminoácido livre (Isoleucina - Ile, Lisina - Lys, Metionina - Met, e Treonina - Thr) em grão de arroz polido, com as enzimas participativas da via do ácido aspártico: (AK, EC 2.7.2.4), homoserina desidrogenase (HSDH, EC 1.1.1.3) e dihidrodipicolinato sintase (DHDPS, EC 4.2.1.52); e do catabolismo de lisina: 2-oxoglutarato redutase (LOR, EC 1.5.1.8) e sacaropina desidrogenase SDH (EC 1.5.1.9)

Tabela 9. Composição de aminoácidos livres individuais de grão integral de três genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.) expresso em mg de AA⁻¹ g de farinha

Genótipo	His	Ser	Arg	Gly	Asp	Glu	Thr	Ala	Pro	Lys	Tyr	Met	Val	Ile	Leu	Phe
Cateto																
Seda	1,11 a	8,73 a	6,94 a	1,40 a	7,68 a	23,23 a	3,23 a	10,57 a	3,67 a	1,21 a	4,66 a	2,07 a	6,32 a	3,02 a	2,24 a	2,54 a
Primavera	1,33 a	8,43 a	7,51 a	1,29 a	6,30 a	29,46 a	1,92 a	7,67 a	2,55 a	1,79 a	3,30 a	2,46 a	5,19 a	2,20 a	1,95 a	1,83 a
Sertaneja	1,37 a	9,95 a	8,36 a	1,74 a	7,30 a	33,44 a	4,09 a	9,51 a	3,69 a	1,48 a	3,81 a	2,18 a	5,21 a	2,09 a	2,03 a	2,11 a
Média	1,28	9,04	7,60	1,48	7,09	28,71	3,09	9,25	3,30	1,50	3,92	2,24	5,58	2,44	2,07	2,16
CV(%)	15,71	32,93	25,18	28,46	31,17	27,35	35,69	35,45	23,96	26,79	26,05	19,01	29,32	33,79	22,96	22,95

Nota: dados foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$), sendo as médias comparadas pela Diferença Mínima Significativa (DMS) de Fisher ($p < 0,05$)

Tabela 10. Composição de aminoácidos livres individuais de grão polido de três genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.) expresso em mg de AA⁻¹ g de farinha

Genótipo	His	Ser	Arg	Gly	Asp	Glu	Thr	Ala	Pro	Lys	Tyr	Met	Val	Ile	Leu	Phe
Cateto																
Seda	-	1,11 b	1,17 a	1,12 a	2,25 a	5,61 a	0,76 b	4,56 a	1,08 a	0,24 a	1,60 a	1,03 a	2,18 a	1,43 a	1,18 a	1,51 a
Primavera	-	7,72 a	1,45 a	2,84 a	1,89 a	7,41 a	0,90 b	3,76 a	1,26 a	0,34 a	1,00 a	1,52 a	2,09 a	0,94 a	1,16 a	1,01 a
Sertaneja	-	0,68 b	2,25 a	1,44 a	1,35 a	8,36 a	2,60 a	6,45 a	1,62 a	0,73 a	1,74 a	1,60 a	2,90 a	1,78 a	1,52 a	1,89 a
Média	-	3,63	1,57	1,83	1,87	7,02	1,31	4,79	1,29	0,41	1,46	1,40	2,34	1,35	1,26	1,43
CV(%)	-	67,67	42,67	33,28	56,07	42,37	35,75	36,20	45,03	58,40	30,68	65,60	47,03	45,15	59,32	49,23

Nota: dados foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$), sendo as médias comparadas pela Diferença Mínima Significativa (DMS) de Fisher ($p < 0,05$)

Como visto acima, os aminoácidos desempenham outros papéis além da constituição de proteínas. Estão envolvidos em reações celulares, desencadeando respostas fisiológicas das plantas, atuando no crescimento e desenvolvimento, controle do pH, tolerância ao estresse, dentre outras (Hildebrandt *et al.*, 2015).

A Figura 14 apresenta os resultados para aminoácidos livres totais (ALT), no qual é verificado que as cultivares não possuem alterações significativas em suas concentrações, para os dois tipos de grão, quando comparados entre si. No entanto, um decréscimo nos valores de ATL são exibidos quando é realizada a comparação entre arroz polido e integral, indicando que o arroz integral é uma opção de consumo mais nutricional do que o polido (Shewry, 2007; Yang *et al.*, 2008; Bhullar; Gruissem, 2013).

Figura 14. Quantificação de aminoácidos livres totais (ALT) de grão integral e polido de três genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), expresso em μmol^{-1} . g de farinha. Letras maiúsculas comparação de médias entre genótipos e, letras minúsculas comparação de média entre tratamentos, em 5% de significância

4.2. Experimento II

Após o experimento em casa de vegetação ter demonstrado que a adubação foliar não foi suficientemente efetiva para aumentar os níveis de concentração de Zn nos grãos de arroz, foi realizado um segundo experimento, com o objetivo de investigar se o acúmulo desse metal está relacionado com a diversidade genética, afim de selecionar algum genótipo viável para atender programas de melhoramento ligados a incremento da qualidade nutricional em grãos.

Para isso, as condições de campo foram idênticas para todos os genótipos, não sendo aplicado nenhum tipo de fertilização em função do Zn, na expectativa de selecionar aquele

com melhor desempenho no acúmulo de Zn, teor de proteína reserva e aminoácidos essenciais em grãos, sendo cultivados em solos agricultáveis normais. Assim sendo, 16 genótipos foram escolhidos (Figuras 15 e 16), com base nas suas diferentes características horticulturais e desempenho no campo.

Figura 15. Sementes com casca de 16 genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.) , originárias do experimento realizado em campo no Departamento de Genética, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, campus Piracicaba/SP da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP)

Figura 16. Grão de 16 genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.) em forma integral, originárias do experimento realizado em campo no Departamento de Genética, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, campus Piracicaba/SP da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP)

Dessa forma, o resultado que segue na Figura 17, representa o acúmulo de Zn em grãos integral (Figura 16), na qual observa-se que a cultivares Primavera e IAC 165 foram as que apresentaram maiores concentrações de Zn, 40,33 e 39,75 mg.kg⁻¹ respectivamente, seguidos por Carolino, Batatais, Cateto Seda, Epagri 109 e Caravera (35,7; 34,33; 34,33; 33,67; 32,83 mg.kg⁻¹ de Zn), todas apresentaram valores acima da média de 32,77 mg.kg⁻¹ de Zn (Tabela 11).

Figura 17. Concentração de zinco em grão integral para 16 genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), em cultivo irrigado no campo experimental do departamento de genética da Universidade de São Paulo, campus Piracicaba/SP (Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP). Os dados foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$), sendo as médias comparadas pela Diferença Mínima Significativa (DMS) de Fisher ($p < 0,05$)

Tabela 11. Concentração de macro e micronutrientes em grão integral, de 16 genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.)

Genótipo	N	P	K	S	Ca	Mg	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	-----g.kg ⁻¹ -----						-----mg.kg ⁻¹ -----				
Batatais	15,06 bcde	2,75 a	1,62 a	0,86 bc	0,20 a	0,66 bcdef	1,62 a	7,83 a	23,50 a	9,50 fg	34,33 abcd
Caravera	16,08 ab	2,88 a	1,96 a	0,81 bc	0,28 a	0,70 abcde	2,22 a	7,66 a	32,17 a	19,83 ab	32,83 abcde
Carolino	14,47 e	2,89 a	1,62 a	1,15 a	0,36 a	0,76 abc	0,68 a	0,00 a	31,50 a	15,17 bcd	35,17 abcd
Cateto Seda	14,84 de	2,92 a	1,79 a	0,82 bc	0,09 a	0,60 cdef	0,68 a	7,83 a	24,50 a	12,17 def	34,33 abcd
Dourado Precoce	14,79 de	2,90 a	1,62 a	0,92 bc	0,29 a	0,71 abcd	2,82 a	9,00 a	16,50 a	12,17 def	31,33 cde
Filipino	15,65 abcd	3,09 a	2,04 a	0,85 bc	0,28 a	0,65 bcdef	1,37 a	7,17 a	27,67 a	10,17 efg	35,33 abc
Goiano	14,57 e	2,70 a	1,87 a	0,94 bc	0,46 a	0,78 abc	1,28 a	8,50 a	23,17 a	11,50 def	32,33 bcde
IAC 165	15,97 abc	2,76 a	1,91 a	0,97 b	0,70 a	0,90 a	1,15 a	9,75 a	41,75 a	17,25 bc	39,75 ab
IAC 25	15,02 cde	2,70 a	1,62 a	0,81 bc	0,12 a	0,63 bcdef	0,94 a	8,33 a	20,67 a	10,00 efg	35,33 abc
Pampa	14,98 cde	2,70 a	1,79 a	0,78 c	0,10 a	0,50 ef	1,02 a	5,67 a	16,17 a	9,17 fg	26,00 e
Primavera	14,97 cde	3,15 a	1,79 a	0,81 bc	1,36 a	0,83 ab	5,03 a	9,00 a	27,50 a	23,67 a	40,33 a
Sertaneja	15,05 cde	2,68 a	1,53 a	0,82 bc	0,09 a	0,53 def	0,77 a	7,33 a	20,50 a	14,83 cde	29,83 cde
Talento	16,17 a	2,33 a	1,70 a	0,78 c	0,08 a	0,49 f	1,02 a	6,33 a	10,33 a	6,50 g	28,50 cde
SCS 114	15,19 abcde	2,83 a	1,79 a	0,85 bc	0,15 a	0,50 ef	0,90 a	7,50 a	29,50 a	10,75 defg	27,75 de
EPAGRI 109	15,43 abcde	2,35 a	1,79 a	0,79 bc	0,17 a	0,72 abcd	2,22 a	6,33 a	22,33 a	11,00 defg	33,67 abcd
IRGA 417	15,46 abcde	2,99 a	1,62 a	0,86 bc	0,10 a	0,59 cdef	1,45 a	5,67 a	20,83 a	11,50 def	28,17 cde
Média	15,22	2,78	4,74	0,85	0,29	0,65	1,60	7,71	23,79	12,77	32,77
CV (%)	3,89	17,48	17,86	12,27	16,40	17,81	33,68	23,22	56,26	22,60	13,37

Nota: dados foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$), sendo as médias comparadas pela Diferença Mínima Significativa (DMS) de Fisher ($p < 0,05$)

Importante ressaltar, que a produtividade é um fator que interfere no teor de Zn nos grãos. Foi observado que quando ocorre aumento de produtividade, o teor de Zn encontrado normalmente nas sementes sofre diminuição em seus valores, quando comparado a um nível de produção menor e, este fato ocorre porque o elemento deve ser distribuído para uma quantidade maior de grãos (Phattarakul *et al.*, 2012; Alves *et al.*, 2015). Apesar de não ser apresentado os dados de produtividade, para os genótipos cultivados, é de conhecimento que a variedade Primavera possui alta produção de grãos (Terra *et al.*, 2015), assim como é esperado para toda cultivar moderna, e esse fato não afetou negativamente o teor de Zn. No entanto, observando a qualidade de sementes plantadas, o vigor e viabilidade de plantas no campo, pode-se dizer que talvez o alto teor de Zn encontrado em Batatais, por exemplo, possa ser justificado pela pouca quantidade de material produzido.

