

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS EM PLANTAS DE ARROZ E ARROZ-VERMELHO SOB COMPETIÇÃO

Ana Claudia Langaro¹; Roberta Manica-Berto⁴; Marcel Ângelo Durigon¹; Camila Peligrinotti Tarouco³; Cleonice Gonçalves da Rosa²; Dirceu Agostinetto⁵;

Palavras-chave: estresse oxidativo, arroz-vermelho, metabolismo secundário.

INTRODUÇÃO

Dentre os fatores que tem interferência direta no processo de produção de arroz irrigado destaca-se a presença de plantas daninhas, principalmente as liliopsidas, em função da competição com a cultura por recursos do meio. Entre as liliopsidas que causam danos à cultura do arroz, o arroz-vermelho é a principal planta daninha, devido suas características morfofisiológicas similares a cultura (AGOSTINETTO et al., 2001).

Para estudar as interações competitivas entre plantas daninhas e culturas têm sido utilizadas várias metodologias. Esses métodos de estudo consideram os fatores população, proporção de espécies e arranjo espacial (RADOSEVICH, 1987) e avaliam principalmente variáveis morfológicas e, em alguns casos, variáveis fisiológicas. Porém, faltam informações relacionadas às alterações ocorrentes no metabolismo secundário das plantas, em resposta ao estresse por competição.

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: compostos fenólicos, terpenos e alcalóides. Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o crescimento e reprodução e, além disso, são formados em condições de estresse como, infecções, ferimentos e radiações UV (NACZK & SHAHIDI, 2004). Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (LEE et al., 2005). Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (SHAHIDI & NACZK, 1995).

Vários métodos espectrofotométricos para quantificação de compostos fenólicos em alimentos e plantas têm sido desenvolvidos. Esses métodos são baseados em diferentes princípios e são usados para quantificar fenólicos totais (PRICE & BUTLER, 1977), determinar um composto fenólico específico ou uma classe de fenólicos (BRUNE et al., 1991).

A solubilidade dos compostos fenólicos é governada pela polaridade do solvente utilizado, seu grau de polimerização, sua interação com outros constituintes da amostra e formação de complexos insolúveis. Assim, fatores como composição do solvente, tempo e temperatura de extração, relação solvente:amostra, tratamento da amostra, entre outros, têm influência na eficácia de extração, refletindo na maior ou menor recuperação dos compostos fenólicos (LYANA-PATHIRANA & SHAHIDI, 2005; NAM et al., 2005).

A utilização de metabólitos secundários para determinar a competição entre plantas demanda de metodologia analítica que permita inicialmente conhecer o teor total desses compostos, e que se ajuste aos diferentes componentes químicos dos tecidos vegetais que compõem o estudo. Esses aspectos nortearam o trabalho, que objetivou padronizar uma

¹Graduanda(o) em Agronomia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/UFPEL, Bolsista Fapergs/CNPq. E-mail: namelia.langaro@gmail.com; marceldurigon@bol.com.br

² Química de Alimentos, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos/FAEM/UFPEL. E-mail: cleorosaqm@yahoo.com.br

³ Eng. Agr., doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade /FAEM/UFPEL. E-mail: milatarouco@gmail.com

⁴ Eng. Agr., Dr. Pós-doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade /FAEM/UFPEL. E-mail: robertamanica@yahoo.com.br

⁵ Eng. Agr., Dr. Professor do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade/FAEM/UFPEL, bolsista em produtividade do CNPq. E-mail: agostinetto@ig.com.br

metodologia para a quantificação de compostos fenólicos totais nos dois tecidos vegetais em estudo, baseada no poder redutor desses compostos. Para tal, foram avaliados e adaptados procedimentos de extração, e quantificação empregando o reagente de Folin-Ciocalteu, explorando os diferentes aspectos analíticos que poderiam interferir nos resultados, considerando o efeito da competição entre a cultura e a planta daninha.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e laboratório na Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (FAEM/UFPel), em Capão do Leão-RS, no período de setembro de 2010 a março de 2011. Os ensaios em casa de vegetação foram alocados em vasos plásticos com capacidade volumétrica de 8 L, preenchidos com solo oriundo de lavoura orizícola, peneirado e adubado conforme as recomendações para a cultura do arroz irrigado (SOSBAI, 2010). O delineamento experimental foi o completamente casualizado, com seis repetições.

