ESTUDO COMPARATIVO DA COMPOSIÇÃO POLIPEPTÍDICA DE CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa*, L.)

DULCE MARIA JUNQUEIRA AIRES SILVA
Engenheira Agrônoma

Orientador: PROF. DR. OTTO JESU CROCOMO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Solos e Nutrição de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro - 1981

In memoriam

José Francisco e *Hilda*,

meus pais, que tão bem

me encaminharam para a vida,

D E D I C O

Aos manos, cunhadas, sobrinhos;

ao meu esposo *José Carlos*,

O F E R E Ç O

AGRADECIMENTOS

- Ao *Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo*, pela orientação, incentivo e ensinamentos.

- Ao *Dr. Eric Derbyshire*, pelas discussões e sugestões durante a fase experimental e assistência no "Summary".

- À *Empresa Maranhense de Pesquisa Agropecuária, Secretaria de Agricultura do Maranhão* e *Federação das Escolas Superiores do Maranhão*, pela oportunidade de aperfeiçoamento.

- Ao *Plano Integrado de Capacitação de Docentes* (PICD), pela Bolsa de Estudos concedida.

- À *Dra. Maria Teresa Vitral de Carvalho*, pela assistência no decorrer dos trabalhos.

- Ao *Centro de Energia Nuclear na Agricultura* (CENA/USP), pelas facilidades concedidas em laboratório.

- À *Financiadora de Estudos e Projetos, Comissão Nacional de Energia Nuclear* e *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*, pelos auxílios financeiros concedidos.

- Ao *Dr. Paulo Roberto Camargo de Castro*, pela leitura do texto e sugestões para correção do vernáculo.

- À *Dra. Amariles S. Dias*, ao químico *Neftali O. Alejo* e à bioquímica *Christina H.R.P. Gonçalves*, que de alguma forma contribuíram neste trabalho.

ÍNDICE

Página

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO DE LITERATURA 4

2.1. Pesquisas 4

2.2. A Técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida 8

2.3. Extratores para Proteínas 9

2.4. Dissociação de Proteínas 12

2.5. Técnica de Coloração 13

2.6. Peso Molecular 16

3. MATERIAL E MÉTODOS 19

3.1. Material Vegetal 19

3.2. Material Químico 19

3.3. Método 20

3.3.1. Preparo da Farinha 20

3.3.2. Extração em Fosfato, pH 7,2 20

3.3.3. Pré-tratamento da Amostra 20

3.3.4. Preparo das Soluções com Proteínas Padrões 21

3.3.5. Extração com Tampão de Tris 21

3.3.6. Eletroforese sob Condições de Dissociação em Sistema Contínuo em Tubos (método de WEBER e OSBORN, 1969) . 21

3.3.7. Eletroforese sob Condições de Dissociação em Sistema Descontínuo em Tubos (método de LAEMMLI, 1970) 24

3.3.8. Método de LAEMMLI (1970) modificado, em Placa 26

3.3.9. Estimativa da Mobilidade 27

Página

3.3.10. Determinação do Peso Molecular 28

3.3.11. Determinação da Proteína 28

3.3.12. Análise de Aminoácidos 28

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 29

4.1. Proteínas de Reserva do Grão da Cultivar IAC-1246, Obtidas Através da Eletroforese em Sistema Contínuo 29

4.1.1. Proteínas Padrões que Foram Usadas para o Cálculo do PM Aparente das Amostras de Arroz da Cultivar IAC-1246 29

4.1.2. Perfil Eletroforético do Extrato de Arroz da Cultivar IAC-1246 30

4.2. Proteínas de Reserva da Cultivar IAC-1246, Obtidas Através da Eletroforese em Sistema Descontínuo 32

4.2.1. Perfil Eletroforético 32

4.3. Proteínas de Reserva do Grão das Cultivares: Agulha, Cartuna, Caqui, IAC-1246, IPSL-1070, Iguape, Nuglin e Quatro Meses, Obtidas Através da Eletroforese em Placa 35

4.3.1. Considerações Gerais 35

4.3.2. Análise Comparativa Entre as Oito Cultivares 35

4.3.3. Perfil Polipeptídico de Diferentes Componentes do Grão de Arroz 38

4.4. Influência do Cozimento na Diluição da Proteína do Grão de Arroz Comum e Parboilizado 47

4.5. Determinação de Proteína 47

4.5.1. Proteína Total 47

Página

4.6. Análise de Aminoácidos 55

4.6.1. Teor de Aminoácido das Amostras de Arroz das Cultivares IAC-1246, Cartuna, Nuglin-24 e Agulha 55

5. CONCLUSÕES 59

6. LITERATURA CITADA 60

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1 -	Proteínas de peso molecular conhecido	29
2 -	Quantidade de N-total e proteína no grão de arroz de oito cultivares	49
3 -	Quantidade de N-total e proteína nos componentes do grão de arroz de quatro cultivares	51
4 -	Quantidade de N-total e proteína no arroz comum e parboilizado	53
5 -	Composição em aminoácidos de hidrolisados de proteínas do endosperma das cultivares de arroz IAC-1246, Cartuna, Nuglin-24 e Agulha	58

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	- Diagrama das proteínas padrões usadas: (a) BSA; (b) ovalbumina; (c) tripsina; (d) mioglobulina; (e) lisozima ...	31
2	- Curva padrão obtida através de proteínas com PM conhecido .	31
3	- Perfil polipeptídico do extrato do grão de arroz da cultivar IAC-1246, obtido por eletroforese contínua em gel de poliacrilamida, em presença de SDS, pH 7,2	32
4	- Diagrama dos padrões de proteínas usadas no sistema LAEMMLI (1970): (a) e (b) BSA; (c) e (d) ovalbumina; (e) e (f) mioglobulina; (g) e (h) lisozima; dissolvidas em fosfato e Tris	34
5	- Perfil Eletroforético das amostras do arroz IAC-1246: (a) extraída em fosfato de sódio em presença de SDS 0,1%, pH 7,2; (b) extraída em Tris de HCl, em presença de SDS 2%, pH 6,8	34
6	- Perfil polipeptídico do extrato do grão de arroz de oito cultivares, obtido por eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida em presença de SDS, pH 6,8. (A) diagrama mostrando as subunidades polipeptídicas das cultivares estudadas; (B) Fotografia da placa. Cultivares: 1) IAC - 1246; 2) IPSL-1070; 3) Agulha; 4) Cartuna; 5) Quatro Meses; 6) Nuglin-24; 7) Iguape; 8) Caqui; 9) Proteínas Padrões	37

Figura *Página*

7 - Perfis eletroforéticos de frações do grao de arroz da cultivar IAC-1246. (1) diagrama do gel, mostrando subunidades polipeptídicas do grão total; (2) diagrama do gel mostrando subunidades polipeptídicas do embrião; (3) diagrama do gel mostrando subunidades polipeptídicas do endosperma; (1a, 2a, 3a) fotografias correspondentes aos géis ... 40

8 - Perfis eletroforéticos de frações do grão da cultivar Agulha. (1) diagrama do gel mostrando subunidades polipeptídicas do grão total; (2) diagrama do gel mostrando subunidades polipeptídicas do embrião; (3) diagrama do gel mostrando subunidades polipeptídicas do endosperma; (1a, 2a, 3a) fotografias correspondentes aos géis 42

9 - Perfis eletroforéticos de frações do grão da cultivar Cartuna. (1) diagrama do gel mostrando subunidades do grão total; (2) diagrama do gel mostrando subunidades polipeptídicas do embrião; (3) diagrama do gel mostrando subunidades do endosperma; (1a, 2a, 3a) fotografias correspondentes aos géis 45

10 - Perfis eletroforéticos de frações do grão da cultivar Nuglin-24. (1) diagrama do gel mostrando subunidades polipeptídicas do grão total; (2) diagrama do gel mostrando subunidades polipeptídicas do endosperma; (1a, 2a) fotografias dos géis 46

Figura *Página*

11 - Perfil eletroforético de extratos de arroz comercial. (1) parboilizado cozido; (2) comum cozido; (3) comum cru; (4) parboilizado cru; (1a, 2a, 3a, 4a) fotografia correspondente aos géis 48

ESTUDO COMPARATIVO DA COMPOSIÇÃO POLIPEPTÍDICA DE CULTIVARES DE ARROZ

(*Oryza sativa* L.)

Dulce Maria Junqueira Aires Silva
- engenheira agrônoma -

Otto Jesu Crocomo
- orientador -

RESUMO

Neste trabalho, foi efetuado um estudo comparativo das composições polipeptídicas e de aminoácidos do grão de oito cultivares de arroz e de duas amostras de arroz comercial.

Os teores de proteínas das amostras foram determinados através de análise da farinha melo método de Kjeldahl e as composições de aminoácidos foram determinadas por hidrólise ácida da farinha, através de um analisador automático. Os perfis polipeptídicos das amostras foram obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida, de acordo com os métodos de WEBER e OSBORN (1969) e LAEMMLI (1970), para gel em coluna, e o método de LAEMMLI modificado, em placas.

Os teores de proteínas das amostras variaram de 9,2% a 12,8% entre as cultivares e de 8,1% a 8,3% nas amostras de arroz comercial parboilizado e beneficiado. Pequena variação foi encontrada entre as composições em aminoácidos das cultivares. Os aminoácidos que apresentaram maio-

res teores foram o ácido glutâmico, ácido aspártico, glicina e leucina, e os que apresentaram menores teores foram histidina, lisina e treonina, sendo que o teor de lisina variou de 2,7 a 3,3 moles %.

A maioria dos polipeptídios extraídos de cada amostra apresentou PM_s compreendidos entre 14000 e 68000. Três grupos de polipeptídios com PM_s de 35000, 25000 e 14000 foram os principais em cada perfil do grão total e do endosperma, mas não do embrião. Os perfis com relação aos polipeptídios de 25000 e 35000 não foram idênticos em todas as amostras.

Este trabalho demonstra que os métodos eletroforéticos podem ser usados para detectar diferenças na composição polipeptídica entre amostras de arroz, inclusive variedades tradicionais, linhagens novas produzidas em programas de melhoramento e também amostras empregadas em estudos nutricionais.

A STUDY OF THE POLYPEPTIDE COMPOSITIONS OF RICE (*Oryza sativa* L.) CULTIVARS

Dulce Maria Junqueira Aires Silva

Otto Jesu Crocomo
- Adviser -

SUMMARY

In this work, a comparative study of amino acid and polypeptide compositions of eight rice grain cultivars and two commercial samples of rice is reported.

The protein contents of samples were determined from Kjeldahl-N analysis of meals and amino acid compositions were determined by analysis of acid hydrolysates of meal by use of an automatic amino acid analyzer. Profiles of the polypeptide compositions of samples were prepared by use of electrophoresis in polyacrylamide gels according to the methods of WEBER and OSBORN (1969), and LAEMMLI (1970) for gel columns and a modified method of LAEMMLI (1970) for gels slabs.

The protein contents of samples varied from 9.2% to 12.8% among cultivars and ranged from 8.1% to 8.3% in commercial samples of parboiled and milled rice. Little variation was found among the amino acid compositions of the cultivars, and the amino acids present in highest concentration in the hydrolisates were glutamic and aspartic acid, glycine and leucine. Those

in lowest concentration were histidine, lysine and threonine. However, lysine content ranged from 2.7 to 3.3 moles %.

Most of the polypeptides extracted from each sample presented MW_s between 14000 and 68000. Three groups of polypeptides with MW_w 35000, 25000 and 14000 were the most prominent in each profile of whole grain and endosperm but not of embryo. However, the patterns of polypeptides within the groups with MW 25000 and 35000 were not identical in all samples.

The work demonstrates that electrophoretic procedures may be useful for the detection of differences in polypeptide composition among rice samples, including traditional varieties new lines produced during improvement programmes and samples employed in nutritional studies.

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa*, L.) é uma planta de origem asiática, cujo cultivo é dos mais antigos, razão porque não se pode afirmar com exatidão quando o homem começou a explorá-la. KENT-JONES e AMOS (1956) relatam que esta gramínea já era cultivada 2000 anos A.C., enquanto ANGLADETE (1967) tece considerações sobre a descoberta de restos de arroz no Vale do Yang Tsé Kiang que datam de 3 a 4 mil anos A.C.

Este cereal é tão importante que o seu nome tem como significado "sustento da vida humana", pois elevada porcentagem das colheitas que se destinam à alimentação é constituída pelo arroz (KENT-JONES e AMOS, 1956). Sendo o segundo cereal mais cultivado no mundo, nos trópicos asiáticos foi considerado o responsável pelo desenvolvimento dessa região (BAKER, 1968). Para HEISER JUNIOR (1977) foi este o alimento que permitiu a criação de uma alta civilização no Extremo Oriente.

Os cereais representam a base da alimentação dos povos. As gramíneas atingem 90% das plantas cultivadas, o que as situa entre as mais importantes sementes alimentícias, valendo destacar: arroz, trigo, milho e outras comestíveis (COWAN, 1973). Ainda é considerado por esse autor que o

arroz, por sua facilidade de adaptar-se a condições de altas temperaturas e umidade, constitui um suporte à alimentação de regiões tropicais do mundo.

No Sudoeste da Ásia, o arroz destaca-se como a principal fonte de alimento para os seus habitantes (CAGAMPANG *et alii*, 1966).

A proteína animal está se tornando cada vez mais onerosa para a população de baixa renda, ressaltando assim a vegetal como a principal opção. Na dieta diária, a dupla arroz/feijão assume um valioso papel no suprimento de aminoácidos para os brasileiros.

O arroz é também um alimento básico para uma significativa porcentagem da população latino-americana, ainda que a sua proteína seja limitante em aminoácidos essenciais como lisina e treonina. Os principais consumidores são Costa Rica, Panamá e Brasil (GOMEZ-BRENES *et alii*, 1977).

No Brasil, o primeiro estado a explorar o arroz foi o Maranhão, onde o produto é considerado o principal (MARANHÃO, 1979), sendo a referida Unidade da Federação a 3a. produtora desta gramínea no país (REZENDE, 1980).

O teor proteico do arroz não é elevado: 6 a 7% (ELIAS *et alii*, 1968); 5 a 17% (JULIANO, 1966; JULIANO *et alii* 1964, 1968), citados por SHADI e KJURTUFT (1979); 8% (COFFMAN e JULIANO, 1979). No entanto, o seu valor nutritivo é grande pela qualidade da proteína e, por isso, na dieta alimentar é indispensável ao homem e animais. Ainda que se apresente deficiente em lisina, é a de melhor qualidade entre os cereais (BRESSE-JONES *et alii*, 1949).

Noventa por cento da proteína do grão encontra-se no endosperma, sendo 80% de glutelina e 5-10% de prolamina (JULIANO e BOULTER, 1976 e ROBBELEN, 1979). A primeira é denominada oryzenina e é a mais importante, mas é encontrada ao redor de 7% (KENT-JONES e AMOS, 1956).

