

# DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE PROTEÍNAS, CARBOIDRATOS, AMINOÁCIDOS E TEOR DE NUTRIENTES DOS GRÃOS DE ERVILHA, CULTIVADAS SOB APLICAÇÃO FOLIAR DE BORO, ZINCO E MOLIBDÊNIO.

**Débora Cristiane Nogueira**

Doutora em Agronomia pela Universidade Estadual Paulista de Ilha Solteira – UNESP  
Docente das Faculdades Integradas de Três Lagoas – AEMS

**Kuniko Iwamoto Haga**

Doutor em Biologia Vegetal pela Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP  
Docente da Universidade Estadual Paulista de Ilha Solteira – UNESP

**Renato Alberto Momesso Franco**

Doutor em Agronomia pela Universidade Estadual Paulista de Ilha Solteira – UNESP  
Docente das Faculdades Integradas de Três Lagoas – AEMS

## RESUMO

A região de cerrado apresenta fator limitante na produção devido às condições climáticas e por apresentar solos com baixa fertilidade. O objetivo foi avaliar o efeito do boro, zinco e molibdênio em grãos de ervilha. Foram utilizados grãos de ervilha da cultivar Utrillo, obtidos do cultivo na área experimental da Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Engenharia da UNESP, Campus de Ilha Solteira. Os oito tratamentos constaram das combinações entre aplicação de zinco (Zn), boro (B) e molibdênio (Mo), ou seja, Testemunha, Zn+B+Mo, Zn+B, Zn+Mo, B+Mo, B, Mo, Zn. O Mo foi aplicado via foliar aos 20 dias após a emergência (DAE). O B e o Zn foram aplicados também via foliar aos 30 DAE. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições, a análise de significância pelo teste de Duncan a 5%. Analisou-se a produtividade, o conteúdo de proteínas, carboidratos e aminoácidos. Os resultados indicaram que os tratamentos não alteram significativamente nenhum dos componentes estudados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Análise química; Micronutriente; *Pisum sativum*.

## INTRODUÇÃO

Devido à sua origem europeia e asiática, o cultivo da ervilha (*Pisum sativum* L.) é, em princípio, indicado para climas temperados, mais frios que a média brasileira, porém, houve uma boa adaptação na região dos cerrados do Brasil, apesar de os solos nessa região caracterizarem-se principalmente pela baixa fertilidade natural e também baixa disponibilidade de micronutrientes, principalmente zinco, boro e molibdênio (KORNDÖRFER et al., 1995).

Como as plantas têm a capacidade de absorver nutrientes pelas folhas (ROSOLEM, 1984) pode-se satisfazer facilmente as necessidades da planta por

meio de pulverizações, com quantidades reduzidas desses nutrientes, visto que os micronutrientes que são requeridos em pequenas quantidades (AMBROSANO et. al., 1996).

Apesar de requeridos em pequenas quantidades, os micronutrientes exercem papel muito importante nas plantas. O Boro tem suas funções relacionadas com a formação e estabilização da parede celular, da interface da parede celular com a membrana plasmática e com a lignificação e diferenciação do xilema. É exigido em quantidade elevada durante a germinação do pólen e crescimento do tubo polínico. (FURLANI, 2004).

Segundo Alloway (2004), em plantas, o zinco tem papel fundamental como um componente estrutural ou co-fator regulador de uma gama de enzimas diferentes e envolvidas em muitos caminhos bioquímicos importantes e estes estão principalmente relacionados com o metabolismo de carboidratos, na fotossíntese e na conversão de açúcares; no metabolismo de proteína; na formação de pólen; na manutenção da integridade de membranas e na resistência para a infecção a certos patógenos.

O molibdênio exerce papel indispensável na assimilação do nitrato absorvido pelas plantas, atuando em nível da redutase do nitrato. Portanto, qualquer deficiência do elemento pode comprometer o metabolismo do nitrogênio, diminuindo o rendimento das culturas (RITCHEY *et al.*, 1986 citados por FERREIRA *et al.* 2001).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do boro, zinco e molibdênio no conteúdo de proteínas, carboidratos, aminoácidos e avaliação de macro e micro nutrientes dos grãos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado na área experimental da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da Faculdade de Engenharia da UNESP, Campus de Ilha Solteira; localizada no município de Selvíria/ MS, com altitude de 335 metros. O solo é do tipo Latossolo Vermelho-escuro epi eutrófico álico, textura argilosa, originalmente ocupado por vegetação de cerrado. Quanto ao clima, a precipitação anual está em torno de 1370 mm, a temperatura média anual de 23,5°C e a umidade relativa do ar entre 70 e 80% (CENTURION, 1981). O resultado da análise de solo do local do experimento se encontra na Tabela 1, na qual os valores de zinco e boro;

dois micronutrientes estudados; encontram-se com baixo teor (0,3 e 1,6 mg/dm<sup>3</sup>, respectivamente).

