

DETERMINAÇÃO POR CROMATOGRAFIA GASOSA DE AÇÚCARES EM FRUTÍFERAS DE CLIMA TEMPERADO¹

ALEXANDRE COUTO RODRIGUES², FLÁVIO GILBERTO HERTER³, VALTAIR VERÍSSIMO⁴, GERALDO CHAVARRIA⁵, JOÃO PETERSON PEREIRA GARDIN⁶, ÂNGELA DINIZ CAMPOS⁷

RESUMO - As frutíferas de clima temperado apresentam o fenômeno da dormência. Na saída da dormência, há a conversão do amido para açúcares solúveis, como substrato para a retomada de crescimento na primavera. Visando à maior compreensão da fisiologia das plantas em respostas a eventos, como as variações climáticas, estresses e problemas de adaptação, desenvolveu-se este trabalho, no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa Clima Temperado, com o objetivo de descrever uma metodologia para a determinação das concentrações dos açúcares solúveis (frutose, sorbitol, α -glicose, β -glicose e sacarose), em tecidos vegetais de frutíferas, via cromatografia gasosa. O cromatógrafo utilizado para as análises dos açúcares por essa metodologia é o GAS CHROMATOGRAPH e a coluna do tipo Packed Column J. K. de 3,2mm de diâmetro por 2m de comprimento, empacotada com Silicone SE-52 Uniport HP 80/100 mesh. Através da cromatografia gasosa, obtêm-se eficiência e resolução cromatográfica, para análises de açúcares solúveis, sendo, desta forma, vantajoso e executável esse tipo de análise pelo método descrito.

Termos para indexação: carboidratos, pomáceas, metabolismo.

GAS CHROMATOGRAPHY DETERMINATION OF SUGARS IN TEMPERATE-ZONE FRUIT TREES

ABSTRACT - The temperate-zone deciduous fruit trees present the phenomenon of dormancy. In that period, there is the conversion of the starch in soluble sugars, as substratum for the resumption of growth in the spring. Seeking to better understanding the physiology of the plants in answers to events as the climatic variations, stresses and adaptation problems, this study was done in the Laboratory of Crop Physiology of Embrapa Temperate Climate, with the objective of describing a methodology for determination of concentrations of the soluble sugars (fructose, sorbitol, α -glucose, β -glucose and sucrose), in tissues of fruit tree, through gaseous chromatography. The chromatograph used for the analyses of the sugars was the GAS CHROMATOGRAPH with the column of the type Packed Column J. K. of 3,2mm of diameter for 2m of length packed with Silicon IF-52 Uniport HP 80/100 mesh. Through the gaseous chromatography it is obtained efficiency and chromatographic resolution to soluble sugars determination, being this way, advantageous to use this methodology.

Index terms: carbohydrates, pomefruits and metabolism.

A mobilização dos açúcares solúveis, ligada a eventos climáticos, como a temperatura, tem grande importância nos estudos de adaptação de frutíferas de clima temperado. No Brasil, está sendo utilizada a determinação de açúcares em frutíferas para estudar os problemas advindos da falta de frio hibernar (Herter et al., 2001). Devido à importância da determinação desses açúcares, algumas metodologias têm sido estudadas, dentre as quais, as fundamentadas nas técnicas cromatográficas.

Tais técnicas de separação permitem determinar a composição de misturas complexas de diversas substâncias químicas, com grande eficiência e reprodutibilidade. Pode ser conceituada como um método físico-químico de separação, no qual os constituintes da amostra são separados por partição em duas fases, uma móvel e outra estacionária. Na cromatografia gasosa, a fase móvel é um gás quimicamente inerte em relação à fase estacionária e aos componentes da mistura a ser analisada. Esta técnica possibilita a análise de inúmeros compostos, dentre os quais, os carboidratos.

Outros métodos são usados para a determinação de açúcares não-redutores, pela diferença entre os açúcares redutores (conforme metodologia de Nelson, 1944, e Somogy, 1952) e os açúcares solúveis totais, determinados pela reação com antrona (Hodge & Hodfreiter, 1962), embora os resultados sejam menos precisos do que os obtidos por cromatografia.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de descrever uma metodologia para determinação de açúcares solúveis em tecidos vegetais, especialmente de frutíferas de clima temperado, via cromatografia gasosa.