Com relação aos aminoácidos, os sulfurados são sempre relatados como limitantes entre os cereais, porém, de acordo com HOUSTON *et alii* (1964), MITRA e DAS (1971) e LUSE e RACHIE (1979), estes aminoácidos foram encontrados em teores elevados em cereais, incluindo o arroz.

Um aspecto que merece destaque é a digestibilidade do arroz polido, que supera a dos demais grãos, inclusive, MOD *et alii* (1978), comparando-o com o trigo, ressaltam o arroz como menos irritável às paredes intestinais, o que o faz ser indicado para alimento de crianças.

A má nutrição proteica é a principal responsável pelo baixo desenvolvimento físico e mental da criança. Assim, são plenamente justificáveis estudos orientados no sentido de melhorar a qualidade proteica do arroz, a principal fonte de proteína básica para a alimentação (SIEGEL *et alii*, 1975).

A obtenção de variedades com teor mais elevado de proteína é uma meta desejada e, visando oferecer algum subsídio, o presente trabalho tem como objetivo efetuar um estudo comparativo da composição polipeptídica de cultivares de arroz e identificar as frações polipeptídicas que mostram variação entre as cultivares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Pesquisas

Considerável número de pesquisas tem sido levado a efeito, visando detectar tipos de proteína e a importância destes compostos fornecedores de aminoácidos essenciais para o metabolismo em geral. Por outro lado, esforços para a melhoria da qualidade e quantidade de proteína em leguminosas e cereais têm sido desenvolvidos e até com resultados promissores.

Há uma grande preocupação por parte dos investigadores com relação à manutenção da qualidade da proteína do arroz, mesmo quando o principal objetivo visa um aumento no seu teor proteico. JULIANO *et alii* (1973) relatam que os esforços no sentido de melhorar o valor nutricional deste grão concentram-se especialmente em conseguir o aludido aumento com o mínimo de decréscimo no teor de lisina. Explicando o fato, TECSON (1971) justifica-o, considerando o aumento do teor de proteína no grão como decorrência do aumento de prolamina, uma proteína que tem o mais baixo teor de lisina em relação a outras frações proteicas. Para HOUSTON *et alii* (1969) ocorre o contrário, pois estes relatam maiores valores de lisina para a prolamina.

A aplicação de fertilizantes nitrogenados quando efetuada na época ideal é capaz de aumentar o teor proteico no grão deste cereal, conforme foi obtido por NAGARAJAH *et alii* (1975) e EGUN e JULIANO (1975), quando a efetuaram no estágio de aparecimento da panícula.

Nem todas as cultivares apresentam o mesmo teor de lisina, o que leva o pesquisador a fazer estudos comparativos e selecionar as que se apresentam em destaque, no que se refere ao teor de aminoácidos limitantes. Trabalhos neste sentido foram realizados por MITRA e DAS (1971), quando encontraram uma cultivar (TN-1) com alto teor em lisina e aminoácidos sulfurados. NELSON (1969) relata que o suprimento e pronta disponibilidade de proteína vegetal pode sofrer aumento através da seleção de linhagens, incluindo ainda a perda de substâncias tóxicas, ou mesmo redução destas, encontradas em sementes de algodão e muitas crucíferas.

O teor de proteína não é o mesmo nas diferentes partes do grão, assim como o teor de lisina está sujeito a variações. No arroz beneficiado, a lisina é o aminoácido limitante, sendo, contudo, encontrada em maior porcentagem no pericarpo, camada de aleurona e no embrião (IRRI, 1975).

Em algumas cultivares de arroz, o teor proteico pode variar em sete pontos na porcentagem em consequência de fatores ambientais, o que é relatado por JULIANO (1964) e CAGAMPANG *et alii* (1966).

Muitos resultados obtidos com o aumento da porcentagem de proteína no grão de arroz não são satisfatórios por não serem acompanhados pelo maior rendimento do grão. Isto acontece com a aplicação de simazima conforme é descrito por VERGARA *et alii* (1970) e em muitos casos em que através de mutagênicos físicos e químicos foram alcançados aumentos.

Não se pode generalizar o fato porque há casos em que os pesquisadores conseguem aliar melhoria com a quantidade.

ISMACHIN (1976) ressalta que na Indonésia a condução de trabalhos visando a obtenção de mutantes com melhoramento da proteína no grão de arroz teve seu início em 1972.

A participação de variedades de arroz com teor proteico melhorado é citado por SHAIKH *et alii* (1976) como importante na redução de deficiência proteica na dieta alimentar.

É considerado por TANAKA e HIRAIWA (1978) o aumento da produtividade como um dos mais importantes objetivos no melhoramento do arroz.

HARN *et alii* (1975) obteve mutante de arroz com aumento no teor proteico, evidenciado no endosperma.

Embora nem sempre sejam cercadas de êxito, algumas pesquisas neste campo de atividades merecem real destaque, como aconteceu com dois mutantes induzidos por MONYO e SUGYAMA (1978), que encontraram um considerável aumento no teor proteico de 35 e 44%, resultados estes que condicionam a realização de outros trabalhos dentro desta linha de pesquisa. Convém ressaltar que este mutante foi obtido já na terceira geração de duas cultivares.

Um estudo relativo à composição polipeptídica de frações de hordeína e glutelina durante o desenvolvimento do endosperma de aveia foi realizado por SHEWRY *et alii* (1979), através da eletroforese em gel de poliacrilamida e focalização isoelétrica.

A síntese desta proteína ocorreu entre duas e cinco semanas

após a ântese e esta fração contém aproximadamente 50% do total de nitrogênio do endosperma maduro. A hordeína é uma prolamina, considerada como principal proteína de reserva desta gramínea, sendo solúvel em álcool. Trata-se de uma fração pobre em lisina, como geralmente ocorre nos demais cereais. Nesta pesquisa foi também estabelecida uma comparação entre a fração proteica da aveia normal e de um mutante de alto teor de lisina, verificando-se nesta um teor de 15% de nitrogênio no endosperma e tem sua síntese em quatro semanas. Com vistas à glutelina, o teor de nitrogênio foi similar em ambas, cerca de 20%.

O arroz,ao ser beneficiado, perde uma parte do seu teor proteico e também vitaminas. Para KENT (1966), 76% da vitamina B_1, 56% de riboflavina e 63% de niacina são perdidos e, então, visando uma redução nessas perdas, é efetuada a prática de parboilização. O autor cita ainda que o arroz parboilizado é uma tradição na Índia e que o processo deixa-o menos sujeito ao ataque de pragas. Os efeitos da parboilização também são observados até no beneficiamento, prevenindo a quebra do grão durante o processo (BATTACHARYA, 1969). Muitos fatores são responsáveis pela quebra qualitativa do grão de arroz, entre os quais, colheita, forma de secagem e outros. No entanto, através da parboilização, é possível reduzir-se este problema.

SILVA (1980) tece considerações sobre a parboilização como um tratamento hidrotérmico, visando promover a migração de vitaminas hidrossolúveis e sais minerais do tegumento e embrião para o endosperma.

2.2. A Técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PGE)

A eletroforese é uma técnica que tem sido amplamente empregada com sucesso para o fracionamento de proteínas, polipeptídios e ácidos nucleicos. Os géis de amido e poliacrilamida apresentam características excelentes, que proporcionam resultados muito bons em pesquisa desta natureza (THORUN e MAURER, 1971 e GORDON, 1972).

LEHNINGER (1976) considera que a eletroforese em gel de poliacrilamida pode ser realizada em maior escala, visando o isolamento de quantidades grandes de proteínas purificadas. O autor cita ainda os métodos eletroforéticos, entre os quais eletroforese livre, considerando-o protótipo de todos os métodos modernos, como a eletroforese de zona e a eletroforese de disco e focalização isoelétrica.

A eletroforese de disco ainda é muito usada no fracionamento proteico, embora mais recentemente tenha surgido a eletroforese em placa, que permite uma comparação melhor das diferentes bandas.

Qualquer que seja o tipo utilizado, para que os dados obtidos sejam reproduzíveis, é indispensável que cuidados especiais sejam observados, pois uma pequena variação na técnica é capaz de afetar os resultados (CURTIS, 1979).

Muitos parâmetros estão envolvidos na resolução eletroforética. THORUM e MAURER (1971) consideram que em relação à partícula, o tamanho, forma, concentração carga elétrica, grau de hidratação e dissociação, exercem influência na mobilidade, enquanto no tocante ao meio, viscosidade, força iônica, temperatura e pH são capazes de interferir, o que também é

descrito por ANDERSON (1980). Os primeiros autores referem-se ainda à fonte elétrica e tempo de migração que também causam variação no referido processo.

Dos fatores que exercem influência sobre a resolução eletroforética do gel, ANDERSON (1980) tece considerações a respeito, destacando o tipo de poro do gel e diferença de carga entre as proteínas. O autor relata ainda que a posição relativa da proteína no campo eletroforético depende do tipo e concentração do gel, pH, temperatura e composição do tampão.

Existem métodos que são usados para proteínas nativas em sistema descontínuo (DAVIS, 1964), proteínas dissociadas e em sistema contínuo (WEBER e OSBORN, 1969) e proteínas dissociadas em sistema descontínuo (LAEMMLI, 1970).

2.3. Extratores para Proteínas

A extração das proteínas pode ser procedida através de água, soluções salinas neutras, soluções alcalinas e álcool. Baseando-se na solubilidade das proteínas nesses solventes, OSBORN (1918) classificou-as em quatro grandes grupos:

ALBUMINAS - solúveis em água e em soluções salinas neutras diluídas

GLOBULINAS - solúveis em soluções salinas neutras diluídas

GLUTELINAS - solúveis em álcalis diluídos

PROLAMINAS - solúveis em álcool a 50-70% e em ácidos e álcalis diluídos.

Uma gama de pesquisas tem sido realizada usando os vários ex

tratores disponíveis para este mister, entretanto, de acordo com trabalhos desenvolvidos por CAGAMPANG *et alii* (1966), dos 18 solventes usados em arroz, os alcalinos foram mais eficientes que os ácidos. Já TECSON *et alii* (1971) efetuaram vários processos de extração com hidróxido de sódio, com álcool a 70%, em presença de β-mercaptoetanol ou detergente, encontrando uma grande variação quanto à composição de aminoácidos e mobilidade eletroforética da glutelina e prolamina do endosperma de arroz.

Quando se faz uma observação no tocante ao tipo de extrator, há sempre uma predominância dos alcalinos, o que se confirma pelos trabalhos desenvolvidos por CONNOR *et alii* (1976) e BARKER *et alii* (1976), sendo que estes últimos autores trabalharam com sementes maduras de feijão.

JULIANO e BOULTER (1976) tecem considerações sobre a glutelina do endosperma de arroz, enfatizando que, usando extrator salino com 0,5% de SDS e 0,6% de β-mercaptoetanol, extraíram 91% da glutelina do endosperma sem causar gelatinização dos grânulos de amido, o que, em contraste, ocorre quando se usa uréia ou guanidina.

A extração de globulinas e albuminas de arroz moído foi efetuada por HOUSTON e MOHAMMAD (1970) usando o cloreto de sódio a 5%. Em geral, estes dois tipos de proteína são mais encontrados durante o desenvolvimento do grão, pois, de acordo com os estudos realizados por CAGAMPANG *et alii* (1976), a semente seca acumula mais as proteínas de reserva em detrimento das enzimáticas e, então, no período de rehidratação da semente, ocorre uma inversão, predominando as primeiras.

BIETZ e WALL (1975) estudaram o efeito de vários extratores para a glutenina do trigo e, por se tratar de um composto heterogêneo, foi

necessário o emprego de vários solventes para o fracionamento parcial. Para a determinação da composição de subunidades, os autores usaram a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, com bons resultados.

Foram usados ácido acético + 2-mercaptoetanol, cloreto de mercúrio, etanol a 70%, cloreto de sódio, ácido acético, ácido acético combinado com cloreto de mercúrio.

Nos trabalhos que JONES e BECKWITH (1977) desenvolveram usando extratores diferentes para a farinha seca de sorgo, observaram que 37% da proteína do endosperma deste cereal são solúveis em álcool, enquanto apenas 6% são solúveis em água e soluções salinas. Os padrões eletroforéticos obtidos por estes autores foi com gel de poliacrilamida a 5%. A análise química do grão de sorgo revela uma porcentagem maior de proteína em relação ao arroz.

SHADI e DJURTOFT (1978), usando extrato salino de embrião e endosperma, encontraram 28 componentes de proteína. Relataram ainda que a concentração de algumas proteínas mostrou ser mais elevada no embrião que no endosperma.

PERDON e JULIANO (1978), quando usaram o cloreto de sódio como extrator, conseguiram isolar globulina no endosperma de arroz, com diferentes bandas e propriedades quanto à composição de aminoácidos.

Padrões eletroforéticos em gel de poliacrilamida de gluteninа solubilizada em estearato de sódio exibem diferenças qualitativas e quantitativas dos padrões obtidos quando a proteína é solubilizada por quebra das ligações de di-sulfeto com β-mercaptoetanol, sugerindo que estas liga-

ções não são quebradas durante a solubilização com o estearato (WASIK *et alii*, 1979).

2.4. Dissociação de Proteínas

O dodecil sulfato de sódio (SDS) é um detergente iônico muito usado como dissociante de proteínas, ocupando uma posição de destaque em virtude da capacidade de produzir uma rápida mudança conformacional em reagentes de concentrações baixas. Para THORUM e MAURER (1971), o SDS minimiza as diferenças de cargas negativas e, assim sendo, todas as proteínas migram como ânions em decorrência da sua complexação com o SDS.

A solubilização de certas proteínas, inclusive as proteínas agregadas por adição de SDS é realizada porque a proteína tratada torna-se mais hidrofílica (GORDON, 1972). Neste complexo, a cadeia polipeptídica tem no seu revestimento uma camada de moléculas de SDS de forma tal que as cadeias hidrocarbonadas mantêm uma associação hidrofílica muito forte com a cadeia polipeptídica e assim, os grupos de sulfato carregados do detergente tornam-se expostos ao meio aquoso (LEHNINGER, 1976).

DERBYSHIRE e BOULTER (1976) estudaram as subunidades globulinas que são proteínas de reserva de *Phaseolus aureus* e *P. vulgaris*, cuja detecção foi através do sistema descontínuo para proteínas dissociadas em eletroforese de gel de poliacrilamida.

Nos trabalhos desenvolvidos por MANDAC e JULIANO (1977), foi mostrada a diferença nas subunidades da prolamina através da eletroforese em gel de poliacrilamida em presença e ausência de SDS. A pesquisa foi

realizada com grão de arroz em estágio de desenvolvimento da cultivar IR - 480, evidenciando a detecção de bandas mais fortes na presença do detergente, além de bandas com diferentes migrações.

Outras espécies foram estudadas, mostrando a influência do extrator e a eficiência dos diferentes métodos eletroforéticos na detecção de bandas proteicas.