Na semeadura foram utilizadas sementes de ervilha grão verde da cultivar Utrillo. O espaçamento adotado para a semeadura foi de 20 cm entre plantas e 30 cm entre linhas. Para a adubação de plantio foi aplicado 250 kg/ha de NPK da formula 8-28-16. Durante o desenvolvimento da cultura realizaram-se os tratos culturais normais recomendados e irrigação semanal (15 mm). O experimento foi instalado em 4 blocos casualizados cada um com 8 parcelas constituídas de 5 linhas de plantio de 5m cada uma. Na área experimental aplicou-se nitrogênio em cobertura na quantidade recomendada para a cultura de 100 kg de N/ha, na linha de plantio, 20 dias após a emergência das plântulas (DAE) utilizando-se como fonte a ureia.

**Tabela 1.** Teor de macro e micronutrientes existentes na amostra de solo do local onde foi realizado o experimento<sup>1</sup>

RESULTADO DA ANÁLISE DE SOLO											
Fósforo P-resina	M.O.	Índice de acidez		K	Ca	Mg	H+Al	Al	SB	CTC	V
mg/dm <sup>3</sup>	g/dm <sup>3</sup>	pH	CaCl <sub>2</sub>	-----mmolc/dm <sup>3</sup> -----							%
20	23	5,8	4,0	30	19	25	0	53,4	78,4	68	
Identificação da amostra	Cu		Fe	Mn	Zn	B	S-SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>				
	----- mg/dm <sup>3</sup> -----										
0-20	3,5		6	14,0	0,3	0,16	64				
<b>Teor Baixo</b>	0,0 - 0,2		0 - 4	0,0 - 1,2	0,0 - 0,5	0,0 - 0,20	0 - 4				
<b>Teor Médio</b>	0,3 - 0,8		5 - 12	1,3 - 5,0	0,6 - 1,2	0,21 - 0,60	5 - 10				
<b>Teor Alto</b>	> 0,8		> 12	> 5,0	> 1,2	> 0,60	> 10				

<sup>1</sup> Análises realizadas no laboratório de fertilidade do solo da FE/Unesp campus de Ilha

Quanto aos micronutrientes os tratamentos constaram da aplicação via foliar de diferentes combinações entre eles. O molibdênio foi aplicado na quantidade recomendada de 75g/ha utilizando-se como fonte o molibdato de sódio aos 20 DAE e aos 30 DAE foram aplicados o zinco e o boro (3 kg/ha e 40g/ha respectivamente), sendo o sulfato de zinco e o ácido bórico as fontes utilizadas. As combinações dos

tratamentos foram as seguintes: Testemunha, sem aplicação de micronutrientes; Zn+B+Mo, aplicação de zinco + boro + molibdênio; Zn+B, aplicação de zinco + boro; Zn+Mo, aplicação de zinco + molibdênio; B+Mo, aplicação de boro + molibdênio; B, aplicação de boro; Mo, aplicação de molibdênio; Zn, aplicação de zinco. O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados com 4 repetições.

A colheita de foi realizada aos 72 e 87 dias após a emergência, manualmente, nas duas linhas centrais, deixando 0,5m nas extremidades.

Foram determinadas as massas da matéria fresca das vagens e dos grãos, cujos dados foram utilizados para o cálculo da produtividade, em  $\text{kg ha}^{-1}$ , de todas as repetições de cada tratamento. Os grãos assim obtidos foram guardados para a determinação do conteúdo de aminoácidos livres, proteína solúvel, açúcar livre e polissacarídeo solúvel em água (WSP).

Para a extração de aminoácidos, proteína solúvel e carboidratos (açúcar livre, WSP e amido), utilizou-se o método descrito por Bielski e Turner (1966). A extração foi realizada utilizando-se tecido vegetal e mistura metanol: clorofórmio: água (MCW) na proporção 12:5:3. A cada 1g de grão verde, foram acrescentados 4 mL de MCW, homogeneizado e mantido em repouso por 24 horas a  $\pm 10^{\circ}\text{C}$ , misturado e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi guardado (S1) e o resíduo foi extraído por mais duas vezes com o mesmo volume de MCW, centrifugado e os sobrenadantes obtidos foram juntados ao S1 que totalizaram 12 mL, enquanto que o resíduo, R1, guardado.

Para a obtenção de aminoácidos e açúcar livre, tomou-se para 4 volumes do sobrenadante S1, 1,5 volume de água destilada e 1 volume de clorofórmio, homogeneizados e centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos sendo então separada a fase aquosa (E1). Para a extração de proteína foi adicionado ao resíduo R1, 4 mL de NaOH (0,1 N), homogeneizado e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos, repetida por mais duas vezes, o sobrenadante obtido (S2) foi reservado e o resíduo (R2).