No presente estudo, o pior desempenho para a concentração de Zn em grãos integral foi de 26 mg.kg⁻¹ de Zn para a cultivar Pampa (Tabela 11), valor que encontra-se abaixo da média (32,77 mg.kg⁻¹ de Zn) para os 16 genótipos estudados, mesmo assim, é superior a média de 24,5 mg Zn.kg⁻¹ da população cultivada pela Embrapa para o projeto ArrozBiofort (Neves *et al.*, 2015) e da média de 19,4 mg.kg⁻¹ de Zn para as sete cultivares utilizadas por Phattarakul *et al.* (2012). Talvez o baixo desempenho seja justificável por esta ser uma variedade tolerante a toxidez por Fe (Magalhaes Junior *et al.*, 2012), pois através da análise da Figura 18 observa-se que a absorção dos micronutrientes está em associação positiva em arroz, podendo ser um dos mecanismos de tolerância a toxidez a diminuição da absorção do metal.

Na pesquisa conduzida por Phattarakul *et al.* (2012), utilizando sete genótipos de arroz cultivados em solos pobres em Zn, as concentrações de Zn obtidas para grãos integrais também variaram, assim como demonstrado para os 16 genótipos analisados no presente experimento (Tabela 11). Para o trabalho de Phattarakul *et al.* (2012) o tratamento sem utilização de fertilização com Zn (similar ao presente experimento II, em discussão), foi obtido o menor valor de concentração em grãos integral na cultivar CNT 1, sendo de 9,9 mg.kg⁻¹ de Zn. Esta variedade foi cultivada no solo de Takli (na Tailândia), possuindo apenas 0,5 mg.kg⁻¹ de Zn (método de extração DTPA). Já os maiores valores apresentados (nas condições descritas anteriormente) foram de 31,0 e 26,5 mg.kg⁻¹ de Zn para as cultivares IR68144 e TDK7, cultivadas também em solos pobres em Zn também. A produtividade para

as três cultivares mencionadas é equiparável (valores de 3,7; 3,3 e 4,3 t.ha⁻¹), o que sugere que a diferença no teor de Zn nos grãos é oriunda das características do genótipo.

Os resultados exibidos na Tabela 11 mostram que os genótipos SCS 114, IRGA 417, Talento e Sertaneja (27,45; 28,17; 28,50 e 29,83 mg.kg⁻¹ de Zn, respectivamente) tiveram o mais baixo desempenho para concentração de Zn, dentre os genótipos estudados, porém estão próximos do valor de 28 mg.kg⁻¹ de Zn estabelecido pelo programa HarvestPlus (White; Broadley, 2011) para teores desejáveis de Zn em grão de arroz. Já os genótipos Dourado Precoce e Goiano, apresentaram valores abaixo da média geral dos genótipos, 31, 33 e 32,33 mg.kg⁻¹ de Zn, respectivamente, (Tabela 11), porém estão dentro da faixa esperada para alimento biofortificados, sendo curiosamente genótipos que obtiveram alto desempenho em produtividade. Enquanto as demais plantas estudadas apresentaram valores acima da média geral dos genótipos, no quesito teor de Zn em grão integral (Tabela 11).

De acordo com Malavolta (1980) para que qualquer planta se desenvolva adequadamente é necessário 17 nutrientes essenciais, sendo eles os macronutrientes cálcio (Ca), carbono (C), enxofre (S), fósforo (P), hidrogênio (H), magnésio (Mg), nitrogênio (N), oxigênio (O) e potássio (K), e os micronutrientes boro (B), cloro (Cl), cobre (Cu), ferro (Fe), molibdênio (Mo), manganês (Mn), níquel (Ni) e zinco (Zn).

Na Figura 18 verifica-se a conectividade desses elementos entre si, onde B, Mn, Ca, P, Fe, Zn e Mg tem correlação positiva, e, em sua maioria, apresentam maiores concentrações para os genótipos IAC 165 e Primavera (Tabela 11), demonstrando que a capacidade de alto acúmulo de metais é generalizada, e não específica para algum metal.

Nenhum desses elementos pode ser substituído e todos desempenham papéis fundamentais ao metabolismo da planta. Como exemplo, temos o Zn, que é necessário na formação da auxina e participa na estruturação de proteínas, ou o Cu que atua na respiração celular e fotossíntese. Já o Fe é um micronutriente que pode causar problemas por toxidez à cultura do arroz em sistema inundado, por ocorrência de aumento de sua disponibilidade, resultado da formação de Fe²⁺ através da redução do Fe³⁺ na presença de água (Dario; Dario, 2015).

A nicotianamina (NA), molécula metal-quelante, transporta o íons do floema para manter a homeostase dos metais na planta. Desempenha importante função no transporte de longe distância do Zn pelo floema da planta, até seus tecidos vegetativos, assim como auxilia na sua mobilização até o endosperma da semente (Waters; Sankaran, 2011; Duarte *et al.*, 2016). A ativação do gene de NA, OSNAs3, causa incremento de Fe, Cu e Zn em arrozeiro e em suas sementes, sugerindo que a presença do complexo NA+metais são requeridos pelos

transportadores para o transporte em direção ao seu armazenamento na semente (Iwai *et al.*, 2012).

A remobilização de micronutrientes da planta via floema, ocorre via transportadores de complexos NA-micronutriente, sendo chamado de YSL (*yellow stripe-like*), proteínas constituintes da família OPT (*oligopeptide transport*). Testes de expressão do gene YSL, e inibição via RNA interferente, permitiu identificar alterações nas concentrações para vários micronutrientes, como Zn, Fe e Cu, identificando que esses elementos compartilham desses transportadores de membrana, e formam complexos com NA, sendo transportados via esse sistema, a partir da parte aérea até a semente (Waters; Sankaran, 2011), o que explica a alta correlação entre micronutrientes encontrada em grãos integrais exibida na Figura 18.

De acordo com Waters e Sankaran (2011) a remobilização de nutrientes em plantas anuais tem destino principal a semente em desenvolvimento, e no caso individual do nitrogênio, a sua remobilização ocorre por ser a principal fonte dos componentes de proteína da semente. Os resultados obtidos para nitrogênio nesse experimento têm pouca variação dentro da faixa de significância para os genótipos, sendo apresentado os valores mínimos nas cultivares Carolino e Goiano com 14,47 e 14,57 g.kg⁻¹ de N, e o desempenho máximo de 16,17 g.kg⁻¹ de N em Talento (Tabela 12). Ao utilizar o método de Kjeldahl para conversão de valores de N em conteúdo de proteína (fator de conversão igual a 5,95 para arroz, devido a sua grande porcentagem de glutelinas), observa-se que a porcentagem representativa de proteína total, para a média dos genótipos, é igual a de 9,1% para cada grama de farinha de grão integral (Tabela 12). Esse valor é aproximado da faixa de 7,1-8,3% encontrado por Juliano e Bechtel (1985).

A adubação nitrogenada é um assunto amplamente estudado para a cultura de arroz (Hu-lin *et al.*, 2007; Shewry, 2007; Leesawatwong *et al.*, 2005; Gu *et al.*, 2015; Reis *et al.*, 2018), sendo o N um elemento importante para toda fase da planta, a prática da adubação reflete diretamente nos índices de produtividade, já que eleva a taxa fotossintética, mediante ao aumento da área foliar. Isso influi diretamente na obtenção e distribuição de energia na planta, aumentando fatores de produção, como aumento de perfilhos, número de panículas, número e peso de grãos (Dario; Dario, 2015).

A possível relação de aumento de proteína em resposta a adubação com N foi estudada em cereais como cevada e trigo (Shewry *et al.*, 2007), e muitas vezes é encontrada associação com aumento do conteúdo de Zn, no entanto esse efeito não foi detectado para arroz no atual experimento, em que é demonstrado na Figura 18 que o N e o Zn não possuem correlação.

Na semente o fosfato apresenta-se em abundância na forma de ácido fítico, e ao atuar quelando cátions metálicos passa a ser denominado de fitato (Zílio *et al.*, 2017). Ou seja, nada mais é que um complexo de armazenamento de cátions para a semente, que após o início da germinação vai sofrer hidrólise por fitases, afim de liberar os minerais para a plântula em formação (Iwai *et al.*, 2012). As concentrações de P não apresentaram diferenças significativas entre as cultivares (Tabela 11), porém sua correlação com fitato é positiva (Figura 18), indicando a participação e armazenamento de P na forma de fitato para as sementes de arroz também, já que o fitato é descrito como a principal forma de armazenamento de P em grãos e leguminosas (Zílio *et al.*, 2017).