O efeito da presença de SDS em gel de poliacrilamida resultou na detecção de 12 bandas de globulinas de ervilha, em trabalhos realizados por GRANT e LAWRENCE (1964), o que prova ser este detergente bastante efetivo quando comparado com a solução de cloreto de sódio que foi capaz de separar apenas 2 bandas do mesmo extrato.

Diferentes padrões eletroforéticos foram obtidos por TANAKA e BUSHUK (1972) quando usaram água, solução salina e álcool como solventes de proteínas de variedades de trigo.

De acordo com DERBYSHIRE e BOULTER (1975), a metodologia a ser usada para a extração das proteínas de sementes não deve ser aplicada, em termos gerais, para todas as sementes, em virtude da complexidade da natureza química destas estruturas.

2.5. Técnica de Coloração

A visualização de bandas proteicas em suportes diversos usados na eletroforese é feita através da técnica de coloração, existindo uma série de corantes (ZACHARIUS *et alii*, 1969), como os seguintes: "Amido Black", Coomassie Brilliant Blue e Porcion Blue R.S. Considerando outros

suportes, como papel e membrana de acetato, DATYNER e FINNIMORE (1973) relatam que os corantes mais comumente usados são basicamente de dois tipos: os indicadores de moléculas simples, sempre disponíveis na forma pura, sofrendo variação de cor em decorrência do pH, sendo principalmente representados pelo Azul de Bromofenol; corantes ácidos, entre os quais, o Amido Black 10B, usado para corar lã. RACUSEN (1973) chama atenção sobre dois aspectos apresentados pelos corantes empregados: os que são capazes de reagir covalentemente com os grupos específicos de proteína e os que não têm esta característica. O Amido Black está enquadrado no segundo caso, incluindo também o C.I. 2047 e o "Naphthol Blue Black", que são os mais usados. Os autores citam ainda que em condições padronizadas, o Amido Black pode também ser empregado com o objetivo de estimar quantidades de proteínas específicas após a eletroforese em gel de disco de poliacrilamida.

Existe sempre um corante mais indicado de acordo com a concentração da proteína. Em casos de níveis mais altos de concentração de proteínas, o Amido Black é mais eficiente.

CURTIS (1979) ressalta a importância de se obedecer um critério para o uso destes corantes, baseado em:

a) seleção de um corante adequado e que apresente qualidade satisfatória;

b) seleção de um solvente que tenha as propriedades desejadas de concentração do corante, solubilidade e estabilidade;

c) após a eletroforese em gel de poliacrilamida, fixação e

coloração de bandas proteicas no gel, a fim de produzir um complexo estável corante-proteína;

d) remoção do excesso de corante para visualizar as bandas;

e) fotografar as proteínas coradas e/ou registrar picos obtidos no densitômetro ou espectrofotômetro;

f) guardar o gel para referência futura.

Para TANAGI e KUBO (1977), o processo usado para a coloração do gel é muito trabalhoso e demorado, em virtude de necessitar um dia inteiro. Assim, são propostas algumas alternativas capazes de simplificar a detecção das bandas. Estas incluem a marcação fluorescente de bandas, densitometria do gel em ultra-violeta, esfriamento do gel a fim de cristalizar o SDS como bandas brancas. As bandas de proteína na eletroforese em gel de poliacrilamida podem ser vistas como bandas brancas por inversão do gel após o desenvolvimento eletroforético de uma solução aquosa diluída de superfície catiônica que com o SDS forma um complexo insolúvel.

Apesar de algumas críticas feitas por CURTIS (1979), os corantes ainda são bastante usados para visualizar bandas após eletroforese.

Diferentes tonalidades na coloração de bandas proteicas de albuminas, globulinas e gliadina de trigo foram obtidas por MINNETI *et alii* (1973), quando após eletroforese em gel de poliacrilamida, foi usado o corante "Aniline Blue-Black". Os autores relatam o fato como sendo consequência da influência de certos parâmetros físicos no espectro de absorção de bandas eletroforéticas daquelas proteínas.

2.6. Peso Molecular

A estimativa do peso molecular de proteínas e outras macromoléculas tem sido efetuada através de vários métodos, usando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida.

As características do gel são muito importantes quando se pretende determinar o peso molecular de subunidades proteicas e outros, pois para HEDRICK e SMITH (1968), o poder de alta resolução eletroforética do gel é um excelente meio para separação e caracterização da proteína. Estes autores foram capazes de mostrar o efeito da concentração do Bis na mobilidade da proteína. Nesta pesquisa, as propriedades relativas aos poros do gel foram drasticamente afetadas, quando houve variação na razão Bis/acrilamida. A lactato desidrogenase foi uma das proteínas estudadas pelos autores, usando eletroforese de disco.

Em trabalhos posteriores, foi mostrada a importância do dodecil sulfato de sódio (SDS) em eletroforese de gel de poliacrilamida, visando a determinação do peso molecular. WEBER e OSBORN (1969), de posse dos dados obtidos neste campo, relatam resultados mostrando que a eletroforese em gel na presença deste detergente pode ser usada com grande segurança para uma série de proteínas.

VILLAREAL e JULIANO (1977), estudando a glutelina do arroz sem casca, encontraram em 12 amostras uma composição similar e proporção de 1:1:1 para subunidades com PM de 38000:25000:16000, o que sugere haver uma possibilidade pequena de aparecimento de variantes das glutelinas de arroz. Os autores consideram que a subunidade de PM de 38000 foi a única que apareceu no endosperma.

OKUBO *et alii* (1979a), através da análise de ultracentrifugação e eletroforese de gel em placa de poliacrilamida em presença de uréia, encontraram que a globulina 13S, obtida de extratos de semente de gergelim, apresenta uma estrutura composta de uma subunidade ácida e outra básica.

O peso molecular das referidas subunidades foi determinado por filtração de gel e eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e em placa, sendo os PM_s de 30500 - 33500 e 20000 - 24500, respectivamente para a subunidade ácida e básica (OKUBO *et alii*, 1979b).

Nas investigações bioquímicas efetuadas por CROCOMO *et alii* (1980), relativas a proteínas em sementes de variedades e mutantes de *Phaseolus vulgaris*, cerca de 14 bandas proteicas foram encontradas através da eletroforese em um sistema de gel básico em coluna. Quando foi usada a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS, menor número de bandas foi obtido, porém, coradas mais intensamente. Os autores relatam ainda a predominância de bandas com R_m de 0,25 a 0,80 nesta última técnica.

Outros pesquisadores usaram a técnica de eletroforese para estimativa do PM de proteínas desejadas, como CROCOMO *et alii* (1978), trabalhando com proteína de reserva de ervilha; PADHYE e SALUNKHE (1979) e SHADI e DJURTUFT (1979) e PODUSLO e RODBARD (1980), com extratos do endosperma de arroz. Estes últimos tecem considerações sobre a técnica em ausência do SDS, com ênfase no coeficiente de retardamento, K_r, cuja definição está baseada na inclinação da relação linear entre o logaritmo da mobilidade relativa e a concentração do gel, que é diretamente relacionada ao PM.

Na presença do SDS, estes autores consideram o método como apresentando uniformidade de densidade de carga e/ou mobilidade livre para

as proteínas, de uma maneira tal que a distância de migração em um gel de concentração arbitrária é aproximadamente linear em relação ao logarítmo (M_r). Ainda é relatado ser a eletroforese em gel de gradiente de poro e seu desnaturamento, como um meio para mais alta resolução no fracionamento de proteína. Finalmente, citam a combinação SDS-PGE, visando a referida determinação.

Para PODUSLO e RODBARD (1980), a estimativa do PM para macromoléculas na faixa de 10^3 a 10^6 é muito boa e até consideram que o intervalo de confiança é de 95%, sendo usada a eletroforese com gradiente de poro.

Outros métodos são descritos por HOUSTON e MOHAMMAD (1970), referentes à determinação do PM. A filtração do gel em coluna de Sephadex G-100 calibrada, proporciona uma estimativa.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

No presente trabalho foram usadas oito cultivares de arroz semente, sendo elas: Agulha, Cartuna, Caqui, IAC-1246, IPSL-1070, Iguape, Nuglin-24 e quatro meses. Com exceção da cultivar IAC-1246, cuja origem foi Campinas (IAC), as demais foram provenientes de Goiânia (CNPAF-EMBRAPA). Todas foram obtidas da safra 1978/1979. Além destas, foram também usados grãos de arroz obtidos no comércio, o comum e o parboilizado.

3.2. Material Químico

Foram usadas as seguintes substâncias químicas: fosfato monobásico, fosfato dibásico, álcool metílico, ácido acético, dodecyl sulfato de sódio (SDS), acrilamida, persulfato de amônio, NN'-metileno-bis acrilamida, NNN'N'-tetrametiletilenodiamida (TEMED), Amido-Black, Bromophenol Blue, Coomassie Brilliant Blue O-250, Tris (hidroxymetil), glicina, glicerina, ácido clorídrico, 2-mercaptoetanol, glicerol, riboflavina, carbonato de sódio anidro, hidróxido de sódio, sulfato de sódio, tartarato de sódio e reagente de Folin.

As proteínas usadas foram: soro albumina bovina (BSA), ovalbumina, tripsina, mioglobulina e lisozima.

3.3. Método

As sementes foram descascadas manualmente.

3.3.1. Preparo da Farinha

Foram tomadas 15 sementes de arroz sem casca da cultivar IAC-1246 e procedida à moagem em almofariz com pistilo, até a obtenção de um pó bastante fino.

3.3.2. Extração em Fosfato, pH 7,2

Quatrocentos e vinte miligramas do pó dos grãos foram transferidos para um frasco, adicionando-se 3 ml da solução extratora, contendo fosfato de sódio 0,1M, em presença de SDS a 2%, com 2-mercaptoetanol a 0,1%. O extrato foi agitado durante 1 hora a $4^{o}C$ e, em seguida, centrifugado (7000 rpm), durante 30 minutos.

3.3.3. Pré-Tratamento da Amostra

Do sobrenadante, transferiu-se 1 ml para tubo com tampa de rosca, adicionando-se 2 gotas de 2-mercaptoetanol 0,1%. Procedeu-se de igual maneira com outro tubo, sem adição de 2-mercaptoetanol. As amostras foram incubadas em banho-maria durante 10 minutos, após a ebulição da água. Depois do resfriamento dos tubos em água corrente, foram adicionados 0,3 ml de glicerol a 60% e 1 gota de azul de bromofenol a 0,1%. Os frascos

foram conservados a $4^{o}C$.

3.3.4. Preparo das Soluções com Proteínas Padrões

Foram pesados 6 mg das proteínas: soro albumina bovina, ovalbumina, tripsina, mioglobulina e lisozima e dissolvidas em 2 ml de tampão fosfato 0,1M em presença de SDS a 2% com 2-mercaptoetanol 0,1%.

O pré tratamento foi o mesmo descrito no item anterior.

3.3.5. Extração com Tampão de Tris

Foram pesados 80 mg de arroz moído e adicionados 2 ml da solução extratora (Tris), contendo HCl,0,25M, SDS a 2%, pH 6,8 e 2-mercaptoetanol 0,1%. A amostra foi agitada durante 1 hora, sendo, em seguida, centrifugada (7000 rpm, durante 30 minutos). Das cultivares IAC-1246, Agulha e Cartuna também foi efetuada extração separadamente do endosperma e do embrião.

O pré tratamento foi o mesmo descrito em 3.3.3.

3.3.6. Eletroforese sob Condições de Dissociação em Sistema Contínuo, em Tubos (método de WEBER e OSBORN, 1969)

3.3.6.1. Soluções Utilizadas

a) Tampão fosfato 0,2M pH 7,2: 7,8 g de $NaH_2PO_4.H_2O$; 38,6 g de $Na_2HPO_4.7H_2O$; para 100 ml de água destilada.

b) Estoque de acrilamida: 11,2 g de acrilamida; 0,3 g de bisacrilamida; para 50 ml de água destilada.

c) Tampão de reserva (tampão de fosfato 0,1M com 0,1% de SDS): 0,5 g de SDS; 250 ml de tampão fosfato 0,2M; para 500 ml de água destilada.

d) Tampão do gel: 100 ml do tampão fosfato 0,2M e 2 g de SDS.

e) Tampão fosfato para extração: 100 ml de tampão fosfato 0,2M; 4 g de SDS, 2-mercaptoetanol 0,1%; para 200 ml de água destilada.

f) glicerol a 60%.

As seguintes soluções foram preparadas no momento do uso:

g) TEMED a 10%: 0,1 ml de TEMED e 0,9 ml de água destilada.

h) Solução de persulfato: 100 mg de SDS; 150 mg de persulfato de amônia e 5 ml de água destilada.

3.3.6.2. Preparo do Gel

O gel usado continha 7,5 ml do gel tampão, 6,5 ml da solução estoque de acrilamida, 1,5 ml da solução de persulfato e 0,22 ml da solução de TEMED a 10%. Foram aplicados 2,5 ml deste em cada tubo e a polimerização ocorreu aos 35 minutos.

3.3.6.3. Aplicação da Amostra

Foram aplicadas alíquotas que variaram de 20 a 100 ul em cada gel, sendo que o 2-mercaptoetanol foi usado apenas na metade dos 12 tubos.

3.3.6.4. Condições do Desenvolvimento Eletroforético

Após ter sido efetuada a montagem dos tubos no aparelho de eletroforese, o volume de cada um foi completado com a solução tampão e, em seguida, os reservatórios foram preenchidos com 1000 ml da solução tampão de fosfato 0,1M, pH 7,2.

Inicialmente, foram aplicados 2 mA por tubo durante 30 minutos, tempo suficiente para que o azul de bromofenol migrasse no gel. A partir de então, aumentou-se a corrente para 8 mA por tubo. A corrida durou 4 horas, o necessário para que o referido corante atingisse uma distância no gel de 5 mm da base do tubo. A eletroforese foi à temperatura ambiente.

3.3.6.5. Coloração

Foram usados 2 corantes: o Amido Black e o Coomassie Blue, sendo o tempo de coloração de 16 horas.

3.3.6.6. Descoloração

A descoloração foi por difusão simples, até que desaparecesse a coloração de fundo. Para os géis corados com o Amido Black, usou-se o solvente ácido acético a 7% e para o Coomassie Blue, o solvente foi o metanol: ácido acético: água (25:7:68).

3.3.6.7. Aplicação de Proteínas Padrões

Foram aplicadas alíquotas de 10 e 20 ul.

3.3.6.8. Condições de Desenvolvimento Eletroforético

Foram as mesmas descritas no item 3.3.6.4.