A partir de 2000, iniciou-se a análise de carboidratos em tecido vegetal de pomáceas, por cromatografia a gás, no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa, em Pelotas-RS. Isto foi possível graças à vinda ao Brasil do perito japonês, Professor Hiroshi Gemma (Institute of Agriculture And Forestry, Tsukuba-Japão), dentro do Projeto JICA, bem como a treinamentos de curta duração, realizados no Japão por pesquisadores da

Embrapa Clima Temperado. As análises das concentrações em mg g⁻¹MS, dos açúcares solúveis (frutose, glicose, sacarose e sorbitol), foram padronizadas para as condições brasileiras com base neste treinamento e nas metodologias adotadas por Rakngan (1995) e Kobashi et al. (2000).

O cromatógrafo a gás utilizado foi um Shimadzu GC-14B, com coluna (Packed Column J. K.) de 3,2mm de diâmetro por 2m de comprimento, empacotada com silicone (SE-52 Uniport HP 80/100 mesh) e com detector de ionização de chama. A temperatura do injetor foi de 200°C e velocidade do gás de arraste (nitrogênio) de 5mm/min. A temperatura inicial foi de 160°C, subindo a 250°C nos primeiros 18 minutos, finalizando aos 32 minutos.

Os padrões utilizados e respectivos tempo de retenção foram: padrão interno de pentaerythritol 5'48", frutose 10'95", α -glicose 12'49", sorbitol 13'50", β -glicose 14'11" e sacarose 29'94".

O material vegetal utilizado para a determinação de açúcares solúveis foram gemas florais de pomáceas. Na preparação das amostras, as gemas foram coletadas, rapidamente congeladas em N líquido, armazenadas em ultrafreezer, posteriormente liofilizadas e moídas.

Para a extração dos açúcares, subamostras de 500 a 1.000 mg de tecido foram incubadas a 80-85 °C, por 5 min, com 5mL de etanol a 80%, centrifugadas por 10min a 6.000 rpm e separadas do sobrenadante. O precipitado foi novamente centrifugado com 10ml de etanol 80%. A partir da mistura dos dois sobrenadantes, foram determinados os açúcares solúveis. O precipitado foi armazenado para análises de amido.

Posteriormente, foi evaporado o sobrenadante a 45°C, em rotavapor R-114, até não conter mais álcool. Após, transferido para um béquer e completado com aproximadamente 20ml de água deionizada.

Esses volumes foram primeiramente filtrados em colunas contendo a resina IR 120 (catiônica H⁺) para eliminar aminoácidos e, a seguir, em resina IR 400 (aniônica OH⁻) para eliminar ácidos orgânicos.

No processo de filtragem por resinas, as amostras foram recebidas

¹ (Trabalho 126/2004). Recebido:07/10/2004. Aceito para publicação: 08/04/2005.

² Eng. Agrº Dr. Pesquisador RD/CNPq Embrapa Clima Temperado, Br 392, Km 78, Cx. Postal 403, 96001-970, Pelotas-RS, Correio eletrônico: rcalle@ufpel.edu.br

³ Eng. Agrº Dr. Pesquisador Embrapa Clima Temperado, Br 392, Km 78, Cx. Postal 403, 96001-970, Pelotas-RS, Correio eletrônico: herter@cpact.embrapa.br

⁴ Eng. Agrº MSc. Doutorando UFPel/ FAEM, Dpto. Fitotecnia, Cx. Postal 354, CEP 96001-015, Pelotas-RS

⁵ Eng. Agrº Mestrando em Fruticultura, UFPel/FAEM Pelotas-RS Correio eletrônico: geraldochavarría@hotmail.com

⁶ Eng. Agrº MSc. Doutorando Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

⁷ Eng. Agrº Dra. Pesquisadora Embrapa Clima Temperado, Br 392, Km 78, Cx. Postal 403, 96001-970, Pelotas-RS, Correio eletrônico: angela@cpact.embrapa.br

em balão volumétrico até completar o volume de 50ml, com água deionizada, adicionada superiormente à coluna. Nos 50ml eluídos de cada coluna, foram adicionados 5ml de $ZnSO_4$ 0,5N (5%) e 5ml de $Ba(OH)_2$ 0,33N (5%), para a precipitação e remoção das proteínas por decantação, e posterior filtração com papel filtro qualitativo.