O armazenamento do fitato no grão de arroz ocorre nos corpos proteicos tipo II, e geralmente é concentrado em inclusões esféricas chamadas globóides, que se encontram nas camadas externas da aleurona da semente. Além de fosfato, esses corpos esféricos podem atuar como armazenadores de outros elementos essenciais, como potássio e magnésio em grandes quantidades, assim como cálcio, manganês ferro e Zn em menores quantias (Coelho *et al.*, 2007; Iwai *et al.*, 2012). E essa correlação entre o fitato e os micronutrientes que os globóides podem armazenar, pode ser observada na Figura 18, havendo uma relação mais intimista entre estes nutriente e o fosfato em si.

Na pesquisa realizada por Iwai *et al.* (2012), para entender a distribuição de elementos durante o desenvolvimento da semente de arroz, observou-se que desde a formação do grão ocorre forte associação de P, Ca, K e Fe às camadas da aleurona, o que corrobora com as correlações exibidas na Figura 18. Já quando se trata de Cu, os resultados obtidos por Iwai *et al.* (2012) demonstraram que desde o desenvolvimento até o amadurecimento do grão, o elemento está em dissociação com P, sempre estando localizado em regiões diferentes do grão. Sendo direcionado rapidamente para o endosperma, sem formar complexos com fitato (Iwai *et al.*, 2012), o que corrobora o resultado apresentado na Figura 18, a qual apresenta ausência de correlação entre fitato e Cu, e que permite dizer que a correlação positiva observada entre Cu e S, indique um possível armazenamento de Cu através de peptídeos sulforosos, assim como relatado para Zn, quando presente na parte interna do endosperma (Iwai *et al.*, 2012).

Na Tabela 12 são apresentados as porcentagens de fitato no grão integral dos 16 genótipos estudados, na qual é observada variações significativas. Sendo que Filipino, Primavera e EPAGRI 109 (1,01; 1,00 e 1,00 % em 100 gramas de farinha de arroz intergral, respectivamente) concentram maiores quantidades de fitato em suas sementes, sendo os

menores valores apresentados para os genótipos Goiano e Talento (0,78 e 0,81 % em 100 gramas de farinha de arroz integral, respectivamente).

Apesar do fitato ser conhecido como agente antinutricional, ele também desenvolve funções positivas no organismo humano, como antioxidante e preventivo contra câncer (Coelho *et al.*, 2007). E além de sua interação com minerais, também tem alta correlação com proteínas, chegando a taxa de 0,73 para feijão (Zilio *et al.*, 2017).

Tabela 12. Porcentagens (p/p) de proteína total (obtida por método Kjeldahl) e fitato contidos em grão integral, de 16 genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.)

Genótipo	Proteína Total (% em g de farinha)	Fitato (% para 100 gramas de farinha)
Batatais	9,0 bcde	0,86 cd
Caravera	9,6 ab	0,97 abc
Carolino	8,6 e	0,89 abcd
Cateto Seda	8,8 de	0,86 bcd
Dourado Precoco	8,8 de	0,86 cd
Filipino	9,3 abcd	1,01 a
Goiano	8,7 e	0,78 d
IAC 165	9,5 abc	0,96 abc
IAC 25	8,9 cde	0,85 cd
Pampa	8,9 cde	0,89 abcd
Primavera	8,9 cde	1,00 ab
Sertaneja	9,0 cde	0,92 abcd
Talento	9,6 a	0,81 d
SCS 114	9,0 abcde	0,89 abcd
EPAGRI 109	9,2 abcde	1,00 ab
IRGA 417	9,2 abcde	0,96 abc
Média	9,1	0,90
CV (%)	3,89	9,10

Nota: dados foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$), sendo as médias comparadas pela Diferença Mínima Significativa (DMS) de Fisher ($p < 0,05$)

Proteínas de reserva são fontes de nitrogênio para germinação da semente, servindo também de fonte de nutrientes na alimentação humana. Representam porção considerável do total de proteínas contidas no grão, e sua composição de aminoácidos traduz a qualidade dele (Kawakatsu *et al.*, 2010). As concentrações para proteínas de reserva dos 16 genótipos estudados encontram-se na Tabela 13, onde se observa a diferença genotípica contida em cada material. Para a concentração total de proteínas de reserva Cateto Seda e Dourado Precoco, foram os genótipos que mais se destacaram positivamente, apresentando a quantia de 17,68 e 16,83 mg.mL⁻¹ de proteína, respectivamente. Esse resultado é reflexo de também possuírem maior quantidade de proteínas para todas as suas frações, não havendo no caso uma fração específica que beneficie o coeficiente total.

Tabela 13. Concentração das frações de proteínas de reserva de grão integral de dezesseis genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.), expresso em mg.mL⁻¹ e a proporção relativa em porcentagem (%)

Genótipos	Albumina		Globulina		Prolamina		Glutelina		Proteína total
	mg mL ⁻¹	%	mg mL ⁻¹	%	mg mL ⁻¹	%	mg mL ⁻¹	%	mg mL ⁻¹
Batatais	2,45 bc	15,96	4,00 ab	26,06	0,90 bcdef	5,86	8,00 a	52,12	15,35 abc
Caravera	1,82 cde	15,09	3,55 abc	29,44	0,98 abcde	8,13	5,71 a	47,35	12,06 cd
Carolino	2,62 ab	19,91	3,30 abcd	25,08	0,84 defg	6,38	6,43 a	48,86	13,16 bcd
Cateto Seda	2,55 ab	14,42	4,19 a	23,70	0,91 bcdef	5,15	10,06 a	56,90	17,68 a
Dourado Precoce	3,24 a	19,25	3,71 abc	22,04	1,16 a	6,89	8,73 a	51,87	16,83 ab
Filipino	1,25 ef	13,63	0,67 e	7,31	0,80 fg	8,72	6,45 a	70,34	9,172 d
Goiano	2,27 bcd	15,01	3,56 abc	23,54	0,86 cdefg	5,69	8,65 a	57,21	15,12 abc
IAC 165	2,49 bc	19,50	2,87 bcd	22,47	1,01 abcd	7,91	6,40 a	50,12	12,77 cd
IAC 25	2,47 bc	17,22	3,21 abcd	22,38	1,06 ab	7,39	7,60 a	53,00	14,34 abc
Pampa	1,55 def	12,88	2,81 cd	23,36	0,88 cdef	7,32	6,79 a	56,44	12,03 cd
Primavera	2,47 bc	18,99	3,39 abcd	26,06	1,02 abc	7,84	6,12 a	47,04	13,01 bcd
Sertaneja	2,18 bcd	15,34	3,79 abc	26,67	0,93 bcdef	6,54	7,16 a	50,39	14,21 abc
Talento	2,71 ab	19,30	3,56 abc	25,36	0,82 efg	5,84	6,94 a	49,43	14,04 abc
SCS 114	1,62 def	13,19	2,94 bcd	23,94	0,69 fg	5,62	7,03 a	57,25	12,28 cd
EPAGRI 109	1,00 f	8,69	2,26 d	19,64	0,81 efg	7,04	7,44 a	64,64	11,51 cd
IRGA 417	2,10 bcd	17,43	2,72 cd	22,57	0,86 cdefg	7,14	6,37 a	52,86	12,05 cd
Média	2,18		3,17		0,19		7,27		13,52
CV (%)	19,48		21,29		11,45		29,11		17,22

Nota: dados foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$), sendo as médias comparadas pela Diferença Mínima Significativa (DMS) de Fisher ($p < 0,05$)

O genótipo que teve a menor concentração de proteínas foi o Filipino ($9,17 \text{ mg.mL}^{-1}$), e apesar dos valores de glutelinas estarem equiparáveis às outras cultivares, suas demais frações puxam a tendência para baixo (Tabela 13). Esse material apresenta arista e intensa coloração de grãos acastanhada, indicando sua baixa domesticação em relação as demais cultivares modernas de arroz branco (Figuras 13 e 14). Deste modo, alguns metabólitos secundários podem estar interferindo na extração ou própria quantificação das proteínas do material, não sendo possível realizar géis de SDS para essa amostra, pois havia uma espécie de interação com o corante de prata, o que interferiu na adequada pigmentação. Assim como, não se descarta a possibilidade que esse material tenha menos proteínas de reserva em sua composição.

Outros seis genótipos apresentaram baixo rendimento em proteína de reserva total, média de $12,12 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Tabela 13), enquanto os sete genótipos restantes exibiram resultados intermediários, médias de $14,17 \text{ mg.mL}^{-1}$. Essas diferenças encontradas no teor de proteína no grão, determinado pela diversidade genética era esperado, e comprova a importância de explorar e caracterizar materiais em busca de aprimoramento da cultura. De acordo com Amagliani *et al.* (2017), o conteúdo de proteína também pode variar de acordo com outros fatores, como práticas culturais, clima e manejo da cultura.

Como apresentado anteriormente no tópico 4.1, a composição proteica depende das partes estruturais morfológicas do grão, ou seja, há uma variação esperada para grão integral, polido e farelo de arroz, nas proporções das porções das proteínas de reserva. Na revisão apresentada por Amagliani *et al.*, 2017, as porcentagens esperadas são as seguintes para albuminas (Alb), globulinas (Glo), prolaminas (Pro) e glutelinas (Glu), respectivamente:

- Arroz integral: 5-10% , 7-17% , 3-6% e 75-81%;
- Arroz Polido: 4-6% , 6-13% , 2-7% e 79-83%;
- Farelo de arroz: 24-43%, 13-36%, 1-5% e 22-45%

No presente trabalho, foi constatada uma variação na proporções acima citadas, principalmente para globulina e glutelina. Shewry e Halford (2002) descrevem em seu trabalho a existência de globulinas no endosperma, do tipo 11–12S, que segundo os autores é a maior classe de proteínas presente entre 70-80% da porção de proteínas de reserva no endosperma da semente de arroz.

Entretanto globulinas pertencente à família 11-12S são dificilmente extraídas com solução salina, e são eluídas juntamente com a porção de glutelinas, enviesando o resultado das proporções (Shewry, Halford, 2002). Assim sendo, devido a adaptação de protocolo que foi utilizado para esta pesquisa, talvez o rendimento da extração de globulinas tenha sido

otimizado, explicando a variação na proporção acima revisada. A íntima correlação positiva entre essas duas frações também pode ser observada na Figura 19, que também exibe a correlação extremamente positiva entre globulina e o conteúdo total de proteínas, indicando que ao se conseguir induzir a elevação de globulinas, aumentaria consideravelmente o teor total de proteínas, podendo ser um alvo de estudo de aprimoramento genético nesse sentido.