3.3.7. Eletroforese sob Condições de Dissociação em Sistema Descontínuo em Tubos (método de LAEMMLI, 1970)

3.3.7.1. Soluções Utilizadas

a) Solução A: 0,4 g de BIS; 15,0 g de acrilamida e 50 ml de água destilada.

b) Solução B: 9,0 g de Tris de HCl 0,75M, pH 8,8 e 100 ml de água destilada.

c) Solução C: 3,0 g de Tris-HCl 0,25M, pH 6,8 e 100 ml de água destilada.

d) Solução D: 3,0 g de Tris-HCl 0,25M; 14,4 g de glicerina 1,95M, pH 8,3 e 100 ml de água destilada.

e) Solução E: 420 mg de persulfato de amônio; 0,075 ml de TEMED; 0,3 g de SDS e 50 ml de água destilada.

f) Coomassie Blue 0,05%: 500 mg de Coomassie Blue; 250 ml de metanol; 70 ml de ácido acético e 680 ml de água destilada.

g) Solução descorante para os géis de poliacrilamida: 250 ml de metanol; 70 ml de ácido acético e 680 ml de água destilada.

h) Tampão de corrida: 100 ml da solução D; 1 g de SDS e 900 ml de água destilada.

3.3.7.2. Preparação dos Géis

a) gel separador

O gel continha 5,0 ml da solução A, 7,5 ml da solução B e 2,5 ml da solução E. A solução foi agitada e desaerada por 5 minutos. Foram aplicados 2 ml em cada tubo. A polimerização ocorreu aos 35 minutos.

b) gel espaçador

Para este gel foram usados 0,36 ml da solução A; 1,62 ml da solução C; 0,18 ml de água destilada + 0,4 ml de glicerol e 0,54 ml da solução E. Esta solução foi agitada e desaerada. Logo em seguida foi aplicado o gel. Para polimerização foi necessária a exposição do gel à luz fluorescente durante 30 minutos.

3.3.7.3. Aplicação de Proteínas Padrões e da Amostra

Foram aplicados alíquotas de 10 e 50 ul das proteínas padrões e das amostras de arroz extraídas em fosfato e Tris.

3.3.7.4. Condições de Desenvolvimento Eletroforético

Nesta corrida foram aplicados 10 mA de corrente durante todo o tempo, que teve a duração de 3 horas.

3.3.7.5. Coloração

O corante usado foi o Coomassie Blue e o tempo foi de 18 horas.

3.3.8. Método de LAEMMLI (1970) Modificado, em Placa

Neste método, o gel separador correspondeu ao descrito no sistema LAEMMLI (1970), enquanto o gel espaçador foi o do sistema DAVIS (1964), com adição de SDS.

3.3.8.1. Preparo do Gel

a) Separador

Foram adicionados 13,0 ml da solução A, 19,5 ml da solução B e 6,5 ml da solução E. A solução foi agitada e desaerada.

Para preparo do "Plug", retirou-se deste gel 2 ml, juntando-se 3 gotas de TEMED, para logo em seguida ser colocado no interior das placas para perfeita vedação. Em seguida, procedeu-se à aplicação do gel separador.

3.3.8.2. Soluções Estoques (DAVIS, 1964)

Solução B: 48,0 ml de HCl 1N; 5,98 ml de Tris; 0,46 ml de TEMED e 100 ml de água destilada.

Solução D: 10 g de acrilamida; 2,5 g de Bis e 100 ml de água destilada.

Solução E: 4,0 mg de riboflavina e 100 ml de água.

Para adaptação ao sistema LAEMMLI, foi adicionado o SDS a 20%.

b) Gel Espaçador

O gel continha 1,0 ml da solução B, 2,0 ml da solução D; 1,0 ml da solução E, 4,0 ml de água destilada e 0,04 ml de SDS a 20%. A solução completa foi desaerada e aplicada. Também foi necessário o uso de luz fluorescente para polimerização do gel.

3.3.8.3. Aplicação das Amostras

Foram aplicadas as alíquotas de 10 e 20 ul das cultivares IAC-1246, IPSL-1070, Agulha, Cartuna, Quatro Meses, Muglin-24, Iguape, Caqui e mistura de BSA, ovoalbumina, mioglobulina e lisozima.

Foram efetuadas outras placas usando-se extratos do embrião, endosperma e grão completo das cultivares que mostraram variação, além de extratos do arroz comercial e parboilizado cru e cozido. Para o arroz cozido foram aplicadas alíquotas de 30 µl.

3.3.8.4. Condições de Desenvolvimento Eletroforético

Foi aplicada a corrente de 10 mA, durante 7 horas.

3.3.9. Estimativa da Mobilidade

Os parâmetros usados para estimar a mobilidade relativa das proteínas foram: distância de migração e o comprimento do gel, após o corte no ponto onde permaneceu o azul de bromofenol no final da corrida.

A fórmula foi a que segue:

$$\text{mobilidade} = \frac{\text{distância de migração da proteína}}{\text{comprimento do gel}}$$

3.3.10. Determinação do Peso Molecular

Para a determinação do peso molecular das subunidades proteicas, tomou-se como referência a posição dos polipeptídeos em relação a de proteínas padrões no gel.

3.3.11. Determinação da Proteína

N-total - Usou-se o método de Kjeldahl para esta determinação, partindo-se da pesagem de 100 mg do arroz moído. Para detecção do N-total proteico, o cálculo foi efetuado pela multiplicação do valor obtido para o nitrogênio, pelo fator 5,9.

3.3.12. Análise de Aminoácidos

As amostras foram hidrolisadas em ácido clorídrico 6N, durante 22 horas, à temperatura de 110°C. Após hidrólise, as amostras foram filtradas, submetidas à evaporação a fim de remover o ácido clorídrico, sendo, em seguida, retomadas com tampão de citrato de sódio pH 2,2.

O aparelho usado foi o analisador de aminoácidos Beckman, modelo 120-C.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Proteínas de Reserva do Grão da Cultivar IAC-1246, Obtidas Através da Eletroforese em Sistema Contínuo

Para determinação do peso molecular (PM) das proteínas de arroz da cultivar acima, foram usadas proteínas com PM conhecido.

4.1.1. Proteínas Padrões que Foram Usadas Para o Cálculo do PM Aparente das Amostras de Arroz da Cultivar IAC-1246

Tabela 1 - Proteínas de peso molecular conhecido.

Padrões	R_m	$PM \times 10^{-3}$
Soro albumina bovina (BSA)	0,22	68,0
Ovalbumina	0,36	43,0
Tripsina	0,64	23,3
Mioglobulina	0,71	17,3
Lisozima	0,80	14,3

As proteínas usadas como padrão, apresentaram PM compreendido entre 14300 e 68000, condicionando boa linearidade, o que se observa através do perfil eletroforético dessas proteínas mostrado na Figura 1 e através da curva obtida na Figura 2.

A curva construída através da R_m e PM das proteínas padrões é observada na Figura 2.

4.1.2. Perfil Eletroforétido do Extrato de Arroz da Cultivar IAC-1246

As subunidades polipeptídicas foram obtidas sob condições dissociantes em sistema contínuo. O perfil eletroforético é mostrado na Figura 3, onde 11 subunidades foram detectadas como bandas coradas nos géis alcalinos (pH 7,2), após submetidos ao processo de coloração e descoloração. Houve predominância de duas bandas, uma com R_m de 0,43 e a outra com 0,59. As demais subunidades, apesar de mais fracamente coradas, tiveram R_m variando entre 0,10 e 0,75, sendo esta última a que apresentou maior mobilidade. As principais subunidades apresentaram os pesos moleculares (PM) de 38000 e 25000 e mais móvel, PM de 16000. Estes resultados são semelhantes aos que foram obtidos por JULIANO e BOULTER (1976) e VILLAREL e JULIANO (1977), trabalhando com outras cultivares. Entretanto, esses autores observaram coloração mais intensa na banda de PM 16000 e menos intensa na banda de PM 25000.

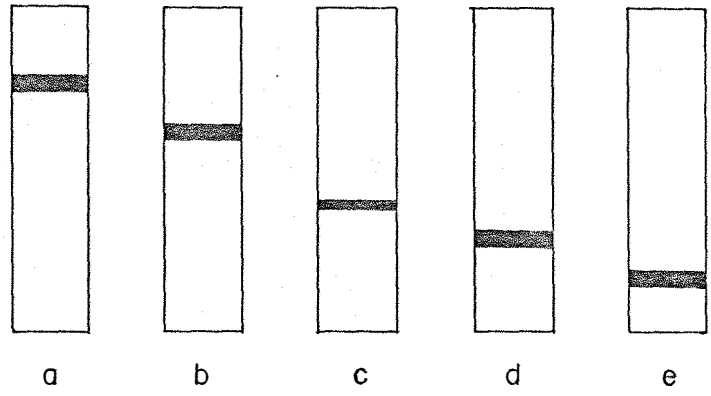


FIGURA 1 - Diagrama das proteínas padrões: (a) BSA; (b) ovalbumina; (c) tripsina; (d) mioglobulina; (e) lisozima.

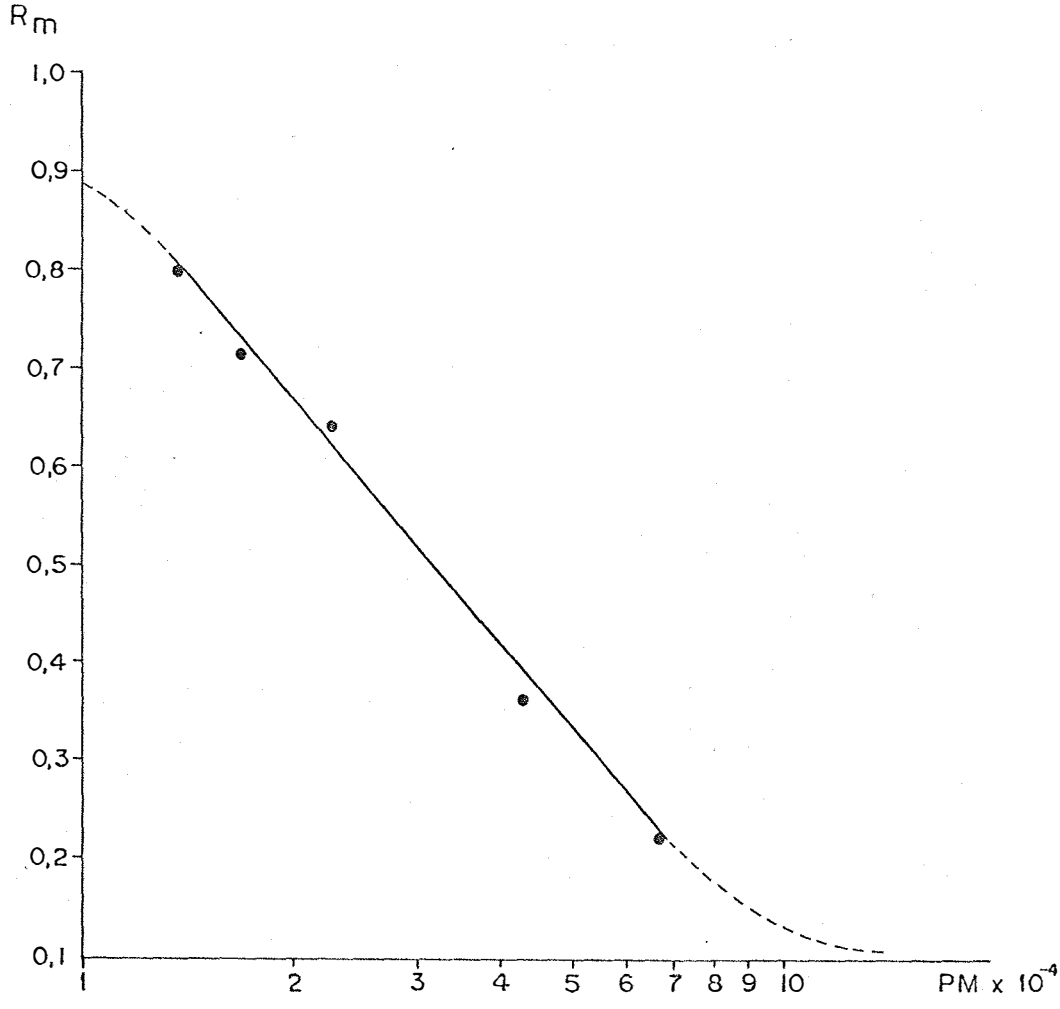


FIGURA 2 - Curva obtida através da R_m e PM das proteínas padrões.

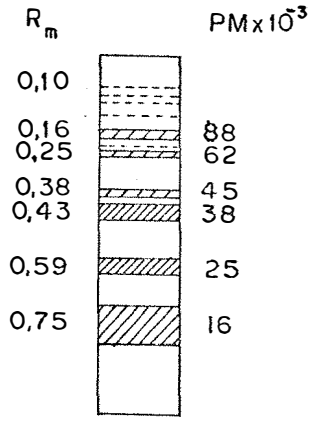


FIGURA 3 - Perfil polipeptídico do extrato do grão de arroz da cultivar IAC-1246, obtido por eletroforese contínua em gel de poliacrilamida, em presença de SDS, pH 7,2.

4.2. Proteínas de Reserva da Cultivar IAC-1246, Obtidas Através da Eletroforese em Sistema Descontínuo

4.2.1. Perfil Eletroforético

O perfil polipeptídico da cultivar IAC-1246, foi também obtido através do sistema citado acima. A Figura 4 mostra o perfil dos padrões de proteínas utilizadas para o cálculo do PM.

O sistema LAEMMLI (1970) mostrou-se muito bom para a finalidade, qual seja, a de permitir a caracterização de subunidades polipeptídicas em grãos de arroz, conforme a Figura 5. Os perfis obtidos foram semelhantes, ainda que se tenha usado extratos diferentes neste sistema, pois houve similaridade quanto ao número de bandas obtidas nas amostras de proteínas de reserva da cultivar IAC-1246. No entanto, é interessante salientar que, apesar desse fato, foi visível uma melhor resolução no gel onde foram usadas amostras nas quais a proteína foi extraída com Tris

HCl. Igual comportamento evidenciou-se também nos padrões de proteínas que tiveram como solvente o Tris-HCl.

A R_m variou de 0,29 a 0,66 e o PM das principais bandas ficou compreendido entre 11300 e 30000.

Não ficou evidenciada desse modo qualquer influência do extrator, muito embora na literatura sejam feitas considerações sobre o assunto, levando em conta também a influência do valor do pH.

Neste trabalho, ocorreu uma pequena variação do pH. Assim, no tampão fosfato, o valor deste ficou entre 7,0 e 7,2 e no Tris-HCl foi de 6,8.

JULIANO e BOULTER (1976) relatam que usando o extrator salino com 0,5% de SDS e 0,6% de β-mercaptoetanol, extraíram 91% da glutelina do endosperma do grão de arroz. No presente trabalho, o SDS foi usado em menor porcentagem, 0,1% para o extrator fosfato de sódio e em maior porcentagem para o extrator Tris-HCl. Quanto ao β-mercaptoetanol, a porcentagem foi bem menor que a citada por estes autores, porém, não diferiu nos extratores citados.

