

VARIAÇÃO DA CONSTITUIÇÃO DOS AMIDOS EM TRÊS *LANDRACES* DE MANDIOCA AÇUCARADA

**Simone Jackeline de Oliveira¹, Marco Antonio Valle Agostini²;
Luiz Joaquim Castelo Branco Carvalho³**

¹Bolsista da *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, Caixa Postal 02372, 70770-900 Brasília, DF. E-mail: simonej@cenargen.embrapa.br; ²Bolsista da *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*. E-mail: marco@cenargen.embrapa.br; ³Pesquisador da *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*. E-mail: carvalho@cenargen.embrapa.br.

INTRODUÇÃO

O amido, principal substância de reserva encontrado em plantas, é armazenado em amiloplastos na forma de grânulos e tem grande importância na indústria de alimentos, têxtil, químicas e outros setores da indústria. É constituído de amilose e amilopectina, que são dois homopolímeros de glicose que se diferenciam quanto ao peso molecular, nível de polimerização e ramificação de suas cadeias de glicose. A amilose de peso molecular aproximado de 10^6 kDa é constituída por um cadeia longa e não-ramificada de unidades de glicose unidas por ligações α -1,4. A amilopectina, de peso molecular 10^9 kDa, é um polímero de glicose ramificado unidas por ligações α -1,4 e α -1,6.(Stryer, L.1995)

A diversidade tanto da quantidade de amido nos tecidos de reserva (teor), como da qualidade deste, tem sido freqüentemente avaliada em bancos de germoplasma de diversas culturas, sendo que existe indicação de grande variabilidade quanto aos teores em mandioca (Carvalho, 2000).

Este trabalho teve como objetivo analisar três *landraces* de mandiocas açúcaradas, a IG_ AÇU, CAS36.16 e a CAS36.17, onde demonstra uma proporção variável de amilose em uma *landrace* e a ausência de amido em outra *landrace*, onde nesta *landrace* com amido ausente foi avaliada também a quantidade de glicose acumulada em diferentes camadas da raiz de reserva, comparadas com a normal IAC 12-829, com o interesse de ganhar o conhecimento do potencial de armazenamento da raiz de reserva e mostrar a variabilidade genética dessa espécie.(Carvalho, 2004)

METODOLOGIA

Material de Plantas - Foram utilizadas para este estudo, a *landrace* de mandioca açúcarada CAS36.16, e a normal IAC 12-829.

Preparação de tecido - Raízes de reserva foram selecionadas e uniformizadas de acordo com o comprimento da raiz, diâmetro e região central. Estas foram lavadas, cortadas e tiveram sua pele removida. A parte central de 10 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro da

raiz de reserva, foi selecionada para a separação das camadas conforme descrito na Fig. 1 e estabelecidas em Carvalho et al. (2000). Essas camadas foram congeladas com N₂ líquido, liofilizadas, maceradas com cadinho e almofariz com N₂ líquido obtendo-se um pó que foi mantido dessecado até o uso.

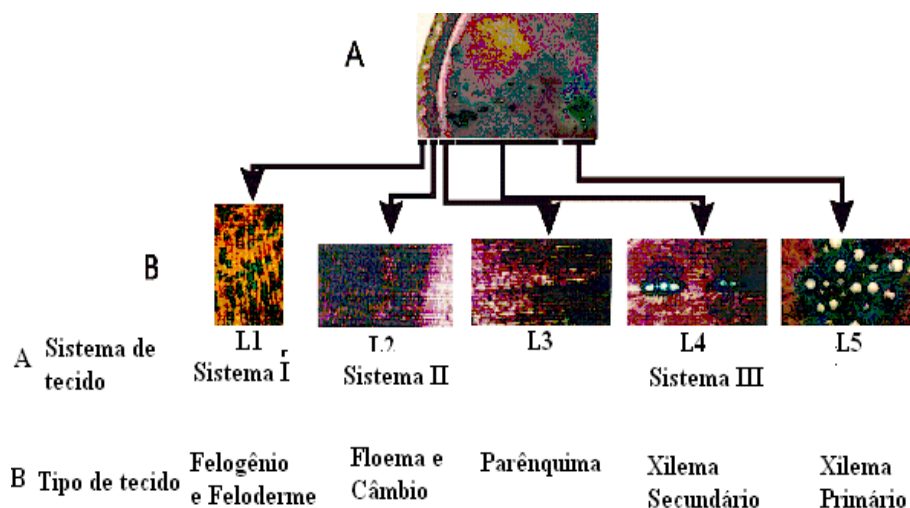


Fig. 1. Modelo adotado pelo laboratório para estudar as diferentes camadas da raiz de reserva da mandioca (Carvalho et al., 2000).