Os genótipos não apresentaram diferenças significativas nas concentrações de glutelina (Tabela 13), que representa a maior porção das proteínas de reserva, variando para este estudo entre 47-70% do total de proteínas quantificáveis. Esse tipo de proteína é constituída de 5% do aminoácido essencial lisina, alvo de estudo de melhoramento nutricional, e também possuem alta concentração de aminoácidos ricos em enxofre, como cisteína e metionina (Amagliani *et al.*, 2017).

O fato descrito acima torna o arroz o cereal mais balanceado nutricionalmente, por apresentar porções relevantes de aminoácidos essenciais, além de não possuir o glúten, proteína do trigo que causa reações alérgicas. Além disso, o arroz é um cereal, comumente consumido em forma de grão, e sua forma integral possui a vantagem nutricional de ser rico em fibras e micronutrientes, e ainda carrega maior teor proteico, pois é conservada a camada da aleurona e embrião, que são removidos no processo de polimento do grão para transformação em arroz branco. Esses componentes estruturais da semente atêm as frações de albumina e globulina das proteínas de reserva, ricas no aminoácido essencial lisina (Juliano, 1985; Lim *et al.*, 1999; Kawakatsu *et al.*, 2010).

Figura 19. Análise de componentes principais para 16 genótipos de arroz (1: Batatais; 2: Caravera; 3: Carolino; 4: Cateto Seda; 5: Dourado Precoce; 6: Filipino; 7: Goiano; 8: IAC 165; 9: IAC 25; 10: Pampa; 11: Primavera; 12: Sertaneja; 13: Talento; 14: SCS 114; 15: EPAGRI 109; 16: IRGA 417). Resultados obtidos para relação, entre conteúdo de proteínas de reserva total e suas frações (albumina, globulina, prolamina e glutelina), em função da concentração de Zn e fitato, em grão integral

Um fato que também contribui para o arroz ser diferenciado em qualidade nutricional é possuir menores porções de prolaminas, proteínas que apresentam as menores taxas de lisina em sua composição, e neste trabalho sua concentração variou entre 5-8% do total de proteínas solúveis, o que é uma vantagem em comparação a outros cereais, como milho, cevada e trigo (Juliano, 1985).

Quando se trata de lisina, a albumina é o tipo proteico nas quais as concentrações desse aminoácido são mais elevadas, seguida por glutelina, e posteriormente globulina (Juliano, 1985). Dessa forma, é desejável que genótipos tenham maiores concentrações de albuminas, e menores de prolamina, a fim de aumentar seu valor nutricional. O silenciamento gênico realizado para expressão de proteínas de reserva, mostrou que a diminuição da taxa de

prolamina 13 KDa eleva a concentração de lisina, por compensação na síntese de outras frações proteicas (Kawakatsu *et al.*, 2010). Seguindo esse padrão de resposta, temos os genótipos Carolino, Goiano e Talento, que apresentam valores maiores para albumina e globulina, e menores para prolamina (Tabela 13).

A análise de componentes principais revelou uma tendência de forte correlação entre prolamina e albumina em genótipos de arroz (Figura 19), de modo que para cada aumento de concentração identificado em uma fração, também deve ocorrer aumento na outra (similar para diminuição), não sendo, portanto um aspecto interessante em relação à seleção de variedades com alto teor de lisina, eliminando os genótipos Dourado Precoce e IAC 25. A análise mostrou ainda que o aumento nutricional de lisina pode ser alcançado pelo incremento de globulina nos grãos de arroz (Figura 19). O melhoramento visando ganho nutricional de aminoácidos em cereais não representa uma tarefa fácil, uma vez que as proteínas de reserva são controladas por famílias multigênicas, sendo demonstradas que poucas alterações na relação das frações e composição de seus aminoácidos foram alcançadas por meio de mutações nestes genes (Kawakatsu *et al.*, 2010).

Considerando os teores de aminoácidos livres pode-se afirmar que houve correlação entre o acúmulo de Zn e o incremento de aminoácidos como glutamato, serina, glicina, ácido aspártico, treonina e arginina (Figura 20). Ainda a partir dessa análise de componentes pode-se observar uma tendência de predileção pelos seguintes genótipos de arroz: Cateto Seda, IAC 25, Primavera e Sertaneja (Figura 20).

A composição do grão de arroz e de suas frações está sujeita a diferenças genotípicas, variações ambientais, de manejo, de processamento e de armazenamento (Zhou *et al.*, 2002), resultando em grãos com características nutricionais diferenciadas. Com relação à composição dos aminoácidos livres encontrados no grão integral de arroz, não foram detectadas diferenças entre os teores de aminoácidos livres totais (ALT) entre os genótipos. Por outro lado, nota-se um incremento claro nos teores de glutamato no genótipo Cateto Seda (Tabela 14). Autores relatam que dentre os aminoácidos livres encontrados em arroz, predominam aspartato e glutamato, que correspondem a aproximadamente 60% do total (Saikusa *et al.*, 1994). De modo similar observou-se aumento nos teores de treonina livre, especialmente no genótipo Batatais. Várias estratégias têm sido empregadas para aumentar o conteúdo de lisina e treonina em grãos de arroz (Jiang *et al.*, 2016). Geralmente, o conteúdo de aminoácidos essenciais em um organismo pode ser melhorado através do aumento de aminoácidos ligados a proteínas ou livres, embora os aminoácidos essenciais livres possam ser aumentados em cerca de 60 vezes em sementes de arroz (Long *et al.*, 2013) e, a gama de aminoácidos livre é

pequeno em comparação com os aminoácidos ligados a proteínas (Amir; Tabe, 2006), portanto, limitando a acumulação líquida de aminoácidos essenciais

Figura 20. Análise de componentes principais para dezesseis genótipos de arroz (1: Batatais; 2: Caravera; 3: Carolino; 4: Cateto Seda; 5: Dourado Precoces; 6: Filipino; 7: Goiano; 8: IAC 165; 9: IAC 25; 10: Pampa; 11: Primavera; 12: Sertaneja; 13: Talento; 14: SCS 114; 15: EPAGRI 109; 16: IRGA 417). Resultado obtido para relação de aminoácido livre e zinco (Zn) em grão integral

Tabela 14. Composição de aminoácidos livres de grão integral de dezesseis genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.). ALT (Aminoácidos livres totais) expresso em μmol^{-1} . g de farinha, e aminoácidos individuais expresso em mg de AA $^{-1}$ g de farinha

Genótipo	ALT	His	Ser	Arg	Gly	Asp	Glu	Thr	Ala	Pro	Cys	Lys	Tyr	Met	Val	Ile	Leu
Batatais	1,30 a	0,42 a	8,82 a	4,32 a	2,01 a	6,32 a	20,32 cdefg	10,94 a	8,42 a	4,14 a	0,18 a	1,44 a	5,76 a	1,46 a	5,97 a	3,14 a	3,31 a
Caravera	1,15 a	0,39 a	14,01 a	5,59 a	2,43 a	8,75 a	35,22 ab	8,38 ab	9,67 a	2,95 a	0,28 a	1,14 a	4,69 a	0,84 a	4,46 a	2,22 a	2,11 a
Carolino	2,21 a	2,18 a	12,00 a	8,62 a	4,55 a	8,56 a	29,69 bcde	8,28 ab	27,13 a	9,69 a	0,31 a	2,69 a	8,06 a	1,11 a	11,03 a	5,89 a	5,86 a
Cateto Seda	1,88 a	0,96 a	16,46 a	9,43 a	5,33 a	11,75 a	47,05 a	6,70 abc	12,20 a	4,50 a	0,37 a	1,34 a	6,06 a	1,49 a	7,76 a	4,59 a	2,96 a
Dourado Precoce	1,48 a	0,92 a	8,96 a	5,76 a	2,55 a	7,11 a	31,52 bcd	6,48 abc	13,04 a	4,40 a	0,30 a	1,19 a	5,34 a	1,47 a	5,04 a	2,23 a	2,76 a
Filipino	1,20 a	-	6,82 a	1,47 a	1,01 a	5,53 a	15,31 fg	5,87 bc	8,38 a	4,78 a	-	1,10 a	6,23 a	1,42 a	5,70 a	3,34 a	3,70 a
Goiano	2,06 a	1,07 a	8,78 a	4,77 a	2,58 a	8,36 a	19,23 defg	5,32 bc	17,70 a	6,15 a	-	1,79 a	7,95 a	1,70 a	8,30 a	4,75 a	4,78 a
IAC 165	1,81 a	1,59 a	17,38 a	6,33 a	3,01 a	8,95 a	26,13 bcdefg	4,2 bc	7,98 a	6,63 a	0,37 a	1,36 a	6,43 a	1,93 a	4,53 a	2,11 a	2,15 a
IAC 25	1,71 a	1,29 a	10,01 a	6,40 a	3,96 a	10,75 a	34,19 abc	4,19 bc	12,48 a	6,32 a	0,28 a	1,75 a	6,35 a	NA	6,46 a	2,62 a	3,01 a
Pampa	1,86 a	1,01 a	7,79 a	5,75 a	3,64 a	11,76 a	21,11 cdefg	3,96 bc	14,12 a	5,88 a	-	1,85 a	5,68 a	1,69 a	7,56 a	3,06 a	4,16 a
Primavera	1,90 a	0,94 a	13,75 a	7,92 a	2,82 a	10,91 a	28,00 bcdef	3,78 bc	9,47 a	6,24 a	0,32 a	1,52 a	6,94 a	0,82 a	7,15 a	2,64 a	3,46 a
Sertaneja	2,28 a	1,34 a	23,51 a	9,17 a	3,19 a	13,84 a	29,21 bcdef	3,54 c	16,57 a	7,26 a	-	2,12 a	7,46 a	1,00 a	9,74 a	4,12 a	5,04 a
Talento	1,64 a	0,54 a	9,42 a	6,33 a	2,31 a	5,54 a	26,11 bcdefg	3,33 c	7,58 a	4,65 a	-	1,19 a	4,12 a	1,57 a	4,92 a	2,42 a	1,55 a
SCS 114	1,15 a	0,72 a	8,40 a	3,89 a	1,99 a	7,46 a	12,33 g	3,18 c	6,56 a	3,33 a	0,27 a	0,94 a	2,24 a	1,34 a	5,05 a	2,85 a	1,98 a
EPAGRI 109	1,28 a	1,14 a	6,47 a	5,50 a	2,15 a	12,53 a	16,95 efg	3,12 c	6,04 a	3,78 a	-	1,54 a	3,26 a	0,95 a	5,44 a	2,29 a	2,58 a
IRGA 417	2,03 a	1,48 a	10,80 a	8,41 a	3,32 a	6,32 a	24,50 bcdefg	2,93 c	12,35 a	6,01 a	-	2,26 a	7,11 a	1,31 a	9,08 a	3,72 a	4,79 a
Média	1,69	1,06	11,27	6,28	2,95	9,11	26,35	5,29	12,05	5,44	0,30	1,60	5,92	1,29	6,85	3,28	3,45
CV (%)	35,43	59,08	55,27	44,67	53,58	40,56	31,01	50,60	89,74	59,51	40,11	63,02	53,62	36,18	58,81	68,75	77,35