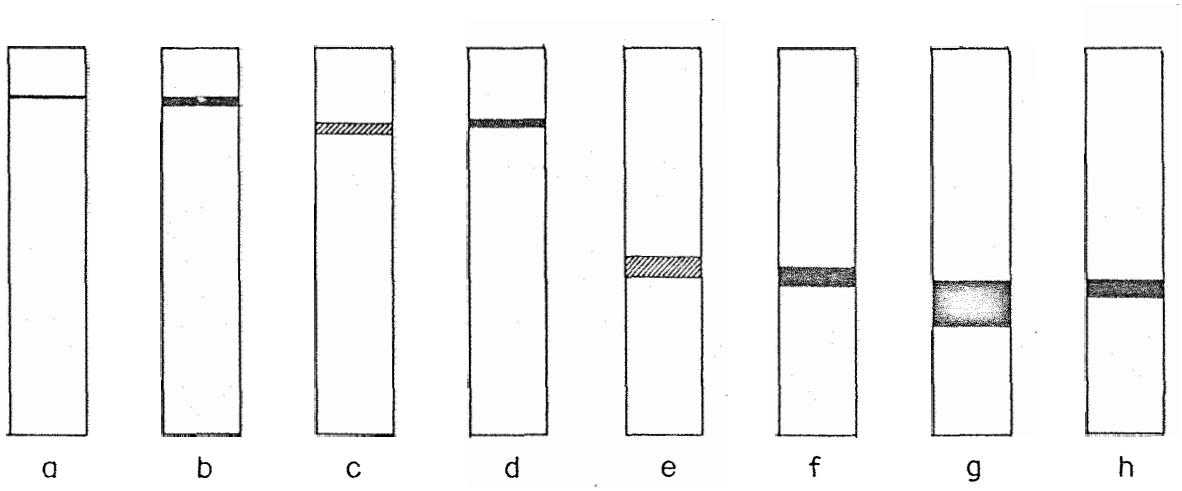


FIGURA 4 - Diagrama dos padrões de proteínas usadas no sistema LAEMMLI (1970). (a) e (b) BSA; (c) e (d) ovalbumina; (e) e (f) mioglobulina; (g) e (h) lisozima, dissolvidas em fosfato e Tris.

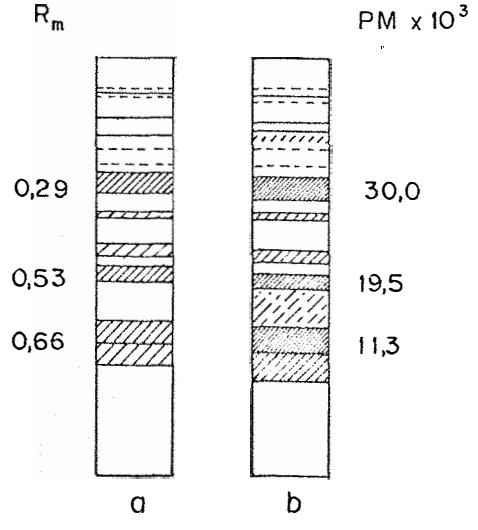


FIGURA 5 - Perfil eletroforético das amostras do arroz IAC-1246: (a) extraída em fosfato de sódio em presença de SDS 0,1%, pH 7,2; (b) extraída em Tris de HCl em presença de SDS 2%, pH 6,8.

4.3. Proteínas de Reserva do Grão das Cultivares: Agulha, Cartuna, Caqui, IAC-1246, IPSL-1070, Iguape, Nuglin e Quatro Meses, Obtidas Através da Eletroforese em Placa

4.3.1. Considerações Gerais

A utilização do gel em placa permite uma melhor visualização dos resultados, podendo-se comparar com maior acuidade das bandas nos perfis proteicos de amostras diferentes, pois as condições da eletroforese são as mesmas.

4.3.2. Análise Comparativa Entre as Oito Cultivares

Através da Figura 6, observa-se que o número de subunidades polipeptídicas não é o mesmo para todas as cultivares. Variações desta natureza podem ser usadas como um caráter de diferenciação quando características morfológicas e anatômicas não forem suficientes para estabelecer diferenças entre cultivares.

O maior número de subunidades polipeptídicas que as cultivares apresentaram foi dez, das quais, sete foram consideradas principais. O menor número observou-se em duas cultivares que diferiram bastante das demais, mostrando apenas sete bandas (Nuglin-24) e cinco bandas (Caqui). 'Agulha' destacou-se por exibir uma subunidade com PM aparente de 25000. É válido ressaltar que esta banda mostrou-se mais intensamente corada em relação a das demais cultivares. JULIANO e BOULTER (1976) consideram que este polipeptídio pode ter maior teor de lisina que os de PM de 35000 e de 14000. Nas demais cultivares, a proporção desta subunidade com PM de 25000,

foi bem menor. Com vistas a este aspecto, a cultivar 'Agulha' é importante por ser portadora da glutelina com um teor mais elevado de um aminoácido que é limitante entre os cereais. Perfis próximos aos que foram encontrados neste trabalho são relatados por pesquisadores do IRRI (1976), os quais usaram um extrator salino, realizando a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS, de amostras da cultivar IR 480-5-9. Foram encontradas como principais subunidades de glutelina as de PM de Ca 38000, 25000 e 16000, sendo que houve maior proporção da primeira em relação às outras. VILLAREL e JULIANO (1978), observaram semelhança em termos de proporção entre aquelas subunidades de glutelina em doze amostras de arroz. Duas delas, entretanto, mostraram diferenças quantitativas.

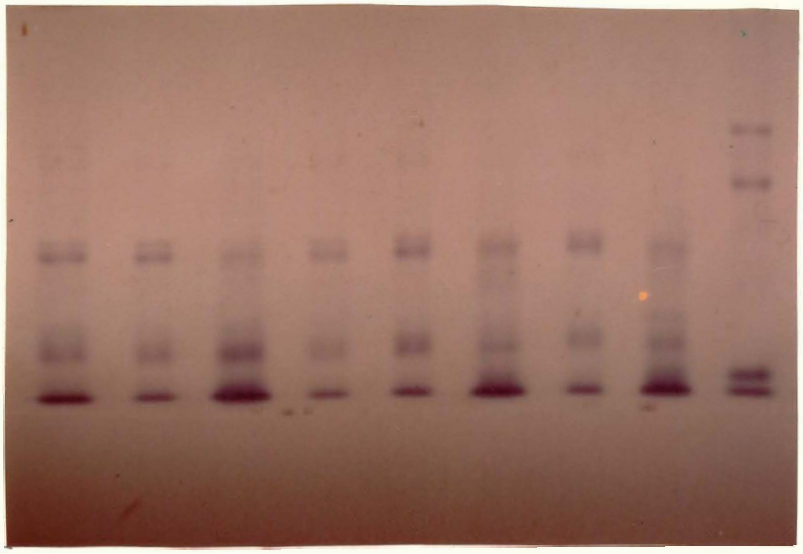
A concentração da subunidade de PM de 35000 foi maior nas cultivares IAC-1246, IPSL-1070, Quatro Meses, Nuglin e Iguape, o que está de acordo com os resultados encontrados por pesquisadores do IRRI (1977) e VILLAREAL e JULIANO (1978).

Nas amostras deste trabalho, a subunidade de menor PM mostrou-se sempre presente.

Na cultivar Nuglin-24, o perfil eletroforético foi qualitativamente diferente do das demais.

Os perfis eletroforéticos obtidos nas oito cultivares no presente trabalho, mostram que as frações proteicas sofrem variação em termos quantitativos e qualitativos.

A



B

FIGURA 6 - Perfil polipeptídico do extrato do grão de oito cultivares, obtido por eletroforese descontínua em gel (em placa) de poliacrilamida em presença de SDS, pH 6,8.
(A) diagrama mostrando as subunidades polipeptídicas das cultivares estudadas.
(B) fotografia da placa.
Cultivares: 1) IAC-1246; 2) IPSL-1070; 3) Agulha; 4) Cartuna; 5) Quatro Meses; 6) Nuglin-24; 7) Iguape; 8) Caqui; 9) Proteínas padrões.

4.3.3. Perfil Polipeptídico de Diferentes Componentes do Grão de Arroz

Os resultados do estudo eletroforético das frações componentes do grão de arroz estão resumidos nas Figuras 7, 8, 9 e 10. Observa-se que o perfil eletroforético do extrato do grão sem casca e endosperma não mostrou muita diferença. Considerando apenas o embrião, notou-se o aparecimento de um grande número de subunidades polipeptídicas.

Para estes testes, foram usadas as cultivares IAC-1246, Agulha, Cartuna e Nuglin-24, sendo que o embrião da última não foi incluído.

4.3.3.1. Cultivar IAC-1246

Perfil Eletroforético do Grão sem Casca

O extrato desta fração mostrou oito bandas, sendo cinco as principais. As mais fortemente coradas foram as de PM de 35000 e 14000, o que se observa na Figura 7.

Perfil Eletroforético do Embrião

Esta fração apresentou muitas bandas, pois foram encontradas catorze subunidades polipeptídicas. Algumas proteínas concentram-se no embrião, conforme relatam SHADI e DJURTOFT (1979), que também encontraram o mesmo número de subunidades obtidas neste trabalho. Os autores afirmam que a maioria destes compostos foram aí identificados. Das subunidades detectadas, cinco foram as principais, inclusive mostraram bastante semelhança quando comparadas com o perfil do extrato sem casca e somente endosperma.

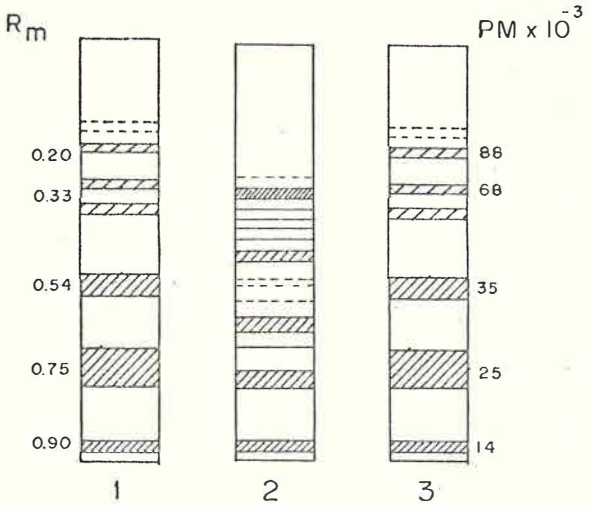
As principais proteínas desta fração são a albumina e a globulina.

Perfil Eletroforético do Endosperma

Quando se observa o perfil desta fração, percebe-se que há uma certa identidade em comparação com o perfil mostrado pelo extrato do grão completo. Era de se esperar que maior número de subunidades aparecessem no endosperma onde também existem subunidades no pericarpo e na camada de aleurona, que, certamente, em virtude da pequena porcentagem de peso em relação ao total, deixam de ser notadas através da eletroforese.

A densitometria poderia acusar a presença de bandas correspondentes a subunidades encontradas em menor proporção.

As principais bandas apresentaram o PM aparente de 35000 e 14000, correspondendo à glutelina. Esta é a proteína mais importante do grão, o que é relatado por CAGAMPANG *et alii* (1966). Muito embora não se tenha trabalhado com glutelina isolada, foram encontradas bandas correspondentes às que VILLAREAL e JULIANO (1978) obtiveram trabalhando com a cultivar IR-8.



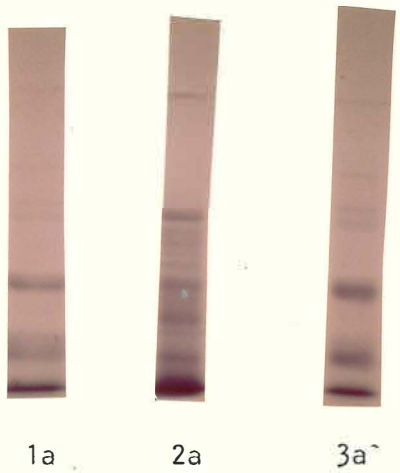


FIGURA 7 - Perfis eletroforéticos de frações do grão de arroz da cultivar IAC-1246.

(1) diagrama do gel, mostrando subunidades polipeptídicas do grão total.

(2) diagrama do gel, mostrando subunidades polipeptídicas do embrião.

(3) diagrama do gel, mostrando subunidades polipeptídicas do endosperma.

(1a, 2a, 3a) fotografias correspondentes aos géis.

4.3.3.2. Cultivar Agulha

Perfil Eletroforético do Grão sem Casca

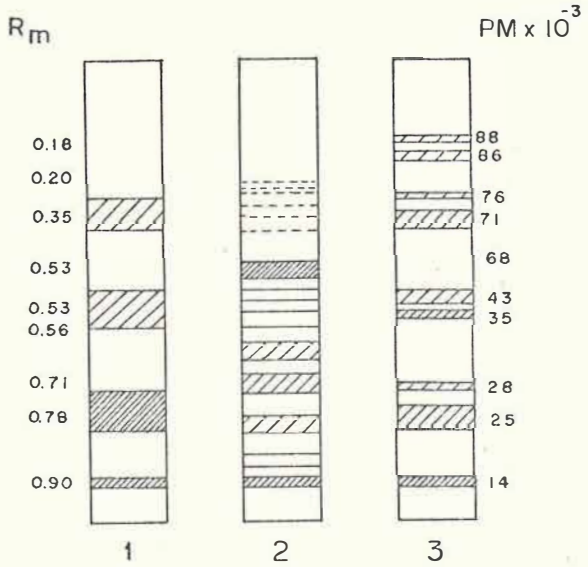
O perfil desta fração mostrou um número menor de subunidades; foram visíveis quatro bandas, com predominância da subunidade com PM de 25000, conforme Figura 8.

Perfil Eletroforético do Embrião

Esta fração apresentou dezessete subunidades. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por VILLAREAL e JULIANO (1978), quando estudaram a mesma fração do grão da cultivar IR-8. Apesar de haver similaridade quanto ao número de subunidades, houve diferença quanto à proporção das mesmas. No presente trabalho, a maior proporção foi observada para a subunidade com PM de 68000, enquanto para aqueles autores, foi a de 14000. A banda com PM de 68000 foi a que apareceu mais fortemente corada no gel, sendo seguida pela banda com o PM de 14000.

Perfil Eletroforético do Endosperma

Nesta cultivar, apareceram nove bandas, das quais, a mais fortemente corada no gel foi a com PM de 35000. Este perfil diferiu bastante do relativo ao grão total, cujo número de bandas foi bem menor. Características especiais apresentadas por esta cultivar foram relatadas no texto e mostradas na Figura 6. Os resultados comprovam que há diferença entre os perfis eletroforéticos desta cultivar com relação a anterior, o que é mostrado na Figura 8.