Primeiramente, realizaram-se experimentos preliminares com o cultivar de arroz Puitá Inta-CL e biótipo de arroz-vermelho em monocultivo, visando determinar a população de plantas em que a produção final de massa seca se torna constante. Neste, foram utilizadas populações de 1, 2, 4, 8, 16 e 32 plantas vaso⁻¹ (equivalentes a 37, 74, 148, 296, 592 e 1184 plantas m⁻²). A produção final constante da massa seca foi obtida com população de 24 plantas por vaso, equivalente a 942 plantas m⁻².

Em seguida, foi instalado o experimento em série de substituição, que avaliou a convivência do cultivar de arroz com o arroz-vermelho, variando-se as proporções relativas de plantas por vaso de 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 e 0:100 (0:24, 6:18, 12:12, 18:6 e 24:0), com manutenção da população total de plantas. Aos 42 dias após a emergência (DAE), foram realizadas coletas das folhas do arroz e arroz-vermelho. Em seguida, as folhas foram armazenadas a -80°C até o momento da análise dos compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos totais foram avaliados por dois métodos. No Método 1, o teor de compostos fenólicos totais foi obtido pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton et al. (1999), segundo modificações de Dewanto et al. (2002). Em que 1,5 g da amostra foram homogeneizados sob N₂ líquido em almofariz e transferida para um tubo falcon, sobre a qual foi adicionada 20 mL de etanol (70% v/v) com pH=3,2 ajustado com ácido fórmico, e após deixada em repouso por 12 horas. Em seguida 125 µL do extrato foram adicionados de 0,5 mL de água ultra-pura e 125 µL de solução de Folin-Ciocalteu 2 N. A mistura foi deixada em repouso por 6 minutos, após os quais 1,25 mL de solução aquosa de Na₂CO₃ 7% (m/v) foram adicionados. O volume final da mistura foi ajustado para 3 mL com água ultra-pura. Após 90 minutos de reação, realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Ultrospec 2000 UV/Visível - Pharmacia Biotech) a 760 nm. A quantificação foi realizada a partir de curva padrão de ácido gálico e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg GAE) por grama de matéria fresca (MF).

No Método 2, a determinação de compostos fenólicos foi realizada de acordo com método descrito por Singleton & Rossi (1965), com modificações. Para a etapa de extração pesou-se 2 g de amostra triturada, diluiu-se em 20 mL de metanol, colocou-se em banho-maria a 25°C, durante 3 horas. Após este período, a amostra foi filtrada com algodão para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com metanol. Para a etapa de quantificação dos fenóis foi retirado 1 mL do extrato obtido e adicionado 10 mL de água ultra-pura e 0,5 mL de Folin-Ciocalteu 2N, deixando-se reagir por 3 minutos, e após foram adicionados 1,5 mL de Na₂CO₃ 20% (m/v), permanecendo no escuro por mais 2 horas. Realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Ultrospec 2000 UV/Visível - Pharmacia Biotech) no comprimento de onda de 765 nm. Foi elaborada a curva padrão com o ácido gálico e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg GAE) por grama de matéria fresca (MF).

Os dados foram analisados quanto a sua normalidade e homocedasticidade e, posteriormente, submetidos à análise de variância (p≤0,05). Os efeitos das proporções

foram avaliados pelo teste de Dunnett e dos métodos foram avaliados pelo teste de t ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação entre os fatores proporção e método para a variável de fenóis totais nos dois tecidos vegetais analisados (arroz e arroz-vermelho) (Tabela 1). Em relação aos métodos, o Método 1, de forma geral, superou método 2, possibilitando melhor extração e quantificação desses compostos. Isso se justifica pelo fato do Método 1, fazer uso de ácido fórmico durante a etapa da extração, sendo esse período superior (12 horas) ao Método 2 (3 horas).