Do filtrado, 20mL foram transferidos para um cadinho de porcelana e mantidos a 240-270°C, até secar. Uma pequena quantidade foi passada para vidros de injeção, com adição de 1ml de pentaerythritol (1mg/ml, açúcar-padrão interno), e novamente submetido ao aquecimento (200°C), até a completa secagem, tendo-se o cuidado de não promover a queima dos açúcares. As amostras foram transferidas para um dessecador até serem utilizadas.

Na preparação para a injeção, as amostras foram submetidas ao aquecimento em chapa quente (200°C), em capela, com 1ml de pyridine, para solubilização, 200µl de hexamethyldisilazane (HMDS) e 100µl de trimethylchlorosilane (TMCS), para a metilação. Após começar a emissão de bolhas, foram deixadas por aproximadamente 1 min, para a formação de um precipitado branco. Após resfriamento e decantação por 30 min, 2µl da amostra foi injetado no aparelho.

A concentração de cada açúcar (Fig.1) foi determinada por comparação à área correspondente ao açúcar-padrão interno (pentaerythritol), registrada pelo integrador. As concentrações foram ajustadas ao peso e ao volume de diluição de cada amostra, de acordo com a seguinte fórmula: $[Ca] = (2,5[Cc] / M) 1.000$, onde $[Ca]$ é a concentração do açúcar em $mg \cdot g^{-1} MS$, 2,5 o fator de diluição usado no preparo da amostra,

$[Cc]$ é a concentração do açúcar calculada pelo cromatógrafo, em mg, M a massa da mostra em mg e 1.000, o fator de correção.

Os resultados de açúcares solúveis, em gemas florais de pomáceas, são apresentados no cromatograma (Fig.1), onde estão registrados o número da amostra, o tempo de retenção de cada açúcar, a área e altura correspondentes ao pico de cada composto e a concentração do açúcar que foi utilizada na fórmula, para fins de cálculos.

De acordo com Ciola (1998), a cromatografia a gás tem enorme potencialidade devido à sua eficiência, facilidade, baixo custo e possibilidade de analisar misturas voláteis de alta complexidade, como: açúcares, gorduras, óleos essenciais, inseticidas residuais, etc.

Análises de açúcares solúveis também podem ser realizadas através da cromatografia líquida de alta performance (HPLC), obtendo-se alta precisão, porém especialistas da área de análise instrumental sabem que os custos das análises e do equipamento de cromatografia líquida são mais elevados em comparação à cromatografia gasosa. Portanto, a cromatografia gasosa, neste tipo de análise em tecido de frutíferas, é a mais indicada.

A metodologia descrita, através da cromatografia gasosa, mostrou-se adequada para análises de açúcares solúveis em tecidos de frutíferas, sendo técnica e economicamente viável.

Conclui-se que, através da cromatografia gasosa, obtêm-se eficiência e resolução cromatográfica, para análises de açúcares solúveis, sendo, desta forma, vantajoso e executável esse tipo de análise pelo método descrito.