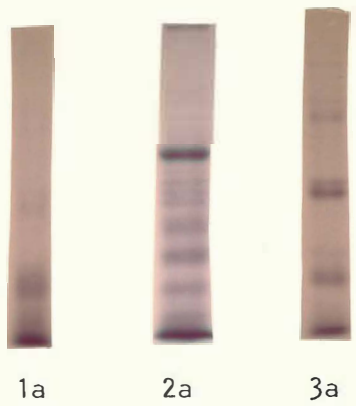


FIGURA 8 - Perfis eletroforéticos de frações do grão da Cultivar Agulha.
(1) diagrama do gel, mostrando subunidades polipeptídicas do grão total.
(2) diagrama do gel, mostrando subunidades polipeptídicas do embrião.
(3) diagrama do gel, mostrando subunidades polipeptídicas do endosperma.
(1a, 2a, 3a) fotografias correspondentes aos géis.

4.3.3.3. Cultivar Cartuna

Perfil Eletroforético do Grão sem Casca

O perfil desta fração revelou a presença de nove bandas nesta cultivar, diferindo, portanto, quanto ao número de subunidades em relação à IAC-1246 e Agulha. Foi perceptível que a subunidade com PM de 14000 foi menos concentrada nesta cultivar, mostrando similaridade com a fração endosperma da cultivar Nuglin-24. A subunidade com PM de 35000 apresentou a mesma proporção que aquela encontrada no endosperma da cultivar Agulha. Estes resultados sugerem que entre as cultivares pode ocorrer alguma semelhança em diferentes frações em relação à presença de determinados polipeptídios.

Perfil Eletroforético do Embrião

Esta cultura foi a que apresentou como principal subunidade polipeptídica a de PM 14000, diferindo de todos os componentes do grão das oito cultivares. Resultados idênticos foram obtidos por MANDAC e JULIANO (1978), os quais observaram que a principal subunidade foi a de PM 17000, e por VILLAREAL e JULIANO (1978), a de PM 16000. No entanto, estes últimos autores, referem-se à glutelina, enquanto que os anteriores referem-se à prolamina. De acordo com a literatura, tanto a glutelina como prolamina apresentam subunidades com semelhante PM.

Os extratos de diferentes frações mostram perfis diversos de acordo com SHADI e DJURTOFT (1979), inclusive quando estes afirmam que algumas proteínas que existem no grão total não desaparecem noutros extratos, incluindo o embrião. Quanto ao número de subunidades, no presente traba-

lho foram encontradas cerca de doze bandas.

Perfil Eletroforético do Endosperma

Ao comparar este perfil com o da cultivar IAC-1246, foi possível observar neste componente uma certa similaridade no tocante ao número de subunidades obtidas através da eletroforese em gel de poliacrilamida em presença do SDS, pois foram detectadas oito bandas.

IRRI (1976) relata a presença de doze bandas nas cultivares IR-480-5-9 e IR-26, em proteínas purificadas. A subunidade cuja banda foi mais fortemente corada no gel foi a com PM de 35000, em semelhança às demais cultivares. Através da Figura 9 observam-se as características apresentadas por esta cultivar.

4.3.3.4. Cultivar Nuglin-24

Perfil Eletroforético do Grão sem Casca

Cinco bandas foram detectadas no extrato desta fração. Este resultado diferiu das outras cultivares. A banda que se apresentou mais fortemente corada no gel, tinha o PM de 14000, o que, praticamente, não diferiu das demais.

Perfil Eletroforético do Endosperma

Maior número de subunidades foi evidenciado no extrato deste componente do grão, pois foram observadas onze bandas das quais foram predominantes as com PM de 35000, 25000 e 14000. A Figura 10 mostra o perfil apresentado por esta cultivar.

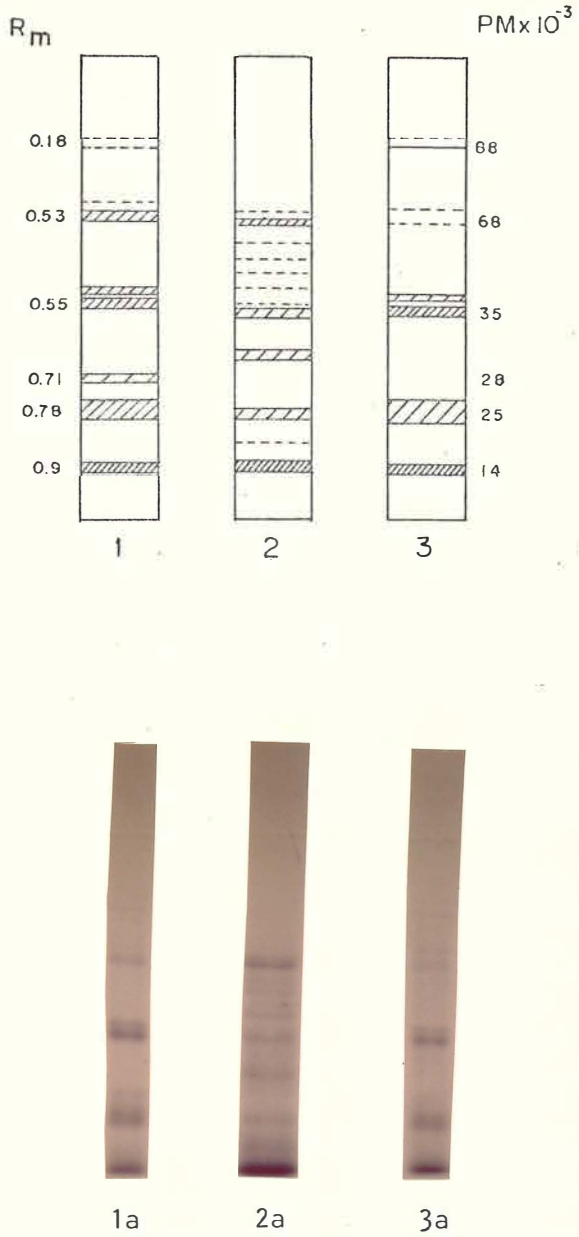


FIGURA 9 - Perfis eletroforéticos das frações do grão da cultivar Cartuna.
(1) diagrama do gel, mostrando subunidades polipeptídicas do grão total.
(2) diagrama do gel, mostrando subunidades polipeptídicas do embrião.
(3) diagrama do gel, mostrando subunidades polipeptídicas do endosperma.
(1a, 2a, 3a) fotografias correspondentes aos géis.

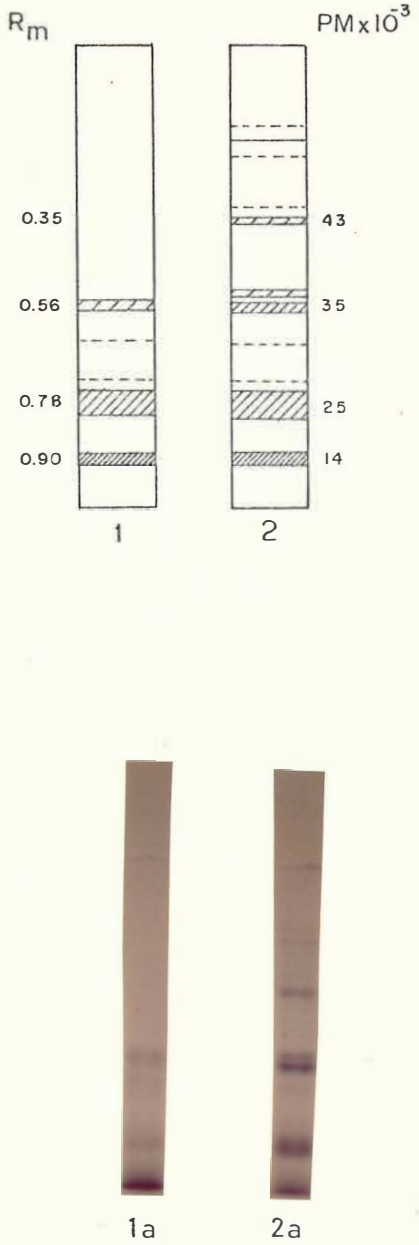


FIGURA 10 - Perfis eletroforéticos das frações do grão da cultivar Nuglin-24.
(1) diagrama do gel, mostrando subunidades polipeptídicas do grão total.
(2) diagrama do gel, mostrando subunidades polipeptídicas do endosperma.
(1a, 2a) fotografia dos géis.

4.4. Influência do Cozimento na Diluição da Proteína do Grão de Arroz Comum e Parboilizado

O perfil eletroforético obtido dos extratos de arroz comum e parboilizado antes e após o cozimento é mostrado na Figura 11. Os dados revelam que não há diferença quanto ao número de subunidades polipeptídicas presentes nos géis correspondentes aos dois tipos.

4.5. Determinação de Proteína

4.5.1. Proteína Total

Os resultados da análise de proteína total, efetuada nas cultivares estudadas estão sumarizados na Tabela 2. Os dados revelam que existe uma variação quanto ao teor proteico que foi detectado através do método de Kjeldahl. Este método, de acordo com JOHNSON e CRANEY (1971), apesar de dispendioso e lento, ainda é um dos mais usados para determinação de proteína total, principalmente em grãos. Os dados que constam da Tabela 2 mostram que há variação quanto ao teor de proteína total contida no grão de diferentes cultivares. Esta variação, no entanto, não foi muito acentuada. As cultivares que mostraram teores mais elevados foram a Nuglin-24 e a Agulha, enquanto os menores teores foram observados na IAC-1246, Caqui e Quatro Meses. Este é um aspecto valioso quando se pensa em efetuar o melhoramento qualitativo na proteina do grão de arroz. Isto se deve ao fato de haver, na maioria dos casos, uma correlação negativa entre a porcentagem de proteína no grão e o rendimento do grão (MONYO e SUGYAMA, 1978, 1979).

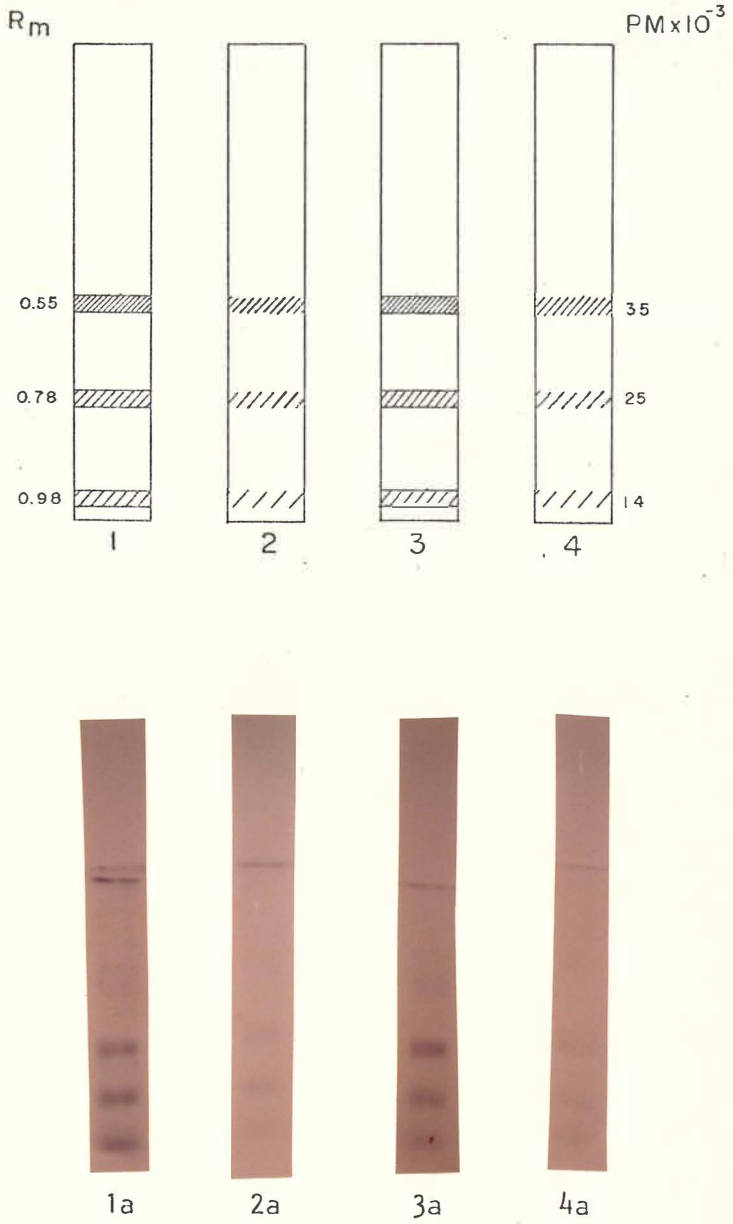


FIGURA 11 - Perfil eletroforético de extratos de arroz comercial.
(1) parboilizado cru; (2) comum cozido; (3) comum cru; (4) parboilizado cozido.
(1a, 2a, 3a, 4a) fotografia correspondente aos géis.

Tabela 2 - Quantidade de N-total e proteína no grão de arroz de oito cultivares.

Cultivar	N-Total (g N/100 g farinha)	Proteína (g P/100g farinha)[a/]
IAC-1246	1,62	9,55
Agulha	1,97	11.61
Cartuna	1,80	10,68
Caqui	1,57	9,26
IPSL-1070	1,85	10,91
Iguape	1,78	10,50
Nuglin-24	2,17	12,78
Quatro Meses	1,56	9,20

[a/] calculado a partir do N-total multiplicado pelo fator 5,9.

HARN (1976) conseguiu mutantes de arroz com alto rendimento e alto teor proteico. A cultivar Nuglin-24 poderia ser melhor estudada por ter apresentado a maior porcentagem proteica. Muitos fatores respondem pela variação no teor proteico dos grãos, merecendo destaque os ambientais (CAGAMPANG *et alii*, 1966; COFFMAN e JULIANO, 1979; SHADI e DJURTOFT, 1979). Por outro lado, nem sempre são obtidos resultados com variação no teor proteico em cereais, pois JONES e BECKWITH (1970), trabalhando com três híbridos de sorgo, não encontraram qualquer alteração no teor de proteína do grão.

Com cultivares de arroz brasileiras, ANDO *et alii* (1979) obtiveram linhagens com maior teor proteico, acompanhado por aumento de rendimento. Apesar deste resultado, a maioria das linhagens obtidas não mostrou esta correlação positiva entre rendimento e teor proteico.

Os resultados mostrados na Tabela 3 evidenciam não somente variação entre as cultivares, mas também nos componentes do grão. Para a cultivar IAC-1246, os dados revelam um teor proteico no endosperma da ordem de 94,0%, valor este considerado muito alto, mas de acordo com JULIANO e BOULTER (1976) e VILLAREAL e JULIANO (1978), que relatam ser a glutelina a principal proteína de reserva e encontrada naquele tecido, constituindo mais de 80%.

A cultivar Agulha apresenta um valor percentual aproximadamente igual a 93,5%. Com relação à Cartuna , houve uma diferença muito grande, pois o teor encontrado no endosperma foi de apenas 74%, o que mostra que nesta cultivar há uma concentração maior no embrião e camada de aleurona, o que através do processo de beneficiamento, é perdido.