Nota: dados foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$), sendo as médias comparadas pela Diferença Mínima Significativa (DMS) de Fisher ($p < 0,05$)

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O primeiro experimento, realizado com cultivo em vaso dos genótipos Cateto Seda, Primavera e Sertaneja, demonstrou que a adubação foliar de Zn só proporcionou aumento significativo do elemento em folhas, não ocorrendo transporte proporcional para os grãos, além de que não houve diferença na concentração de Zn e proteínas de reserva total inerente aos genótipos, independente do tratamento por Zn. No entanto, foram detectadas diferenças significativas entre grãos em sua forma integral e polido, em relação ao total de proteínas de reserva e concentração de fitato, indicando que para grão integral o mais indicado ao consumo humano em questão de qualidade nutricional é o genótipo Primavera, mas em forma polida o genótipo Cateto Seda tem vantagens sobre as características citadas, além de possuir menor fração de prolamina, auxiliando no aumento da concentração do aminoácido lisina. Já para o metabolismo de lisina, fica evidente a variabilidade de isoenzimas para as três cultivares estudadas, e a importância da regulação das enzimas ligadas ao catabolismo para aumento do teor de lisina no grão.

Com o segundo experimento analisou-se 16 genótipos em cultivo de campo, o qual demonstrou que o cultivo em vaso aparentemente limita a absorção e transporte de Zn para grãos, o que demonstra que mais fatores além das disponibilidade do elemento influenciam na concentração final de Zn em grãos, fazendo-se comparativo os valores obtidos para as três cultivares utilizadas no experimento I.

Todos os 16 genótipos estudados apresentaram pequenas variações nas características estudadas, porém algumas se mantiveram as mesmas, como a glulielina ser a principal fração proteica de reserva, mesma concentração para ATL e para a maioria dos aminoácidos livres, incluindo lisina. As variações se apresentaram nos grãos integrais para a concentração de Zn e total de proteína de reserva e porcentagem de fitato, que permite apresentar as cultivares Carolino e Goiano com os melhores desempenhos para essas características nutricionais. Não obstante, pode-se concluir que o conteúdo de lisina pode ser mais facilmente modulado pelo aumento da fração globulina, já que albumina e prolamina possuem correlação positiva. Observou-se também correlação positiva para Zn e outros nutrientes (P, Ca, K, Fe), porém não foi detectada relação direta desse elemento com a concentração de proteínas e lisina em grão.

Por último, ficou claro a importância da camada da aleurona do grão, já que retém majoritariamente todas as características nutricionais importantes, para um projeto de biofortificação, indicando que estudos devem ser intensificados para entender o transporte de

nutrientes até o interior do endosperma, ou ainda, que o consumo de arroz integral deve ser mais reforçado.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. G.; OLIVEIRA, J. P. Botânica e desenvolvimento fenológico da planta. In: BORÉM, A.; RANGEL, P. H. N. (Org.). **Arroz: do Plantio à Colheita**. 1ed. Viçosa: Editora UFV, v. 1, p. 27-42, 2015.
- ALVES, S. J. F.; PASCOALINO, J. A. L.; MORAES, M. F.; CARVALHO, J. L. V. de; NEVES, P. de C. F. Biofortificação com zinco em arroz de terras altas. **V Reunião de Biofortificação no Brasil**, p. 21-23, 2015. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/arroz-e-feijao/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1027413/biofortificacao-com-zinco-em-arroz-de-terras-altas>>. Acesso em: 01 fev 2018.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331–1341, 15 maio 2002.
- AMAGLIANI, L., O'REGAN, J., KELLY, A.L., O'MAHONY, J.A., The composition, extraction, functionality and applications of rice proteins: a review, **Trends in Food Science & Technology**, v. 64, p. 1-12, 2017.
- AMIR, R.; TABE, L. Molecular approaches to improving plant methionine content. In Pawan, K. J., Jaiwal, K. & Rana, P. S. eds, plant genetic engineering: metabolic engineering and molecular farming ii. Studium Press LLC, Houston, v.8. p. 1–26, 2006.
- ARRUDA, P. *et al.* Regulation of lysine catabolism in higher plants. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 8, p. 324–330, 2000.
- AZEVEDO, R. A; LANCIEN, M.; LEA, P. J. The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. **Amino acids**, v. 30, n. 2, p. 143–62, mar. 2006.
- AZEVEDO, R. A. Analysis of the aspartic acid metabolic pathway using Review Article. **Amino Acids**, v. 22, p. 217–230, 2002.
- AZEVEDO, R. A. *et al.* Regulation of maize lysine metabolism and endosperm protein synthesis by opaque and floury mutations. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 4898–4908, 2003.
- AZEVEDO, R. A.; LEA, P. J. Lysine metabolism in higher plants Review Article. **Amino acids**, v. 20, p. 261–279, 2001.
- AZEVEDO, R. A.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Aspartate kinase regulation in maize: Evidence for co-purification of threonine-sensitive aspartate kinase and homoserine dehydrogenase. **Phytochemistry**, v. 31, n. 11, p. 3731–3734, 1992.
- BAILEY, C.H. A translation of Beccari's lecture 'Concerning Grain' (1728), **Cereal Chemistry**, v. 18, p. 555-561, 1941

BASHIR, K. *et al.* The road to micronutrient biofortification of rice: progress and prospects. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 15, 2013.

BEAN, S. R.; LOOKHART, G. L. Electrophoresis of cereal storage proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1-2, p. 23–36, 2000.

BHULLAR, N. K.; GRUISSEM, W. Nutritional enhancement of rice for human health: the contribution of biotechnology. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 1, p. 50–7, 2013.

BLACK, S.; WRIGHT, N., Aspartic beta-semialdehyde dehydrogenase and aspartic beta-semialdehyde. **The Journal of Biological Chemistry**, n.213, p. 39–50, 1955.

BOONCHUAY, P. *et al.* Effect of different foliar zinc application at different growth stages on seed zinc concentration and its impact on seedling vigor in rice. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 59, n. 2, p. 180–188, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 1976.

BRENNECKE, K. *et al.* Aspartate kinase in the maize mutants ASK1-LT19 and OPAQUE-2. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 707–712, 1996.

CAKMAK, I. Tansley Review No.111: Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. **New Phytologist**, v. 146, n. 111, p. 185–205, 2000.

CAKMAK, I. Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification? **Plant and Soil**, v. 302, n. 1-2, p. 1–17, 2008.

CAKMAK, I. Biofortification of cereals with zinc and iron through fertilization strategy. v. 2, n. 3, p. 5–7, 2010.

CAKMAK, I.; KUTMAN, U. B. Agronomic biofortification of cereals with zinc: A review. **European Journal of Soil Science**, p. 172–180, 2017.

CAKMAK, I.; MCLAUGHLIN, M. J.; WHITE, P. Zinc for better crop production and human health. **Plant and Soil**, v. 411, n. 1-2, p. 1–4, 2017.

CASARIN, V.; PROCHNOW, L. I.; STIPP, S. R. Adubação foliar em arroz irrigado: bases fisiológicas e eficiência. Disponível em: <http://cbai2013.web2265.uni5.net/docs/cbai2013_palestra_prochnow_casarin.pdf>. Acesso em: 28 fev. 2018.

COELHO, C. M. M. *et al.* Variation in the enzyme activity and gene expression of myo-inositol-3-phosphate synthase and phytate accumulation during seed development in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 29, n. 3, p. 265–271, 2007.

DARIO, G. J. A.; DARIO, I. S. N. Adubação e correção da acidez. Arroz: do plantio à colheita, In: BORÉM, A.; RANGEL, P. H. N. (Org.). **Arroz: do Plantio à Colheita**. 1ed. Viçosa: Editora UFV, v. 1, p.122-134, 2015.

DIPTI, S. S. *et al.* The potential of rice to offer solutions for malnutrition and chronic diseases. **Rice (New York, N.Y.)**, v. 5, n. 1, p. 16, 2012.

DOROSHENK, K.A.; TIAN, L.; CROFTS, A.J.; KUMAMARU, T.; OKITA, T.W. Characterization of RNA binding protein RBP-P reveals a possible role in rice glutelin gene expression and RNA localization. **Plant Molecular Biology**. v. 85, p. 381–394, 2014

DUARTE, R. F. *et al.* Determination of zinc in rice grains using DTZ staining and ImageJ software. **Journal of Cereal Science**, v. 68, p. 53–58, 2016.

ERENOGLU, A. B. *et al.* differing in zinc efficiency Uptake and transport of foliar applied wheat cultivars differing in zinc efficiency in bread and durum. v. 241, n. 2, p. 251–257, 2015.