Extração de açúcares livres: 5 a 8 g do pó da amostra foi adicionado com 10 ml de etanol (85%), vortexado, e mantido sob agitação por 2 horas. Foi centrifugada (10 000 rpm/15°C/15'), retirou-se o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido três vezes na mesma amostra. Da solução total dos sobrenadantes, o etanol foi evaporado a um volume final de 3 ml. O volume foi uniformizado para 5 ml com adição de milliqli-H₂O, obtendo-se um extrato cru de açúcares totais livres.

Quantificação da glicose: O método calorimétrico de PGO (peroxidase/glucose oxidase) usado neste procedimento, é baseado na reação de Trinder (Trinder, 1969) foi utilizado em um ensaio de volume de 200 µl variando o volume do extrato entre 5 a 50 µl do extrato. Uma curva padrão foi preparada com glicose (SIGMA) numa amplitude de 4 µg/µl a 20 µg/µl. Foram feitas três repetições para leituras de densidade ótica realizadas em uma placa de ELISA (Bio-Rad modelo 3550) no espectrofotômetro a 540 nm (Modelo SPECTRA MAX). Assim, através da curva estimou-se o conteúdo de glicose em solução. Depois se achou o valor de mg/g de peso seco de glicose utilizando o valor de peso seco de cada amostra. Este, foi expresso conforme descrito na equação abaixo:

$$\text{Glicose(mg/gMS)} = ((\text{OD}_{590} - 0,0294) / 0,0395) (\text{mg}) * (1000) * (1/X_{\mu\text{l}} \text{ do ensaio}) * (\text{Volume Ext. } \mu\text{l}) * (1/X_{\text{gMS}}).$$

Extração do amido: as raízes de reservas das *landraces* IG_AÇU e CAS36.17 foram trituradas em água e filtradas com gases. Em um recipiente decantou-se o filtrado *over night* sendo o sedimento coletado e seco em temperatura ambiente. Peneirou-se o amido em peneira de menor espessura para obtenção de grãos pequenos.

Solubilização do amido: 50 mg do grânulo foi solubilizado em 50 ml de solução NaOH (0,5M) com aquecimento a 70°C.

Fracionamento de amilose e amilopectina em coluna de exclusão molecular: 5 ml da solução de amido foi adicionado a uma coluna de cromatografia de exclusão molecular de 100 cm de altura e 1,5 cm de diâmetro (volume interno de 176,7 cm³) empacotada com Sephacryl S-1000 Superfine. As condições e corrida de separação incluem um fluxo de 0,47 ml/minuto, solução de NaOH 0,1M, coleta de frações de 1 ml.

Deteção de amilose e amilopectina nas frações: 50 µl de cada fração foi transferida para placas de ELISA (Bio-Rad modelo 3550) e adicionada com 50 µl de ácido acético (0,1M) e 200 µl lugol (0,01M I₂). O ensaio foi lido a OD=590_{nm} em espectrofotômetro modelo (BIO RAD MODEL 3550 MICROPLATE READER).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quantidade de açúcares: de acordo com a Fig. 2, a variedade IAC apresenta um valor muito baixo de acúmulo de açúcar no *bulk* que é a parte total da raiz de reserva, entretanto, na *landrace* açucarada CAS36.16, o *bulk* apresenta um alto acúmulo de glicose.

Considerando agora as camadas dissecadas conforme descrito em materiais e métodos, o sistema III da *landrace* CAS36.16 que são os tecidos mais velhos, apresentam uma alta concentração de glicose, já os sistemas I e II que são os tecidos mais jovens, apresentam uma baixa concentração de glicose. Isso está relacionado ao tipo de tecido e sua capacidade de armazenamento, pois o alto acúmulo de glicose na camada L3 se dá por este tecido ser o parênquima de reserva. O acúmulo de glicose nas diferentes camadas está relacionado com a idade do tecido, pois quanto mais velho o tecido, maior a quantidade de acúmulo de glicose.