Tabela 3 - Quantidade de N-total e proteína nos componentes do grão de arroz de quatro cultivares.

Cultivar	Componente	% N	% Proteína[a/]
IAC-1246	Total	1,62	9,55
	Endosperma	1,53	8,99
Agulha	Total	1,97	11,61
	Endosperma	1,84	10,86
Cartuna	Total	1,81	10,68
	Endosperma	1,33	7,88
Nuglin-24	Total	2,17	12,78
	Endosperma	2,02	11,88

[a/] calculada a partir do N-total multiplicado pelo fator 5,9.

Para a cultivar Nuglin-24, os valores encontrados foram intermediários, sendo da ordem de 92,95% o teor de proteína total no endosperma.

Através destes resultados, pode-se concluir que as cultivares IAC-1246 e Agulha são as que sofrem menor perda da proteína total após serem submetidas ao beneficiamento.

O arroz integral mantém o seu teor total de proteína, mas o beneficiamento é sempre usado a fim de aumentar sua digestibilidade e palatabilidade, conforme afirmam MITSUDA *et alii* (1966). Em virtude disto, é importante selecionar as cultivares que apresentam o maior teor proteico no endosperma, não ocorrendo perdas desta natureza.

Em termos gerais, a cultivar Nuglin-24 destacou-se das demais, atingindo um teor de proteína total próximo a 13%.

Os valores encontrados para estas cultivares confirmam resultados que constam da literatura, muito embora nenhuma citação é referente às cultivares que foram estudadas neste trabalho. Os valores obtidos em pesquisas efetuadas com diferentes cultivares foram diversos, entre os quais, 6,5 a 13,3% (JULIANO *et alii*, 1964); 9 a 16,9% (CAGAMPANG *et alii*, 1966); 10,6 (PADHYE e SALUNKHE, 1979). O teor médio é considerado 8%, segundo COFFMAN e JULIANO (1979).

Variações no teor de proteína têm sido observadas até mesmo de uma colheita para outra, dentro da mesma cultivar (JULIANO *et alii*, 1966).

Tabela 4 - Quantidade de N-total e proteína no arroz comum e parboilizado.

Arroz	N - Total (g N/100 g farinha)	Peso (g/100 grãos)	Proteína Total[a/] (100 g)
Comum cru	1,30	1,87	8,14
Parboilizado cru	1,33	2,10	8,33
Comum cozido	0,45	4,92	2,84
Parboilizado cozido	0,45	4,67	2,84

[a/] calculada a partir do N-total multiplicado pelo fator 5,9.

Os dados relativos ao teor de N-total e proteína total nos dois tipos de arroz, estão sumarizados na Tabela 4, acima, onde se percebe que o arroz, quando submetido ao cozimento, experimenta um sensível decréscimo no teor de proteína.

Analisando-se estes tipos, não se verificou qualquer diferença entre ambos em relação ao teor proteico, tanto antes como após o processo. A diferença observada foi quanto ao peso de 100 grãos antes e após o cozimento.

O processo de parboilização não interfere no teor proteico dentro do grão. Visa apenas aumentar o teor vitamínico pela migração destes compostos, do embrião e do tegumento para o endosperma (UHLIG e HERBERLE, 1980; SILVA, 1980).

Correlacionando o cozimento e o teor de proteína do arroz comum e do parboilizado, verifica-se que houve uma diluição equivalente da proteína, sendo 65,1% e 65,9%, respectivamente.

Foi observada uma diferença na amostra de arroz parboilizado quanto ao período necessário para o cozimento, requerendo 10 minutos a mais que o arroz comum, fato relatado por KURIEN *et alii* (1964), quando estudaram o efeito da parboilização do arroz em relação à qualidade e aumento de volume do grão. Os autores observaram ainda que o arroz comum sofre alterações dimensionais em consequência do cozimento, enquanto o parboilizado oferece certa resistência. Naturalmente, é de grande importância o aspecto apresentado pelo arroz cozido quando este conserva a forma do grão.

Mesmo que se trate de grãos não parboilizados, há variação do grau máximo de hidratação do amido, conforme resultados obtidos por Mac LEAN *et alii* (1978), o que depende da razão amilose/amilopectina contida no endosperma.

Muito embora o arroz parboilizado não seja portador de um teor mais elevado de proteína, é considerado por UHLIG (1980) como uma das fontes alimentícias mais importantes no Brasil e no mundo, especialmente em relação às vitaminas do complexo B.

O valor nutricional dos grãos é sempre relativo ao produto cru. No entanto, é interessante considerar a diluição, notadamente para a proteína, que no caso requereria que se ingerisse um volume 3 vezes maior para corresponder ao teor proteico real. GRAHAM (1977) tece comentário sobre redução da qualidade nutricional dos alimentos em decorrência do pro-

cesso de cozimento.

4.6. Análise dos Aminoácidos

4.6.1. Teor de Aminoácido das Amostras de Arroz das Cultivares IAC-1246, Cartuna, Nuglin-24 e Agulha

Os resultados da análise de aminoácidos das amostras de arroz estão sumarizados na Tabela 5. Os dados revelam uma variação no teor de alguns aminoácidos e equivalência no teor de outros.

A lisina é o aminoácido considerado mais limitante para o arroz (BRESSE-JONES *et alii*, 1948; BRESSANI *et alii* (1968), COFFMMAN e JULIANO, 1979). No presente trabalho, este foi o aminoácido cujos teores variaram de 2,70 a 3,33 em moles %. A cultivar IAC-1246 foi a que apresentou o mais elevado teor, de acordo com valores obtidos por JULIANO *et alii* (1964), VILLAREAL e JULIANO (1978) e BRADBURY *et alii* (1980a e 1980b). No arroz e em outras gramíneas, foram citados valores bem maiores, principalmente em mutantes. JULIANO e BOULTER (1976) relatam uma subunidade de proteína de reserva com alto teor em lisina.

A treonina foi o segundo aminoácido limitante (BRESSANI *et alii*, 1968) e o seu teor não sofreu variação nas cultivares IAC-1246, Nuglin-24 e Agulha, sendo mais elevado na cultivar Cartuna, valor este também obtido por MANDAC e JULIANO (1978) na prolamina da cultivar IR-26, aos quatro dias após o florescimento.

O ácido glutâmico aparece como o de maior teor entre os ami-

noácidos, o que é uma característica das proteínas de reserva dos cereais e entre as cultivares, a Agulha atingiu a maior porcentagem, enquanto a IAC-1246 mostrou a menor porcentagem.

O ácido aspártico mostrou pouca variação, sendo maior da cultivar Nuglin-24 e menor na Cartuna, concordando com os resultados relatados na literatura.

A histidina não apresentou variação muito grande entre as cultivares, sendo a IAC-1246 a que exibiu porcentagem ligeiramente maior, sendo contudo, semelhante aos valores encontrados por VILLAREAL e JULIANO (1978).

A glicina e leucina mostraram valores próximos nas cultivares, sendo que a primeira teve porcentagens menores na Nuglin-24 e Agulha.

A alanina não mostrou variação entre as cultivares testadas.

A valina apresentou pouca variação, enquanto a Cartuna exibiu teor mais elevado em relação às demais. JULIANO e BOULTER (1976) e VILLAREAL e JULIANO (1978) encontraram valores menores, porém, para BRADBURY *et alii* (1980), houve similaridade quanto aos resultados.

Para a serina, os valores foram idênticos para as quatro cultivares.

Fenilalanina praticamente não sofreu variação quanto ao teor encontrado nas cultivares, de acordo com os valores obtidos pelos autores citados.

A isoleucina mostrou o mesmo comportamento observado em fenilalanina.

A variação em tirosina foi pequena; teor mais elevado foi encontrado na cultivar IAC-1246. Estes valores foram maiores que os encontrados por BRADYBURY (1980).

O melhoramento genético em cereais é uma importante meta, e com vistas a este aspecto, MURPHY e DALBY (1971), comparando o endosperma do milho comum e opaco-2, observaram que o gene deste último é responsável pelo decréscimo da fração prolamina (zeína) e um aumento da glutelina, fração rica em lisina.

Considerando o que foi relatado sobre este aminograma, percebe-se que há uma variação pequena de alguns aminoácidos nas cultivares em estudo. Em contrapartida à situação em milho, a prolamina no arroz já é baixa, portanto é pequena a possibilidade de um decréscimo adicional desta fração. Ainda que isto ocorresse, o efeito no teor de lisina na proteína do grão seria muito pequeno. Uma estratégia mais apropriada para o melhoramento do teor de lisina na proteína do arroz poderia ser a manipulação das composições polipeptídicas de outras frações. O presente trabalho indicou a existência de variação na composição polipeptídica de glutelina, mesmo entre pequeno número de cultivares de arroz examinadas.

Tabela 5 - Composição em aminoácidos de hidrolisados de proteínas do endosperma das cultivares de arroz IAC-1246, Cartuna, Nuglin-24 e Agulha.

Aminoácidos	CULTIVARES							
	IAC-1246		Cartuna		Nuglin-24		Agulha	
	moles(%)	g/100g P	moles(%)	g/100g P	moles(%)	g/100g P	moles(%)	g/100g P
Lisina	3,33	3,87	3,15	3,67	2,89	3,40	2,70	3,13
Histidina	2,27	2,82	1,87	2,35	1,91	2,40	1,76	2,19
Arginina	4,82	6,81	5,16	7,33	5,17	7,40	4,43	6,26
Ác. Aspártico	9,40	9,80	8,45	8,84	10,04	10,57	9,86	10,27
Treonina	3,89	3,64	4,11	3,78	3,88	3,60	3,98	3,64
Serina	5,79	4,56	5,30	4,19	5,54	3,20	5,36	4,23
Ác. Glutâmico	15,79	18,46	17,63	20,70	17,12	20,23	18,82	22,00
Prolina	5,05	4,43	5,34	4,72	4,87	4,32	5,22	4,60
Glicina	9,12	4,71	9,00	4,67	8,47	4,42	8,54	4,41
Alanina	8,71	5,60	8,86	5,72	8,53	5,55	8,47	5,45
Valina	7,60	6,81	8,09	7,28	7,91	7,18	7,78	6,98
Isoleucina	4,35	4,46	4,61	4,74	4,56	4,72	4,46	4,57
Leucina	9,63	9,86	9,59	9,87	9,79	9,98	9,51	9,74
Tirosina	4,12	6,09	3,15	5,56	3,73	5,56	3,46	5,11
Fenilalanina	4,68	6,47	4,80	6,52	4,84	6,52	4,88	6,50

g/100g P = g/100 g de proteína

As cultivares analisadas quanto ao teor de aminoácidos diferiram em algumas e mostraram certa similaridade em outras.

5. CONCLUSÕES

(a) A composição polipeptídica de cultivares de arroz pode variar quantitativa e qualitativamente.

(b) As principais subunidades polipeptídicas do grão de arroz são as de PM de 14000, 25000 e 35000.

(c) O teor proteico diferiu entre as oito cultivares estudadas de 9,20% a 12,8% e de 8,1% a 8,3% nas amostras de arroz comercial parboilizado e beneficiado.

(d) Entre as cultivaves examinadas, a Agulha apresentou maior proporção da subunidade com PM de 25000, apresentando pois a possibilidade de ser uma boa fonte de aminoácido essencial, lisina.

(e) Este trabalho demonstra que os métodos eletroforéticos podem ser usados para detectar diferenças na composição polipeptídica entre amostras de arroz, inclusive variedades tradicionais, linhagens novas produzidas em programas de melhoramento e também amostras empregadas em estudos nutricionais.

6. LITERATURA CITADA

ANDERSON, R.L., 1980. Analysis of soy protein disc gel electropherograms. *Cereal Chemistry*, St. Paul, *57*(3): 155-158.

ANDO, A.; O.J. CROCOMO; A. TULMANN NETO e J.O.M. MENTEN, 1979. Melhoramento proteico do arroz (*Oryza sativa*). 1. Resultados preliminares. *In*: *Reunião de Técnicos em Rizicultura do Estado de São Paulo*, I. Anais. Campinas. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. p. 271-276.

ANGLADETE, H.A., 1969. *El arroz*. Madrid. Blume. 867 p.

BAKER, H.G., 1968. *Las plantas y la civilizacion*. Mexico. Agência Regional para el Desarrollo Internacional. 193 p.

BHATTACHARYA, K.R., 1969. Breakage of rice during milling and effects of parboiling. *Cereal Chemistry*, St. Paul, *46*(5): 478-485.

BIETZ, J.A. e J.S. WALL, 1975. The effects of various extractants on the subunit composition and associations of wheat glutenin. *Cereal Chemistry*, St. Paul, *52*(2): 145-155.

BRADBURY, J.H.; J.G. COLLINS e N.A. PYLIOTIS, 1980a. Methods of separation of the major histological components of rice and characterization of their proteins by amino acid analysis. *Cereal Chemistry*, St. Paul, *57* (2): 133-137.

BRADBURY, J.H.; J.G. COLLINS e N.A. PYLIOTIS, 1980b. Amino acid analysis of proteins of the major histological components of high-protein rice. *Cereal Chemistry*, St. Paul, *57*(2): 343-346.

BANKER, G.A. e C.W. COTMAN, 1972. Measurement of free electrophoretic mobility and retardation coefficient of protein-sodium dodecyl sulphate complexes by gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, *247*: 5856-5861.

BARKER, R.D.J.; E. DERBYSHIRE; A. YARWOOD e D. BOULTER, 1976. Purification and characterization of the major storage proteins of *Phaseolus vulgaris* seeds, and their intracellular and cotyledonary distribution. *Phytochemistry*, Oxford, *15*: 751-757.

BRESSANI, R. e G. ELIAS, 1979. The wold protein and nutritional situation. *In*: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, *Seed Protein Improvement by Nuclear Techniques*. Vienna. p. 191-198.

BRESSE-JONES, D.; A. CALDWELL e K.D. WIDNESS, 1948. Comparative grow-promoting values of the proteins of cereal grains. *Journal of Nutrition*, Baltimore, *35*: 639-649.

CAGAMPANG, G.B.; L.J. CRUZ; S.G. ESPIRITU; R.G. SANTIAGO e B.O. JULIANO, 1966. Studies on the extraction and composition of rice proteins. *Cereal*

Chemistry, St. Paul, *43*(2): 145-155.

CAGAMPANG, G.B.; A.A. PERDON e B.O. JULIANO, 1976. Changes in salt-soluble protein of rice during grain development. *Phytochemistry*, Oxford, *15*: 1425-1429.

COBLEY, L.S., 1957. *An introduction of the Botany of tropical crops*. Toronto. Longman, Green and Co. 357 p.

COFFMAN, W.R. e B.O. JULIANO, 1979. Seed protein improvement in rice. *In*: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, *Seed Protein Improvement in Cereals and Grain Legumes*. Vienna. Vol. II, p. 261-277.