Ao resíduo R2, foram adicionados 4 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10 % (w:v), homogeneizada e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos, o processo se repetiu por 3 vezes, sendo o sobrenadante (S3) reservado para quantificação de WSP e o resíduo (R3) utilizado para extração de amido.

Ao resíduo R3 adicionou-se 4 mL de ácido perclórico (PCA) a 30% (w:v), a mistura foi agitada e centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos, sendo a extração repetida por mais duas vezes. O sobrenadante (S4) foi reservado para quantificação de amido e o resíduo descartado.

Para a determinação quantitativa de aminoácidos contidos na fração obtida (E1) utilizou-se o método descrito por Yemn & Cocking (1955). Pipetou-se em tubo de ensaio 1 mL do E1 obtido, ao qual foram acrescentados 500 µL de tampão citrato, 200 µL de solução de ninhidrina (5%) em metilglicol, 1 mL de solução de KCN ( $2 \times 10^{-4}$ ) em metilglicol. A mistura foi aquecida em banho maria a 100 °C por 10 minutos, resfriada por 10 minutos em água, em seguida, completou-se o volume total para 4 mL utilizando álcool etílico a 60%. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm. O padrão utilizado para obtenção da curva padrão foi leucina na faixa de 0 a 100 µg mL<sup>-1</sup>.

Para a determinação de carboidratos (açúcar livre, WSP e amido) utilizou-se 1 mL dos sobrenadantes (S1; S3; S4) obtidos anteriormente, sobre este foi adicionado 1 mL de solução aquosa de fenol a 5% (w:v), misturado e sobre a mistura foram acrescentados 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, conforme o método descrito por Dubois et al. (1956). Essa mistura foi agitada em agitador para homogeneização e mantida por 15 minutos até completar a reação. Após o resfriamento dos tubos de ensaio realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 490 nm. O padrão utilizado foi dextrose para a obtenção da curva padrão na faixa de concentração entre 0 e 100 µg por mililitro de solução.

Os valores obtidos de conteúdo de amido foram multiplicados por 0,9 (fator de conversão da glicose em amido), conforme o método fenolsulfúrico, descrito por Dubois et al. (1956).

Para determinação da proteína utilizou-se o método descrito por Bradford (1976). Para preparação do reagente utilizado na determinação pesou-se 100 mg de "Coomassie Brilliant Blue" G250 e este dissolvido em 50 mL de etanol 95% (w:v), acrescentados 100 mL de ácido ortofosfórico 85% (w:v) e o volume final completado para 1000 mL com água destilada.

À alíquota de 0,1 mL do sobrenadante (S2) obtido foram adicionados 5 mL do reagente. A reação se completa em dois minutos após a mistura. A leitura da absorbância foi realizada antes de 30 minutos, período em que a reação é estável,

em espectrofotômetro a 595 nm. O padrão utilizado foi albumina de soro bovino na faixa de 0 a 100 µg.

Todos os parâmetros avaliados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Tabela 2 consta a média da produtividade da ervilha cultivar Utrillo nos diferentes tratamentos. Os resultados permitem verificar que a produção de grãos não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, o mesmo observou-se na produção de vagem, que também não apresentou diferenças significativas com os demais resultados.

**Tabela 2.** Valores médios de produção de sementes, grãos e vagem (kg/ha) da ervilha Utrillo para tratamentos com B, Zn e Mo.

Tratamentos	Produção V (kg.ha <sup>-1</sup> )	Produção G (kg.ha <sup>-1</sup> )
Testemunha	6150,44 a	2829,17 a
Zn+B+Mo	6017,69 a	2829,17 a
Zn+B	5542,37 a	2461,46 a
Zn+Mo	5644,28 a	2496,98 a
B+Mo	5572,61 a	2488,33 a
B	5291,99 a	2339,69 a
Mo	5284,55 a	2362,71 a
Zn	6110,00 a	2852,71 a

Observação 1. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade (p<0,05). Onde: G=Grão; V=Vagem; **C.V.:** Coeficiente de Variação.

Os dados obtidos na produção de ervilha tratada com Mo diferem de Lima et al. (1999), que através de aplicação foliar de Mo, obteve incremento na produção da ordem de 40% em feijão, alcançando produtividade de 1239 kg ha<sup>-1</sup> na dose de 75g ha<sup>-1</sup> de Mo. A ausência de resposta da adubação com molibdênio no presente trabalho pode ser devido ao teor deste micronutriente encontrar-se em nível suficiente no solo ou em reserva na semente utilizada na semeadura do experimento.