ESEN, A. A proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (zeins) of maize (*Zea mays* L.). **Journal of Cereal Science** v. 5, n.2, p. 117-128, 1987.

FAGERIA, N. K *et al.* Árvore do Conhecimento. Arroz: Fertilização do solo. AGEITEC - Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fessmgy502wx5eo0y53mhyvcjcebf.html#>>. Acesso em: 27 jun. 2018.

FAGERIA, N. K. Screening method of lowland rice genotypes for zinc uptake efficiency. **Scientia Agricola**, v. 58, p. 623-626, 2001.

GAZIOLA, S. A. *et al.* The enzymology of lysine catabolism in rice seeds Isolation , characterization , and regulatory properties of a Lysine 2-Oxoglutarate Reductase/Saccharopine Dehydrogenase Bifunctional Polypeptide. **European Journal of Biochemistry**. v. 247, p. 364–371, 1997.

GAZIOLA, S. A. *et al.* Quality Protein Maize : A Biochemical Study of Enzymes Involved in Lysine Metabolism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 1268–1275, 1999.

GU, J. *et al.* Grain quality changes and responses to nitrogen fertilizer of japonica rice cultivars released in the Yangtze River Basin from the 1950s to 2000s. **Crop Journal**, v. 3, n. 4, p. 285–297, 2015.

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, n. 3, p. 259–266, 2009.

Harvest Zinc Fertilizer Project. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=DFyRmAxZnys>>. Acesso em: 13 fev. 2018

HÉDIJI, H. *et al.* Effects of long-term cadmium exposure on growth and metabolomic profile of tomato plants. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 73, n. 8, p. 1965–74, nov. 2010.

HENRIQUES, A. R.; CHALFUN-JUNIOR, A.; AARTS, M. Strategies to increase zinc deficiency tolerance and homeostasis in plants. v. 24, n. 1, p. 3–8, 2012.

HILDEBRANDT, T. M. *et al.* Amino Acid Catabolism in Plants. **Molecular plant**, v. 8, n. 11, p. 1563–79, 2015.

HU-LIN, H. A. O. *et al.* Effects of Different Nitrogen Fertilizer Levels on Fe , Mn , Cu and Zn Concentrations in Shoot and Grain Quality in Rice (*Oryza sativa*). v. 14, n. 4, p. 289–294, 2007.

ISHIMARU, Y.; BASHIR, K.; NISHIZAWA, N. K. Zn Uptake and Translocation in Rice Plants. **Rice**, v. 4, n. 1, p. 21–27, 2011.

IWAI, T. *et al.* Dynamic Changes in the Distribution of Minerals in Relation to Phytic Acid Accumulation during Rice Seed Development. **Plant Physiology**, v. 160, n. 4, p. 2007–2014, 2012.

JIANG, S.-Y. *et al.* Improving protein content and quality by over-expressing artificially synthetic fusion proteins with high lysine and threonine constituent in rice plants. **Scientific Reports** v. 6, n. 34427, p. 1-14, 2016.

JOHNSON-BEEBOUT, S. E. *et al.* Zn uptake behavior of rice genotypes and its implication on grain Zn biofortification. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–13, 2016.

JULIANO, B. O. Rice properties and processing. **Food Reviews International**, v. 1, n. 3, p. 423–445, 1985.

JULIANO, B.O. Rice: Overview. In: Wrigley, C., Corke, H., and Seetharaman, K., Faubion, J., (eds.) **Encyclopedia of Food Grains**. Oxford: Academic Press. v. 1, p. 125-129, 2016.

JULIANO, B.O.; BECHTEL, D.B. The rice grain and its gross composition. In: JULIANO, B.O. (Ed.). *Rice: chemistry and technology*. Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, Cap.2, p.17-57, 1985.

KAWAKATSU, T. *et al.* Reducing Rice Seed Storage Protein Accumulation Leads to Changes in Nutrient Quality and Storage Organelle Formation. **Plant Physiology**, v. 154, n. 4, p. 1842–1854, 2010.

KEHRER, J. P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, n. 1, p. 43-50, 2000.

KIM, H.-J. *et al.* Effects of Reduced Prolamin on Seed Storage Protein Composition and the Nutritional Quality of Rice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 8, p. 17073–17084, 2013.

KRÄMER, U.; CLEMENS, S. Functions and homeostasis of zinc , copper , and nickel in plants. v. 14, 2005.

KRISHNAN, H.B.; WHITE, J.A. Morphometric analysis of rice seed protein bodies: implication for a significant contribution of prolamine to the total protein content of rice endosperm. **Plant Physiology**, v.109, p.1491-1495, 1995.

LANDERS, P. S.; HAMAKER, B. R.. Antigenic properties of albumin, globulin, and protein-concentrate fractions from rice bran. **Cereal Chemistry**, v. 71, n. 5, p. 409–411, 1994.

LANDRY, J.; DELHAYE, S.; DAMERVAL, C. Improved method for isolating and quantitating R-amino nitrogen as nonprotein, true protein, salt-soluble proteins, zeins, and true glutelins in maize endosperm. **Cereal Chemistry**, v.77, p.620-626, 2000.

LATTA, M.; ESKIN, M. A Simple and Rapid Colorimetric Method for Phytate Determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1313–1315, 1980.

LEE, H. J. *et al.* Lack of globulin synthesis during seed development alters accumulation of seed storage proteins in rice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 14717–14736, 2015.

LEESAWATWONG, M. *et al.* Nitrogen fertilizer increases seed protein and milling quality of rice. **Cereal Chemistry**, v. 82, n. 5, p. 588–593, 2005.

LIM, S.-T. *et al.* Comparison of Protein Extraction Solutions for Rice Starch Isolation and Effects of Residual Protein Content on Starch Pasting Properties. **Starch - Stärke**, v. 51, n. 4, p. 120–125, 1999.

LONG, X., LIU, Q., CHAN, M., WANG, Q. & SUN, S. S. Metabolic engineering and profiling of rice with increased lysine. **Plant Biotechnology**. J. 11, 490–501, 2013.

LOPEZ G., O.E.; MALAVOLTA, E. Estudos sobre as relações entre zinco e fósforo na nutrição da planta. **Anais da ESALQ**, Piracicaba, v. 31, p. 467-483, 1974.

MACRITCHIE, F. IN: KINSELLA, J.E. (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research*, Academic Press, San Diego, CA, p. 1, 1992.

MAGALHAES JUNIOR, A. M. de; MORAIS, O. P. de; FAGUNDES, P. R. R.; MOURA NETO, F. P.; FRANCO, D. F.; NEVES, P. de C. F.; NUNES, C. D. M.; RANGEL, P. H. N.; PETRINI, J. A.; SEVERO, A. C. M. BRS Pampa: cultivar de arroz irrigado de alta produtividade e excelência na qualidade de grãos. **Comunicado Técnico 282**, EMBRAPA, Pelotas, RS, p. 1-8, 2012. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/953787/brs-pampa-cultivar-de-arroz-irrigado-de-alta-produtividade-e-excelencia-na-qualidade-de-graos>>. Acesso em: 01 mar 2018.

MALAVOLTA, E. Elementos de nutrição de plantas. São Paulo, SP: Agrômica Ceres, p. 251, 1980.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, p. 319, 1997.

MEDICI, L. O.; NAZARENO, A. C.; GAZIOLA, S. A.; SCHMIDT, D.; AZEVEDO, R. A. Lysine metabolism.. In: D'Mello, J. P. F. (Org.). **Amino acids in higher plants**. 1ed. CABI, v. 1 , p. 234-250, 2015.

MOLINA, S.M.G. ; GAZIOLA, S.A. ; LEA, P.J. ; AZEVEDO, R. A. Manipulação de cereais para acúmulo de lisina em sementes. **Scientia Agricola**, v. 58, p. 205-211, 2001.

MOUSAVI, S. R.; GALAVI, M.; REZAEI, M. Zinc (Zn) Importance for Crop Production – A Review. **International Journal of Agronomy and Plant Production**. v. 4, n. 1, p. 64–68, 2013.

NAGAMINE, A.; MATSUSAKA, H.; USHIJIMA, T.; KAWAGOE, Y.; OGAWA, M.; OKITA, T.W.; KUMAMARU, T. A role for the cysteine-rich 10 kDa prolamin in protein body I formation in rice. **Plant Cell Physiology**. v. 52, p. 1003–1016, 2011.

NEVES, P. de C. F.; PEREIRA, J. A.; BASSINELLO, P. Z.; CARVALHO, J. L. V. de; MATSUSHIGE, I.; MORAIS NETO, O. P. de. Variação no teor de zinco em grão polido na população recorrente de arroz Biofort 1. IX Congresso brasileiro de arroz irrigado, 2015. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1022876/variacao-no-teor-de-zinco-em-grao-polido-na-populacao-recorrente-de-arroz-biofort-1>>. Acesso em: 01 fev 2018.

OGAWA, M.; KUMAMARU, T.; SATOH, H.; IWATA, N.; OMURA, T.; KASAI, Z.; TANAKA, K. Purification of protein body-I of rice seed and its polypeptide composition. **Plant Cell Physiol**. v. 28, p. 1517–1527, 1987.

OLIVEIRA, S. C. DE *et al.* Resposta de duas cultivares de arroz a doses de zinco aplicado como oxissulfato. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 387–396, 2003.

OSBORNE, T.B. The Proteins of the Wheat Kernel, Carnegie 4. Conclusions Institute, Washington, DC, 1909.

PALMGREN, M. G. *et al.* Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. **Trends in plant science**, v. 13, n. 9, p. 464–73, 2008.

PHATTARAKUL, N. *et al.* Biofortification of rice grain with zinc through zinc fertilization in different countries. **Plant and Soil**, v. 361, n. 1-2, p. 131–141, 2012.

PRAKASH J.; RAMASWAMY H. S. Rice bran proteins: Properties and food uses, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 36:6, 537-552. 1996.