CONNOR, M.A.; R.M. SAUNDERS e G.O. KOHLER, 1976. Rice bran protein concentrates obtained by wet alkaline extraction. *Cereal Chemistry*, St. Paul, *53*(4): 488-496.

COWAN, J.R., 1973. The seed. *Agronomy Journal*, Madison, *65*(1): 1-4.

CROCOMO, O.J.; E. DERBYSHIRE; A. YARWOOD e D. BOULTER, 1978. Storage protein of *Pisum arvense* L. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, *1*: 143-158.

CROCOMO, O.J.; T.S.G. LEE; E. DERBYSHIRE e D. BOULTER, 1980. *In*: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, *Seed Protein Improvement in Cereals and Grain Legumes*. Vienna. p. 217-229.

CURTIS, M.W., 1979. Studies and critique of Amido Black 10B, Coomassie Blue R, and Fast Green FCF as stains for proteins after polyacrylamide gel

electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, London, *96*: 263-287.

DAVIS, B.J., 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum protein. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *121*: 404-427.

DATYNER, A. e E. FINNIMORE, 1973. A new staining method for assay of proteins on polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, London, *52*: 44-55.

DERBYSHIRE, E. e D. BOULTER, 1975. Isolation of legumin-like protein from *Phaseolus aureus* and *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry*, Oxford, *15*: 411-414.

DERBYSHIRE, E. e D. BOULTER, 1976. Review. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry*, Oxford, *15*: 3-24.

EGGUM, B.O. e B.O. JULIANO, 1975. Higher protein content from nitrogen fertilizer application and nutritive value of milled-rice protein. *Journal of the Science and Food Agriculture*, London, *26*: 425-427.

ELIAS, L.G.; R. JARQUIN; R. BRESSANI e C. ALBERTAZ, 1968. Suplementacion del arroz con concentrados proteicos. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, Caracas, *18*: 27-38.

GOMEZ-BRENES, R.A.; M.H. RUILOBA e R. BRESSANI, 1977. Mejoramiento tecnologico de la calidad proteinica del arroz. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, Caracas, *27*: 99-123.

GORDON, A.H., 1972. *Electrophoresis of protein in polyacrylamide and starch*

gels. Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Oxford. North-Holland Publishing Company. 149 p.

GRAHM, G.G., 1977. Factors affecting the human nutritional value of cereal grains. *In*: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, *Nutritional evaluation of cereal mutants*. Vienna. p. 1-13.

GRANT, D.R. e J.M. LAWRENCE, 1964. Effects of sodium dodecyl sulfate and other dissociating reagents on the globulins of peas. *Archives of Biochemistry and Biophysiscs*, New York, *108*: 552-561.

HARN, C.; J.L. WON e K.T. CHO, 1975. The agronomic characters of a high protein rice mutant. *In*: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, *Breed for seed protein improvement using nuclear techniques*. Vienna. p. 17-22.

HEDRICK, J.L. e A. SMITH, 1968. Size and charg isomer separation and estimation of molecular weights of protein by disc gel electrophoresis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, New York, *126*: 155-164.

HEISER, JR., C.B., 1977. *Sementes para a civilização*. São Paulo. Companhia Editora Nacional. 253 p.

HOUSTON, D.F.; A. MOHAMMAD e N.E.A. HERNANDEZ, 1964. High-sulfur seed proteins. *Cereal Chemistry*, St. Paul, *41*: 427-429.

HOUSTON, D.F. e A. MOHAMMAD, 1970. Purification and partial characterization of major globulin from rice endosperm. *Cereal Chemistry*, St. Paul, *47*: 5-12.

HOUSTON, D.F.; T. IWASARI; A. MOHAMMAD e L. CHEN, 1968. Radial distribution of protein by solubility classes in the milled rice kernel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, *16*(5): 720-724.

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE, 1975. Annual report for 1974. Los Baños, Phillipinnes. p. 102-103.

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE, 1976. Annual Report for 1975. Los Baños, Phillipinnes. p. 120-125.

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE, 1977. Annual Report for 1976. Los Baños, Phillipinnes. p. 70.

ISMACHIN, M., 1976. Rice seed protein improvement through mutation breeding techniques. *In*: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Evaluation of Seed Protein by Mutation Breeding*. Vienna. p. 143-144.

JOHNSON, R.M. e C.E. CRANEY, 1971. Rapid biuret method for protein in grain. *American Association of Cereal Chemistry*, St. Paul, *45*: 276-283.

JONES, R.W. e A.C. BECKWITH, 1970. Proximate composition and protein of three grain sorghum hybrids and their dry-mill fraction. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Easton, *18*(1): 33-36.

JULIANO, B.O.; G.M. BAUTISTA; I.C. LUGAY e A.C. REYS, 1964. Studies on the physicochemical properties of rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, *12*(2): 111-138.

JULIANO, B.O., 1966. Physicochemical data on the rice grain. *Technical*

Bulletin of International Rice Research Institute, Phillipinnes, *6*: 1-150.

JULIANO, B.O.; A.A. ANTONIO e B. ESMANA, 1973. Effects of protein content on the distribution and properties of rice protein. *Journal of the Science and Food Agriculture*, London, *24*: 295-306.

JULIANO, B.O. e D. BOULTER, 1976. Extraction and composition of rice endosperm glutelin. *Phytochemistry*, Oxford, *15*: 1601-1606.

KAUL, A.K.; M.R. KHAN; M.H. CHOUDHURY e M.A.Q. SHAIKH, 1978. Nutritional and cooking quality characteres of some local rice cultivars of Bangladesh. *In*: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Seed Protein Improvement by Nuclear Techniques*. Vienna. p. 167-179.

KENT, N.L., 1966. Technology of cereals with special refference to wheat. Frankfurt. Pergamon Press. 262 p.

KENT-JONES, D.W. e A.J. AMOS, 1956. *Quimica moderna de los cereales*. Madrid. Aguilar. 802 p.

KURIEN, P.P.; R.R. MURTY; H.S.R. DESIKACHAR e V. SUBRAHMANYAN, 1964. Effects of parboiling on the swelling quality of rice. *Cereal Chemistry*, St. Paul, *41*(1): 16-22.

LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage T_4. *Nature*, London, *227*: 680-685.

LEHNINGER, A.L., 1976. Proteins: behaviour in solution. *In*: LEHNINGER, A.L.

Biochemistry. New York, N.Y. p. 129-146.

LUSE, R.A. e K.O. RACHIE, 1979. Seed protein improvement in tropical food legumes. *In*: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Seed Improvement by Nuclear Techniques*. Vol. II. Vienna. p. 87-104.

MacLEAN, W.C.JR.; G.L. KLEIN; G.L. ROMANADE; E. MASSA e G.G. GRAHM, 1978. Protein quality of convencional and high protein rice and digestibility of glutinous and non-glutinous rice by preschool children. *Journal of Nutrition*, Baltimore, *108*: 1740-1747.

MANDAC, B.E. e B.O. JULIANO, 1978. Properties of prolamina in mature and developing rice grain. *Phytochemistry*, Oxford, *17*: 611-614.

MARANHÃO: Sede do IV Congresso Nacional de Economia Agrícola, 1979. *Lavoura Arrozeira*, Porto Alegre, *32*(317): 4-8.

MINETTI, M.; T. PETRUCCI; S. CATTANEO; F. POCCHIARI e V. SILANO, 1973. Studies of the differential staining of wheat albumins, globulins and gliandins in polyacrylamide gel by aniline Blue-Black. *Cereal Chemistry*, St. Paul, *50*: 198-209.

MITRA, O.N. e N.B. DAS, 1971. Protein quality of the high yielding varieties of rice. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Easton, *19*(5): 927-934.

MITSUDA, H.; K. YASUMOTO; K. MURAKAMI; T. KUSANO e H. KISHIDA, 1967. Protein bodies in rice endosperm. *Memoirs of the College of Agriculture*, Kioto, *92*: 17-26.

MOD, R.R.; E.J. CONKERTON; R.L. ORY e F.L. NORMAND, 1978. Hemicellulose composition of dietary fiber of milled rice and rice bran. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Easton, *26*(5): 1031-1035.

MONYO, J.H. e T. SUGYAMA, 1978. Improvement of seed protein in rice through mutation breeding. *In*: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Seed Improvement by Nuclear Techniques*. Vienna. p. 181-189.

MONYO, J.H.; T. SUGYAMA e A.N. KIHUPI, 1979. Potentially high-yielding and high-protein rice in induced mutation breeding. *In*: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Seed Protein Improvement in Cereal and Grain Legumes*. Vol. II. Vienna. p. 293-301.

MURPHY, J.J. e A. DALBY, 1971. Changes in protein fractions of developing normal and opaque-2 maize endosperm. *Cereal Chemistry*, St. Paul, *48*: 336-349.

NAGARAJHA, S.; M.M.M. JAUFFER e S.M. WILLENBER, 1975. Timing of nitrogen application its effect on nitrogen utilization and protein content of rice. *Plant and Soil*, The Hague, *42*: 349-358.

NELSON, O.E., 1969. Genetic modification of protein quality in plants. *In*: BRADY, N.C. *Advances in Agronomy*, New York, *21*: 174-194.

NEVILLE, JR. D.M., 1971. Molecular weight determination of protein-dodecyl sulphate complex by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, *246*: 6328-6334.

OKUBO, K.; N. NISHIMURA e K. SHIBASAKI, 1979a. Composition of sesame seed protein components and purification of main globulin. *Cereal Chemistry*, St. Paul, *56*(2): 100-104.

OKUBO, K.; N. NISHIMURA e K. SHIBASAKI, 1979b. Separation of the 13S globulin in sesame seeds into two groups of acidic and basic subunits, and their physicochemical properties. *Cereal Chemistry*, St. Paul, *56*(4): 317-320.

OSBORN, T.B., 1918. *The vegetable protein*. New York. Longman Green. 125 p.

PADHYE, V.W. e D.K. SALUNKHE, 1979. Extraction and characterization of rice protein. *Cereal Chemistry*, St. Paul, *56*(5): 389-393.

PALMIANO, E.P.; A.M. ALMAZON e B.O. JULIANO, 1968. Physicochemical properties of protein of developing and mature rice grain. *Cereal Chemistry*, St. Paul, *45*(1): 1-12.

PALMIANO, E.P. e B.O. JULIANO, 1972. Biochemical changes in the rice grain during germination. *Plant Physiology*, Washington, *49*: 751-756.

PERDON, A.A. e B.O. JULIANO, 1978. Properties of a major α-globulin of rice endosperm. *Phytochemistry*, Oxford, *17*: 351-353.

PETERSON, G.L., 1979. Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rose brough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry*, London, *100*: 201-220.

PODUSLO, J.F. e D. RODBARD, 1980. Molecular weight using sodium dodecyl sulphate-pore gradient electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, London, *101*: 394-406.

RACUSEM, D., 1973. Stochiometry of the Amido Black reaction with proteins. *Analytical Biochemistry*, London, *52*: 96-101.

ROBELEN, G., 1979. The challense of breeding for improved protein crops. *In*: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Seed Protein Improvement in Cereals and Grain Legumes*. Vienna. p. 27-42.

RESENDE, M.H., 1980. O arroz irrigado no Maranhão. *Lavoura Arrozeira*, Porto Alegre, *33*(318): 4-7.

SHADI, A.I. e R. DJURTOFT, 1979. Studies of rice protein by crossed immuno electrophoresis, gel electrophoresis and isoelectric focusing. *Cereal Chemistry*, St. Paul, *56*(5): 402-406.

SHAICK, M.A.Q.; A.J. MIAH; M.M. MIAH; A. RAHMAN e M.A. RANIF, 1976. Evolution of rice varieties with improved quality through induced mutation. *In*: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Evaluation of Seed Protein Alteration by Mutation Breeding*. Vienna. p. 138-139.

SHEWRY, P.R.; H.M. PRATT; M.M. LEGGATT e B.J. MIFLIN, 1979. Protein metabolism in developing endosperms of high-lysine and normal barley. *Cereal Chemistry*, St. Paul, *56*(2): 110-117.

SIEGEL, A.; A. BHUMIRATANA e D.R. LINEBACK, 1975. Development, acceptability and nutritional evaluation of high-protein soy-suplemented rice moodles

for thai children. *Cereal Chemistry*, St. Paul, *56*(6): 801-812.

SILVA, P.D., 1980. Arroz parboilizado. *Lavoura Arrozeira*, Porto Alegre, *33*(319): 40-49.

TAKAGI, T.; K. KUBO e T. ISEMURA, 1977. Simple visualization of protein bands in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis by the insoluble complex formation between SDS and cation surfactant. *Analytical Biochemistry*, New York, *79*: 104-109.

TANAKA, K. e W. BUSHUK, 1972. Effect of protein content and wheat variety on solubility and electrophoretic properties of flour proteins. *Cereal Chemistry*, St. Paul, *49*(3): 247-257.

TANAKA, S., 1976. Induction of mutations in protein content of rice. *In*: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Evaluation of Seed Protein Alterations by Mutation Breeding*. Vienna. p. 139-140.

TANAKA, S. e S. HIRAIWA, 1978. Induction of light-protein mutants in rice. *In*: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Seed Protein Improvement by Nuclear Techniques*. Vienna. p. 191-198.

TECNON, E.M.S.; B.V. ESMANA; L.T. LONTOC e B.O. JULIANO, 1971. Studies on the extraction and composition of rice endosperm glutelin and prolamin. *American Association of Cereal Chemistry*, St. Paul, *48*: 168-181.

THORUN, W. e H.R. MAURER, 1971. The molecular sieving effects in polyacrylamide gel. *In*: H.R. MAURER. *Disc Electrophoresis and Related*

Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis. New York. Walter de Gruynter. 222 p.

UHLIG, C.W. e H. HEBERLE, 1979. Arroz parboilizado x arroz macerado. *Lavoura Arrozeira*, Porto Alegre, *32*(311): 54-56.

UHLIG, C.W., 1980. Arroz parboilizado x arroz macerado. *Lavoura Arrozeira*, Porto Alegre, *33*(318): 20-21.

VERGARA, B.S.; M. MILLER e E. AVELINO, 1970. Effects of simazine on protein content of rice grain (*Oryza sativa*, L.). *Agronomy Journal*, Madison, *62*: 269-272.

VILLAREAL, R.M. e B.O. JULIANO, 1978. Properties of glutelin from mature and developing rice grain. *Phytochemistry*, Oxford, *17*: 177-182.

WASIK, R.J.; H. DAQUIST e C. MARTIN, 1979. Studies of glutenin solubilized in high concentrations of sodium stereate. *Cereal Chemistry*, St. Paul, *56*(2): 90-94.

WEBER, E. e M. OSBORN, 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, *244*(16): 4406-4412.

ZACHARIUS, R.M.; T.E. ZELL; J.H. MORRISON e J.J. WOODLOCK, 1969. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, London, *30*: 148-152.