Presença de amilose e amilopectina: Os resultados da leitura no espectrofotômetro da separação de amilose e de amilopectina nas mandiocas açucaradas, mostraram que a *landrace* IG_AÇU- possui dois picos, um de amilose e outro de amilopectina e a *landrace* CAS 36.17- possui só pico de amilopectina (Fig. 3). A amilopectina usada como indicadora da qualidade do amido, não tem sido observada uma diversidade ampla (Carvalho et al., 2000).

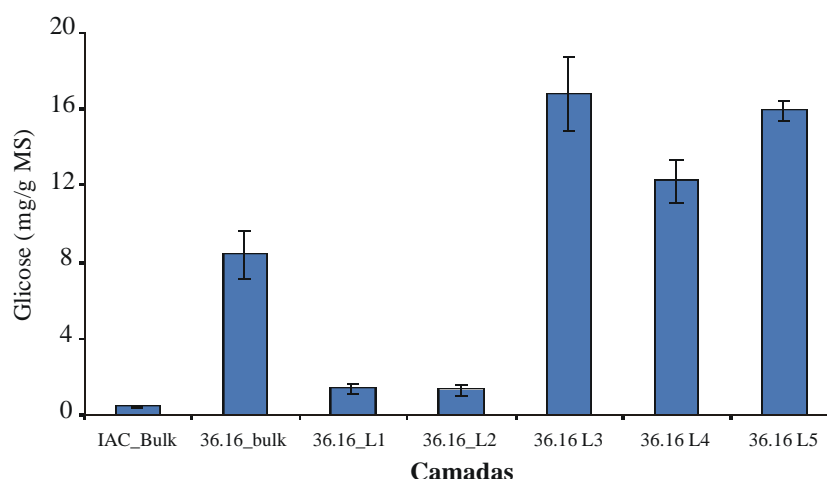


Fig. 2. Gráfico da distribuição do acúmulo de glicose em 2 *landraces*.

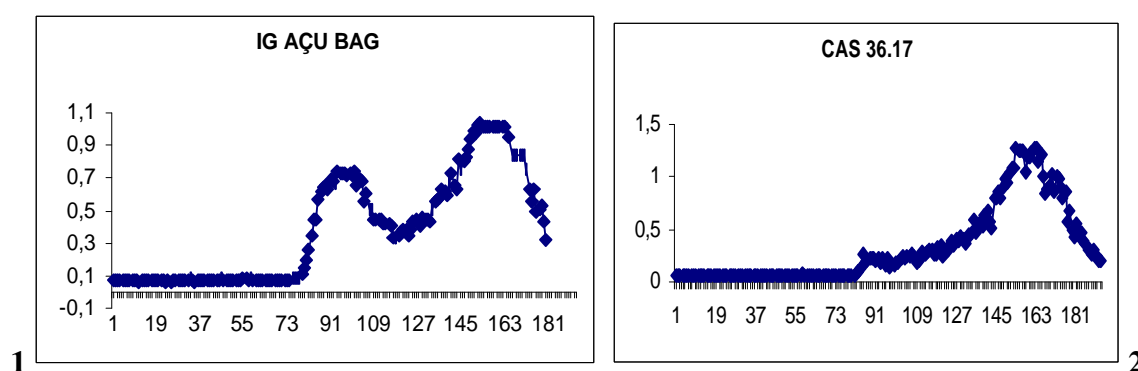


Fig. 3. Pico de amilose e amilopectina(1), Pico de amilopectina(2).

CONCLUSÃO

Há uma grande variabilidade de amido em diferentes *landraces de mandioca açucarada*. Isso demonstra a diversidade de novas características que a raiz de reserva de mandioca pode oferecer, fazendo assim, um modelo biológico para estudos bioquímicos e moleculares, buscando através destes, novas características que a mesma oferece.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, L.J.C.B, CABRAL, G.B E CAMPOS, L. 2000 . **Raiz de reserva de mandioca: um sistema biológico de múltiplas utilidades**. EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. Série Documentos 44.16p. Brasília, DF. Brasil.

CARVALHO, L.J.CB; DE SOUZA; CASCARDO; BLOCH JR.; CAMPOS. **Identification and characterization of a novel cassava(*Manihot esculenta* Crantz) clone with free sugar_content and novel starch**. Plant Molecular biology 56: 643-659, 2004.

STRYER, L. (1995). **Bioquímica**. 4. edição. Guanabara Koogan, RJ, 1995.

TRINDER P.; 1969. **Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor**. Ann Clinical Biochemistry 6: 24-27.