Quanto ao efeito das proporções, só ocorreu diferença em relação à testemunha para o Método 1 (Tabela 1). Quando o arroz e o arroz-vermelho estão nas proporções 50:50 e 75:25, o arroz-vermelho produziu um maior teor de compostos fenólicos em relação ao arroz, evidenciado-se um maior suporte para competir com a cultura, por ter desencadeado no seu metabolismo secundário uma maior produção de compostos fenólicos frente ao estresse, como uma forma de defesa.

Quando há competição entre indivíduos do mesmo gênero e/ou espécie, a vantagem da cultura poderá ser alterada, uma vez que ambas exploram o mesmo nicho ecológico. Por pertencerem ao mesmo gênero (VAUGHAN et al., 2001) e, para a maioria dos autores, a mesma espécie (PANTONE & BAKER, 1991; OGAWA, 1992), o arroz-vermelho e o arroz cultivado provavelmente competem pelo mesmo nicho, o que poderá resultar em vantagem competitiva para a planta daninha.

Tabela 1 - Teores de fenóis totais (mg GAE g⁻¹ MF) extraídos de folhas de arroz e arroz-vermelho, em função de quatro proporções e dois métodos operacionais. FAEM/UFPel, Capão do Leão/RS, 2011

Proporção de plantas (arroz:arroz-vermelho)	Arroz	
	Método 1	Método 2
100:0 (T)	51,44 a ^{1/}	42,19 b
75:25	40,65 a*	40,30 a
50:50	40,19 a*	39,88 a
25:75	38,64 a*	37,28 a
Arroz-vermelho		
0:100 (T)	56,61 a	34,54 b
25:75	59,48 a	42,46 a
50:50	59,50 a	41,53 a
75:25	61,05 a*	44,08 b

^{1/} Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de t ($p \leq 0,05$). * Média difere da testemunha (T), na coluna, pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

CONCLUSÃO

O Método 1 se mostrou eficiente para extração e quantificação dos compostos fenólicos totais, tanto em arroz quanto em arroz-vermelho.

O arroz-vermelho obteve maior produção de compostos fenólicos, principalmente na proporção 75:25 avaliado com o Método 1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINETTO, D.; FLECK, N.G.; RIZZARDI, M.A.; MEROTTO Jr, A.; VIDAL, R.A. Arroz-vermelho: ecofisiologia e estratégias de controle. *Ciência Rural*, v.31, p.341-349, 2001.

BRUNE M.; HALLBERG, L.; SKANBERG, A.B. Determination of ironbinding phenolic groups in foods.

Journal of Food Science, v.56, n.1, p.128-130, 1991.

DEWANTO, V.; WU, X.; ADOM, K.K.; LIU, R.H. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3010-3014, 2002.

LEE, S.J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K.G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v.91, p.131-137, 2005.

LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, v.93, n.1, p.43-56, 2005.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatographia A**, v.1054, p.95-111, 2004.

NAM, S.H.; CHOI, S.P.; KANG, M.Y.; KOZUKUE, N.; FRIEDMAN, M. Antioxidative, antimutagenic and anticarcinogenic activities of rice bran extracts in chemical and cell assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.3, p.816-822, 2005.

PANTONE, D.J.; BAKER, J.B. Reciprocal yield analysis of red rice (*Oryza sativa*) competition in cultivated rice. **Weed Science**, v.39, n.1, p.42-47, 1991.

PRICE, M.L.; BUTLER, L.G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content in sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.25, p.1268-1270, 1977.

OGAWA, M. Red rice. **Chemistry and organisms**, v.30, n.6, p.385-388, 1992.

RADOSEVICH, S.R. Methods to study interactions among crops and weeds. **Weed Technology**, v.1, p.190-198, 1987.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. 1 ed. Lancaster: Technomic Publishing Co, Inc., 1995. 331p.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, 299, 152-178, 1999.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. JR. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144-158, 1965.

SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO (SOSBAI). **Arroz Irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Bento Gonçalves, RS: SOSBAI, 188p. 2010.

VAUGHAN, L.K.; OTTIS, B.V.; PRZAK-HAVEY, A.M.; SNELLER, C.; CHANDLER, J.M.; PARK, W.D. Is all red rice found in commercial rice really *Oryza sativa*? **Weed Science**, v.49, n°3, p.468-476, 2001.