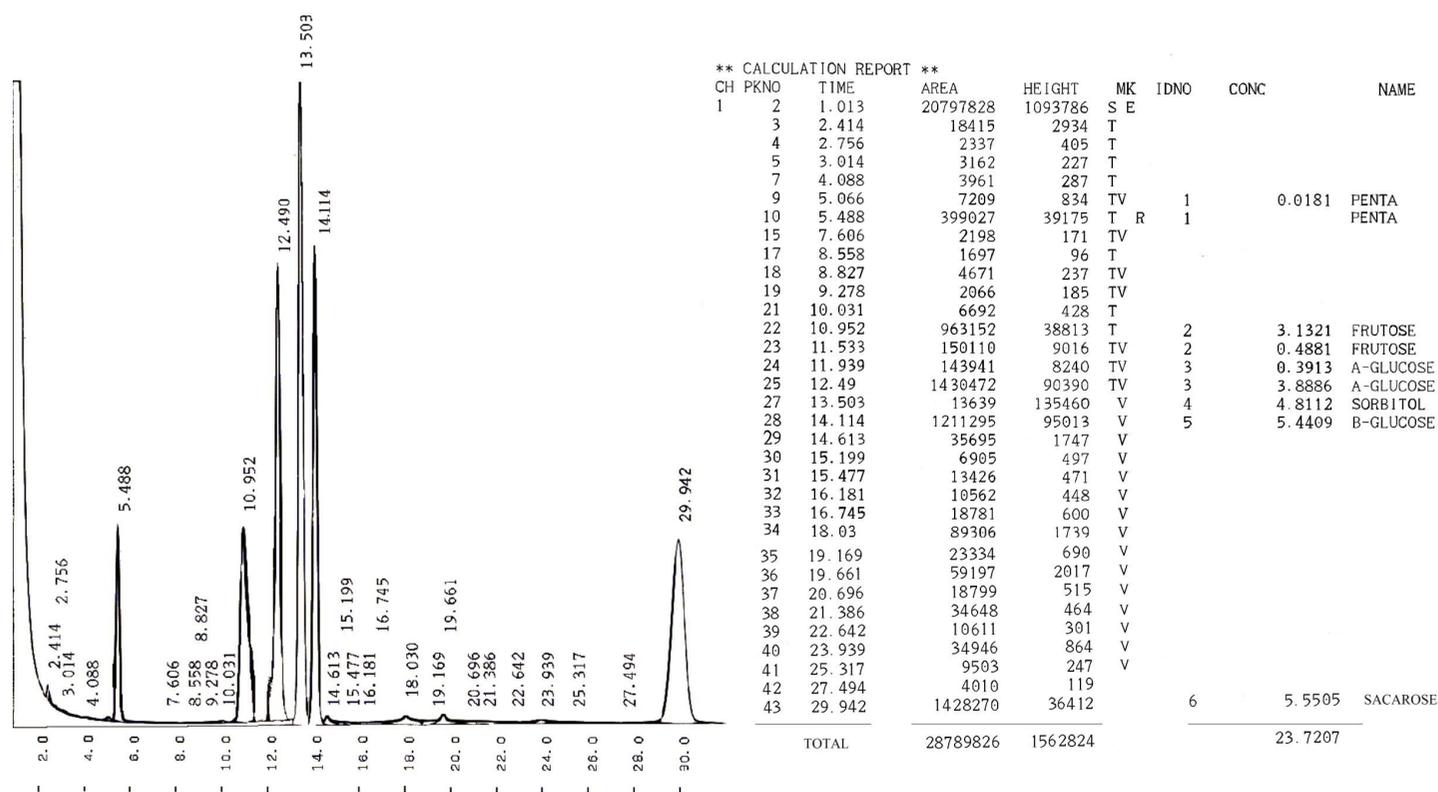


FIGURA 1 - Cromatograma de análise de açúcares solúveis por cromatografia gasosa, em gemas florais de pomácea. Embrapa Clima Temperado. Pelotas-RS, 2004.

REFERÊNCIAS

- CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC**. São Paulo: Edgard Blucher, 1998. 179p.
- HERTER, F.G.; VERÍSSIMO, V.; CAMELATTO, D.; GARDIN, J.P.; TREVISAN, R. Abortamento de gemas florais de pereira no Brasil. In: SEMINÁRIO SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 1., 2001, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Epagri, 2001. p.106-114.
- HODGE, J.E. & HODFREITER, B.R. Determination of reducing sugars and carbohydrate. In: WILSTER, R.C. & WOLFRON, M.I. (Ed.). **Methods in carbohydrates chemistry**. New York: Academic Press, 1962. v.1, p.380-398.
- KOBASHI, K.; GEMMA, H.; IWAHORI, S. Abscisic acid content and

sugar metabolism of peaches grown under water stress. **Journal American Society Horticultural Science**, Alexandria, v.125, n.4, p.425-428, 2000.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.153, p.375-380, 1944.

RAKNGAN, J. Carbohydrate analysis of Japanese pear trees grown under adverse conditions. In: RAKNGAN, J. **Phenological and physiological study of Japanese pear grown under adverse condition**. Tsukuba, 1995. cap. 3, p. 61-76.

SOMOGY, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.95, p.19-23, 1952.