QU, L.Q.; TAKAIWA, F. Evaluation of tissue specificity and expression strength of rice seed component gene promoters in transgenic rice. **Plant Biotechnol. J.** v. 2, p. 113–125, 2004.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A; FURLANI, A.M.C. Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo. **Boletim Técnico 100**. 2 ed. Campinas: Instituto Agrônômico (IAC). 1996.

RASMUSSEN, S. K.; INGVARSEN, C. R.; TORP, A. M. Mutations in genes controlling the biosynthesis and accumulation of inositol phosphates in seeds. **Biochemical Society Transactions**, v. 38, n. 2, p. 689–694, 2010.

REHMAN, H. *et al.* Zinc nutrition in rice production systems: a review. **Plant and Soil**, v. 361, n. 1-2, p. 203–226, 2012.

REIS, H. P. G. *et al.* Agronomic biofortification of upland rice with selenium and nitrogen and its relation to grain quality. **Journal of Cereal Science**, v. 79, p. 508–515, 2018.

SADEGHZADEH, B. A review of zinc nutrition and plant breeding. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 13, n.4, p. 905-927, 2013.

SAIKUSA, T. *et al.* Distribution of free amino acids in the rice kernel and kernel fractions and the effect of water soaking on the distribution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.1122-1125, 1994.

SANTOS, K. F. D. N. *et al.* Storage protein profile and amino acid content in wild rice *Oryza glumaepatula*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 1, p. 66–72, 2013.

SCHMIDT, D. *et al.* Lysine metabolism in antisense C-hordein barley grains. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 87, p. 73–83, 2015.

SCHMIDT, D. *et al.* Proteomic analysis of mature barley grains from C-hordein antisense lines. **Phytochemistry**, v. 125, p. 14-26, 2016.

SHAUL, O.; GALILI, G. Increased lysine synthesis in transgenic tobacco plants expressing a bacterial dihydrodipicolinate synthase in their chloroplasts. **Plant Journal**, v.2, p.203-209, 1992.

SHEWRY, P.R., A.S. TATHAM, J. FORDE, M. KREIS, B.J. MIFLIN. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins:a reassessment. **Journal Cereal Science**, v. 4, p. 97-106, 1986.

SHEWRY, P.; HALFORD, N. Cereal seed storage proteins: structure, properties and role in grain utilization. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 370, p. 947– 958, 2002.

SHEWRY, P. R. Improving the protein content and composition of cereal grain. **Journal of Cereal Science**, v. 46, n. 3, p. 239–250, 2007.

SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 370, p. 947–958, 2015.

SILVEIRA, R. D. D. *et al.* Proteínas de reserva de acessos de coleção nuclear de arroz. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 45, n. 12, p. 1441–1447, 2010.

SUZUKI, M. *et al.* Accumulation of starch in Zn-deficient rice. **Rice**. v. 5.,n. 9, p. 1–8, 2012.

SWAMY, B. P. M. *et al.* Advances in breeding for high grain Zinc in Rice. **Rice**, v. 9, n. 49, p. 1-16, 2016.

TERRA, T. G. R. *et al.* Características de tolerância à seca em genótipos de uma coleção nuclear de arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 9, p. 788–796, 2015.

TEIXEIRA, C. M. G.; GAZIOLA, S. A.; LUGLI, J. ; AZEVEDO, R. A. Isolation, partial purification and characterization of isoenzymes of aspartate kinase from rice seeds. **Journal of Plant Physiology**, v. 153, p. 281-289, 1998.

TSUJIMOTO, M. *et al.* Aspartate kinase involved in 4-hydroxy-3-nitrosobenzamide biosynthesis in *Streptomyces murayamaensis*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.80, n. 11, p. 2255-2263, 2016.

WALLSGROVE, R.M.; MAZELIS, M. Spinach leaf dihydrodipicolinate synthase - partial-purification and characterization. **Phytochemistry**, v.20, p.2651-2655, 1981.

WATERS, B. M.; SANKARAN, R. P. Moving micronutrients from the soil to the seeds: genes and physiological processes from a biofortification perspective. **Plant science : an international journal of experimental plant biology**, v. 180, n. 4, p. 562–74, 2011.

WEI, Y.; SHOHAG, M. J. I.; YANG, X. Biofortification and bioavailability of rice grain zinc as affected by different forms of foliar zinc fertilization. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e45428, 2012.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortifying crops with essential mineral elements. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 12, p. 586–593, 2005.

YANG, X. *et al.* Genotypic differences in concentrations of iron, manganese, copper, and zinc in polished rice grains. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, n. 7, p. 1453–1462, 2008.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C.; RICKETTS, R. E. The determination of amino-acids with ninhydrin. **The Analyst**, v. 80, n. 948, p. 209, 1955.

YOON, U.H.; LEE, J.; LEE, G.S.; KIM, Y.M.; HAHN, J.H.; JI, H.S.; YOON, S.W.; LEE, J.Y.; KIM, T.H. Current status of structural and expression analysis of seed storage protein genes in japonica rice. **Journal of the Korean Society of International Agriculture**, v. 24, n. 3, p. 369–379, 2012

ZHOU, Z. *et al.* Composition and functional properties of rice. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 8, p. 849–868, 2002.

ZÍLIO, M.; SOUZA, C. A.; COELHO, C. M. M. Phenotypic diversity of nutrients and anti-nutrients in bean grains grown in different locations. **Revista brasileira de ciências agrárias**, v. 12, p. 526-534, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Correlação proteínas de reserva e fitato em grãos integrais de arroz, experimento I

	albumina	globulina	prolamina	glutelina	prot_total	fitato
albumina	-	0,69	0,39	0,44	0,31	0,62
globulina	0,47	-	0,29	0,24	0,38	0,06
prolamina	-0,81	-0,9	-	0,05	0,09	0,23
glutelina	-0,77	-0,93	<u>1,00</u>	-	0,14	0,18
prot_total	-0,89	-0,83	0,99	0,98	-	0,32
fitato	0,56	<u>1,00</u>	-0,94	-0,96	-0,88	-

APÊNDICE B. Correlação proteínas de reserva e fitato em grãos polidos, experimento I

	albumina	globulina	prolamina	glutelina	prot_total	fitato
albumina	-	0,68	0,17	0,90	0,95	0,65
globulina	-0,48	-	0,85	0,42	0,27	0,67
prolamina	0,96	-0,23	-	0,73	0,88	0,48
glutelina	-0,16	-0,79	-0,41	-	0,15	0,25
prot_total	0,08	-0,91	-0,19	0,97	-	0,40
fitato	0,52	0,50	0,73	-0,93	-0,81	-

APÊNDICE C. Correlação enzimas da via do ácido aspártico e do catabolismo de lisina, em relação aos aminoácidos livres extraídos de grãos integrais de arroz (lisina, metionina isoleucina e treonina), experimento I

	AK_cont rol	AK_Lys	AK_thr	AK_Lys_ Thr	HSDH_c ontrol	HSDH_T hr	LOR	SDH	DHDPS_ control	DHDPS_ Lys1	DHDPS_ Lys5	DHDPS_ AEC5	Thr_gi	Lys_gi	Met_gi	Ile_gi
AK_control	-	0,14	0,03	0,49	0,70	0,79	0,62	0,16	0,59	0,49	0,54	0,08	0,53	0,90	0,97	0,47
AK_Lys	-0,98	-	0,17	0,35	0,84	0,93	0,76	0,29	0,72	0,63	0,68	0,22	0,67	0,76	0,89	0,33
AK_Thr	<u>1,00</u>	-0,96	-	0,52	0,66	0,76	0,58	0,12	0,55	0,46	0,51	0,05	0,50	0,93	0,93	0,51
AK_Lys_Thr	0,72	-0,85	0,68	-	0,82	0,72	0,90	0,64	0,93	0,98	0,97	0,57	0,98	0,41	0,55	0,01
HSDH_contr ol	0,46	-0,25	0,50	-0,28	-	0,09	0,08	0,54	0,11	0,21	0,15	0,62	0,16	0,40	0,27	0,83
HSDH_thr	0,32	-0,11	0,37	-0,42	0,99	-	0,17	0,64	0,21	0,30	0,25	0,71	0,26	0,31	0,18	0,74
LOR	0,56	-0,37	0,61	-0,16	0,99	0,96	-	0,46	0,03	0,13	0,08	0,54	0,08	0,48	0,35	0,91
SDH	-0,97	0,90	-0,98	-0,53	-0,66	-0,54	-0,75	-	0,43	0,34	0,39	0,07	0,38	0,94	0,81	0,63
DHDPS_cont rol	0,60	-0,42	0,65	-0,11	0,98	0,95	<u>1,00</u>	-0,78	-	0,10	0,04	0,50	0,05	0,51	0,38	0,94
DHDPS_Lys 1	0,72	-0,55	0,75	0,04	0,95	0,89	0,98	-0,86	0,99	-	0,05	0,41	0,04	0,61	0,48	0,96
DHDPS_Lys 5	0,66	-0,48	0,70	-0,05	0,97	0,92	0,99	-0,82	<u>1,00</u>	<u>1,00</u>	-	0,46	0,01	0,56	0,42	0,98
DHDPS_AE C5	0,99	-0,94	<u>1,00</u>	0,63	0,57	0,44	0,67	-0,99	0,70	0,80	0,75	-	0,45	0,98	0,89	0,55
Thr_gi	-0,67	0,49	-0,71	0,03	-0,97	-0,92	-0,99	0,83	<u>-1,00</u>	<u>-1,00</u>	<u>-1,00</u>	-0,76	-	0,57	0,43	0,99
Lys_gi	-0,16	0,37	-0,10	-0,80	0,81	0,89	0,73	-0,09	0,69	0,58	0,64	-0,03	-0,63	-	0,13	0,43
Met_gi	0,05	0,17	0,10	-0,65	0,91	0,96	0,85	-0,29	0,83	0,73	0,79	0,18	-0,78	0,98	-	0,56
Ile_gi	0,74	-0,87	0,70	<u>1,00</u>	-0,26	-0,40	-0,14	-0,55	-0,09	0,06	-0,02	0,64	0,01	-0,78	-0,64	-