Os resultados da análise do conteúdo de aminoácidos, açúcar livre, WSP, amido e proteína, realizada por grama de matéria fresca de grão verde estão na

Tabela 3, os quais mostram que os tratamentos com os micronutrientes não diferiram estatisticamente da testemunha no conteúdo das componentes analisadas.

**Tabela 3.** Conteúdos médios de aminoácidos, açúcar livre, WSP, amido e proteína (mg/g) em grãos verdes de ervilha cultivar Utrillo para tratamentos com B, Zn e Mo.

Grão Verde					
Tratamentos	AA (mg/g)	AL (mg/g)	WSP (mg/g)	Amido (mg/g)	PROT (mg/g)
Testemunha	40,37 a	59,92 a	5,90 a	12,32 a	6,59 a
Zn+B+Mo	50,51 a	50,34 a	1,25 a	11,13 a	6,47 a
Zn+B	44,17 a	49,26 a	1,29 a	11,85 a	6,15 a
Zn+Mo	48,14 a	48,00 a	1,28 a	11,72 a	5,60 a
B+Mo	44,19 a	65,16 a	1,31 a	12,33 a	6,27 a
B	46,10 a	61,67 a	1,26 a	11,15 a	5,65 a
Mo	43,60 a	58,23 a	2,86 a	13,52 a	5,88 a
Zn	43,66 a	62,14 a	1,12 a	12,28 a	5,44 a

Observação: 1. Letras iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). 2. Onde AA=aminoácidos; AL=Açúcar livre; WSP=Polissacarídeos solúvel em água; PROT=Proteína; **ns**: não significativo. **C.V.**: Coeficiente de Variação.

Reforçando o fato de que a quantidade existente desses micronutrientes na reserva da semente usada na semeadura foi o suficiente para as plantas germinarem, crescerem e se estabelecerem como cultura.

## CONCLUSÃO

A aplicação foliar do boro, zinco e molibdênio não alteram significativamente a produtividade, o conteúdo de proteínas, carboidratos e aminoácidos, o que está provavelmente está relacionado com a reserva dos micronutrientes encontrados nas sementes ser suficiente para suprir a planta em todo o seu ciclo, já que através da análise de solo os valores de zinco e boro foram considerados baixos.

Sendo assim são desnecessárias aplicações foliares adicionais dos micronutrientes estudados, na cultura.

## REFERÊNCIAS

ALLOWAY, B. J. Zinc in soils and crop nutrition. Disponível no site: <<http://www.zinc-crops.org/Crops/Alloway-pdf/alloway-all.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2004.

AMBROSANO, E.J.; WUTKE, E.B.; AMBROSANO, G.M.B.; BULISANI, E.A.; BORTOLETTO, N.; MARTINS, A.L.M.; PEREIRA, J.C.V.N.A.; SORDI, G. 1996. Resposta da aplicação de micronutrientes no cultivo de feijão irrigado no inverno. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 53 n. 2-3, p. 273-279.

BIELSKI, R.L.; TURNER, N.A. 1966. Separation and estimation of amino acid in crude plant extracts by thin layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, 17: p. 278-282.

BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. Crop Science, v.7, p. 171-175.

CENTURION, J. F. 1981. Balanço hídrico da região de Ilha Solteira. In: OLIVEIRA, J. A. et al. (ed). **Relatório Técnico Científico nº 1**. Ilha Solteira: UNESP/FEIS, p. 1-5.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p. 350-356.

FERREIRA, A. C. B.; ARAÚJO, G. A. A.; PEREIRA, P. R. G.; CARDOSO, A. A. 2001. Características agrônomicas e nutricionais do milho adubado com nitrogênio, molibdênio e zinco. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.58, n.1, p.131-138.

FURLANI, A. M. C. Nutrição Mineral. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S.A. p.61-68, 2004.

KORNDÖRFER, G.H.; ALCÂNTARA, C.B.; HOROWITZ, N.; LANA, R.M.Q. 1995. Formas de adição de zinco a um formulado NPK e seu efeito sobre a produção de milho. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.52, n.3, p. 555-560.

LIMA, S. F.; ANDRADE, M. J. B.; CARVALHO, J. G. 1999. Resposta do feijoeiro à adubação foliar de boro, molibdênio e zinco. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.2, p.462-467.

ROSOLEM, C. A. 1984. Adubação foliar. In: Simpósio sobre fertilizantes na agricultura brasileira, 1. Brasília. **Anais**. Brasília: EMBRAPA, pág. 419-449.

YEMN, E. M. & COCKING, E. C. 1980. **Estimation of amino acids by ninhydrin**. Analyst, London, v. 80, p. 209-213, 1955.