APÊNDICE D. Correlação enzimas da via do ácido aspártico e do catabolismo de lisina, em relação aos aminoácidos livres extraídos de grãos polidos de arroz (lisina, metionina isoleucina e treonina), experimento I

	AK_cont rol	AK_Lys	AK_thr	AK_Lys_ Thr	HSDH_c ontrol	HSDH_T hr	LOR	SDH	DHDPS_ control	DHDPS_ Lys1	DHDPS_ Lys5	DHDPS_ AEC5	Thr_gi	Lys_gi	Met_gi	Ile_gi
AK_control	-	0,14	0,03	0,49	0,7	0,79	0,62	0,16	0,59	0,49	0,54	0,08	0,08	0,03	0,46	0,52
AK_Lys	-0,98	-	0,17	0,35	0,84	0,93	0,76	0,29	0,72	0,63	0,68	0,22	0,22	0,11	0,32	0,66
AK_Thr	1,00	-0,96	-	0,52	0,66	0,76	0,58	0,12	0,55	0,46	0,51	0,05	0,05	0,06	0,49	0,49
AK_Lys_Thr	0,72	-0,85	0,68	-	0,82	0,72	0,90	0,64	0,93	0,98	0,97	0,57	0,57	0,46	0,03	0,99
HSDH_contr ol	0,46	-0,25	0,50	-0,28	-	0,09	0,08	0,54	0,11	0,21	0,15	0,62	0,62	0,72	0,84	0,17
HSDH_thr	0,32	-0,11	0,37	-0,42	0,99	-	0,17	0,64	0,21	0,30	0,25	0,71	0,71	0,82	0,75	0,27
LOR	0,56	-0,37	0,61	-0,16	0,99	0,96	-	0,46	0,03	0,13	0,08	0,54	0,54	0,64	0,92	0,10
SDH	-0,97	0,90	-0,98	-0,53	-0,66	-0,54	-0,75	-	0,43	0,34	0,39	0,07	0,07	0,18	0,61	0,37
DHDPS_cont rol	0,60	-0,42	0,65	-0,11	0,98	0,95	<u>1,00</u>	-0,78	-	0,10	0,04	0,50	0,51	0,61	0,95	0,06
DHDPS_Lys 1	0,72	-0,55	0,75	0,04	0,95	0,89	0,98	-0,86	<u>0,99</u>	-	0,05	0,41	0,41	0,52	0,95	0,03
DHDPS_Lys 5	0,66	-0,48	0,70	-0,05	0,97	0,92	0,99	-0,82	<u>1,00</u>	<u>1,00</u>	-	0,46	0,46	0,57	1,00	0,02
DHDPS_AE C5	0,99	-0,94	1,00	0,63	0,57	0,44	0,67	<u>-0,99</u>	0,70	0,80	0,75	-	0,00	0,11	0,54	0,44
Thr_gi	-0,99	0,94	-1,00	-0,63	-0,57	-0,44	-0,66	<u>0,99</u>	-0,70	-0,80	-0,75	<u>-1,00</u>	-	0,11	0,54	0,44
Lys_gi	-1,00	0,98	-1,00	-0,75	-0,42	-0,28	-0,53	<u>0,96</u>	-0,57	-0,69	-0,63	<u>-0,99</u>	<u>0,99</u>	-	0,43	0,55
Met_gi	-0,75	0,88	-0,71	-1,00	0,24	0,38	0,12	0,57	0,07	-0,08	0,00	-0,66	0,66	0,78	-	0,98
Ile_gi	-0,68	0,51	-0,72	0,01	<u>-0,96</u>	<u>-0,91</u>	<u>-0,99</u>	0,84	<u>-1,00</u>	<u>-1,00</u>	<u>-1,00</u>	-0,77	0,77	0,65	0,03	-

APÊNDICE E. Correlação macro e micronutrientes e fitato em grão integral de arroz, experimento II

	Fitato	N	P	K	Mg	Ca	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
Fitato	-	0,14	0,16	0,14	0,27	0,16	0,52	0,09	0,75	0,06*	0,03	0,15
N	0,38	-	0,35	0,10	0,77	0,77	0,12	0,98	0,19	0,61	0,99	0,97
P	0,37	-0,25	-	0,45	0,31	0,07	0,52	0,17	0,18	0,10	0,04	0,19
K	0,38	0,43	0,20	-	0,24	0,29	0,83	0,66	0,97	0,05	0,44	0,28
Mg	0,30	-0,08	0,27	0,31	-	> 0,01	0,03	0,06	> 0,01	0,01	0,01	> 0,01
Ca	0,37	-0,08	0,46	0,28	<u>0,74</u>	-	0,39	> 0,01	0,02	0,07	> 0,01	> 0,01
S	-0,17	-0,41	0,17	-0,06	<u>0,54</u>	0,23	-	0,51	> 0,01	0,06	0,46	0,17
B	0,43	-0,01	0,36	0,12	0,47	<u>0,76</u>	-0,18	-	0,48	0,88	0,01	0,10
Cu	-0,09	-0,34	0,35	0,01	<u>0,73</u>	<u>0,57</u>	<u>0,77</u>	0,19	-	0,02	0,03	> 0,01
Fe	<u>0,49*</u>	0,14	0,43	<u>0,49</u>	<u>0,63</u>	0,46	0,49	0,04	<u>0,58</u>	-	0,01	0,01
Mn	<u>0,54</u>	0,00	<u>0,53</u>	0,21	<u>0,63</u>	<u>0,77</u>	0,20	<u>0,62</u>	<u>0,53</u>	<u>0,62</u>	-	0,01
Zn	0,38	-0,01	0,35	0,29	<u>0,83</u>	<u>0,71</u>	0,36	0,43	<u>0,71</u>	<u>0,63</u>	<u>0,60</u>	-

APÊNDICE F. Correlação de proteínas de reserva, zinco (Zn) e fitato em grão integral de arroz, experimento II

	Zn	albumina	globulina	prolamina	glutelina	Proteína Total	Fitato
Zn	-	0,45	0,83	0,12	0,80	0,96	0,15
albumina	0,20	-	> 0,01	0,01	0,19	> 0,01	0,03
globulina	-0,06	<u>0,69</u>	-	0,15	0,08	> 0,01	0,02
prolamina	0,40	<u>0,61</u>	0,38	-	0,61	0,08	0,95
glutelina	-0,07	0,34	0,45	0,14	-	> 0,01	0,01
Proteína Total	0,01	<u>0,77</u>	<u>0,85</u>	0,45	<u>0,81</u>	-	> 0,01
Fitato	0,38	<u>-0,54</u>	<u>-0,59</u>	-0,02	<u>-0,62</u>	<u>-0,70</u>	-

APÊNDICE G. .Correlação de aminoácidos totais livres (ATL) e zinco, em grão integral de arroz, experimento II

	Zn	Ser	Arg	Gly	Asp	Glu	Thr	Ala	Pro	Lys	Tyr	Val	Ile	Leu	Phe
Zn	-	0,54	0,87	0,83	0,76	0,37	0,41	0,85	0,39	0,80	0,20	0,68	0,84	0,80	0,64
Ser	0,16	-	> 0,01	0,08	0,01	0,02	> 0,01	0,31	0,19	0,32	0,12	0,14	0,33	0,42	0,41
Arg	0,05	<u>0,71</u>	-	> 0,01	> 0,01	> 0,01	0,03	0,07	0,04	0,02	0,10	0,01	0,14	0,20	0,23
Gly	0,06	0,45	<u>0,81</u>	-	> 0,01	> 0,01	0,07	0,02	0,04	0,03	0,10	0,02	0,04	0,19	0,13
Asp	-0,08	<u>0,66</u>	<u>0,75</u>	<u>0,67</u>	-	0,07	0,03	0,18	0,10	0,02	0,05	0,01	0,29	0,07	0,17
Glu	0,24	<u>0,59</u>	<u>0,69</u>	<u>0,73</u>	0,47	-	0,18	0,29	0,59	0,68	0,26	0,51	0,56	0,91	0,85
Thr	0,22	<u>0,76</u>	<u>0,55</u>	0,46	<u>0,55</u>	0,35	-	0,04	0,03	0,08	> 0,01	0,01	0,01	0,03	0,01
Ala	-0,05	0,27	0,46	<u>0,58</u>	0,35	0,28	<u>0,52</u>	-	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01
Pro	0,23	0,35	<u>0,52</u>	<u>0,52</u>	0,43	0,15	<u>0,55</u>	<u>0,79</u>	-	> 0,01	> 0,01	> 0,01	0,01	> 0,01	> 0,01
Lys	-0,07	0,26	<u>0,59</u>	<u>0,55</u>	<u>0,56</u>	0,11	0,46	<u>0,81</u>	<u>0,83</u>	-	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01	> 0,01
Tyr	0,34	0,41	0,42	0,43	<u>0,49</u>	0,3	<u>0,68</u>	<u>0,71</u>	<u>0,79</u>	<u>0,69</u>	-	> 0,01	0,01	> 0,01	> 0,01
Val	-0,11	0,38	<u>0,61</u>	<u>0,59</u>	<u>0,60</u>	0,18	<u>0,64</u>	<u>0,83</u>	<u>0,77</u>	<u>0,90</u>	<u>0,73</u>	-	> 0,01	> 0,01	> 0,01
Ile	-0,05	0,26	0,38	<u>0,52</u>	0,28	0,16	<u>0,63</u>	<u>0,81</u>	<u>0,62</u>	<u>0,68</u>	<u>0,63</u>	<u>0,87</u>	-	> 0,01	> 0,01
Leu	-0,07	0,22	0,34	0,35	0,47	-0,03	<u>0,55</u>	<u>0,82</u>	<u>0,75</u>	<u>0,87</u>	<u>0,79</u>	<u>0,93</u>	<u>0,80</u>	-	> 0,01
Phe	0,13	0,22	0,32	0,39	0,36	0,05	<u>0,61</u>	<u>0,79</u>	<u>0,74</u>	<u>0,80</u>	<u>0,83</u>	<u>0,89</u>	<u>0,87</u>	<u>0,95</u>	-