

METODOLOGIA DE DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS EM TECIDO VEGETAL DE CAFEIEIRO POR CROMATOGRAFIA GASOSA

João Peterson Pereira GARDIN¹, Valtair VERÍSSIMO², Flávio Gilberto HERTER³, José Donizeti ALVES⁴, Fabiane GRECCO⁵, Marcelo MURAD⁶

¹Eng. Agr. MSc. Doutorando em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, End.: Av. Pedro Sales 490-A, Centro, Lavras-MG CEP37200000 Fone: (035)3821 2106 E-mail: petersongardin@yahoo.com.br, ²Doutorando em Fruticultura da Universidade Federal de Pelotas E-mail: valtaiverissimo@yahoo.com.br, ³Pesquisador Embrapa Clima Temperado E-mail: herter@cpart.embrapa.br, ⁴Professor Dr. da Universidade Federal de Lavras E-mail: jdalves@ufla.br, ⁵Estudante de Química da Universidade Federal de Pelotas E-mail: fabiane@cpart.embrapa.br, ⁶Pesquisador do PNP&D/Café E-mail: mmurad@ufla.br

Resumo:

A maioria dos trabalhos realizados com café (Livramento, 2003; Silva, 2000) até o presente utilizam a quantificação dos açúcares solúveis totais pelo método de antrona. Apesar desse método ser preciso, sensível e com ótima reprodutibilidade, este apresenta apenas um perfil quantitativo. Uma alternativa que forneça tanto o perfil qualitativo quanto o quantitativo é a cromatografia gasosa que possui uma alta eficiência e ótima resolução cromatográfica, além do custo da análise ser mais barata em relação à cromatografia líquida. O perfil contendo os diversos açúcares poderá subsidiar estudos de metabolismo, auxiliar nos programas de melhoramento e ser um dos parâmetros componentes da avaliação da qualidade de bebida. Além desses aspectos, essa técnica pode ser usada em Laboratórios de Certificação de Produtos e em café os estudos desta são muito escassos. Este trabalho preliminar objetivou quantificar os açúcares solúveis totais em café por GC. Basicamente, quanto à extração dos açúcares utiliza-se etanol 80%, incubação a 85°C por 5 minutos e centrifugação. O sobrenadante é usado para a análise dos açúcares e o precipitado pode ainda ser usado para determinação de amido. A purificação do extrato ocorre em colunas de troca iônica para remoção de aminoácidos e ácidos orgânicos, principalmente, e precipitação de proteínas com Ba(OH)₂ e ZnSO₄. Essa técnica, em relação ao método da antrona, requer um período maior de ajuste de metodologia, mas após a otimização dos parâmetros a quantidade de amostras analisadas por CG num sistema de rotina é muito alta.

Palavras-chave: Carboidratos, metabolismo, metodologia, cromatografia gasosa, *Coffea*.

METHODOLOGY FOR DETERMINATION OF TOTAL SOLUBLE SUGARS IN COFFEE VEGETATIVE TISSUE BY GASEOUS CHROMATOGRAPHY

Abstract:

The major papers published related to coffee (Livramento, 2003; Silva, 2000) until now used anthrone method for total soluble sugars quantification. Although this method is precise, sensitive and with excellent reproducibility, it shows only a quantitative profile. One alternative that could give qualitative and quantitative profile is a gaseous chromatography that has high efficiency and resolution, in addition to this fact this technique is cheaper than HPLC. The profile containing the sugars could help the studies in metabolism, in breeding programs and could be one of the parameters to evaluate the beverage quality. In addition to these aspects, this technique could be used in Laboratory of Certification Products and in coffee these studies are scarce. This paper aimed to quantify the total soluble sugars in Coffee bud, shoot, leaf and fruit using GC. Basically the sugars were extracted with ethanol 80%, incubated at 85°C for 5 minutes and the slurry centrifuged. The supernatant was used to sugars analysis and the precipitate was used for starch determination. The extract purification was made in ion exchange columns to remove amino acids and organic, mainly the protein precipitation with Ba(OH)₂ and ZnSO₄. This technique, in relation to anthrone method needs an optimization process, but after this step can analyze a large amount of samples per day.

Key words: Carbohydrates, metabolism, methodology, gaseous chromatography, *Coffea*.

Introdução

Os carboidratos são os componentes mais abundantes nas plantas. Eles são produzidos pelas plantas verdes usando a energia do sol, num processo chamado fotossíntese. A energia é armazenada em suas ligações químicas. São primariamente moléculas que reservam energia na maioria dos organismos vivos. Além disso, elas formam uma variedade de componentes estruturais nas células. As paredes das células jovens, por exemplo, são formadas pelo carboidrato celulose, imerso numa matriz de outros carboidratos e proteínas. Os carboidratos servem também como componentes de tecidos de sustentação em plantas e em alguns animais (Ucko, 1992).

O amido é o mais importante carboidrato de reserva nas plantas. No inverno, essas reservas amiláceas são parcialmente convertidas em açúcares solúveis dentro das partes aéreas e das raízes finas. Os açúcares solúveis (frutose, glicose, sacarose e sorbitol) têm importância na regulação osmótica e transporte. A dinâmica da água nos tecidos vegetais está muito relacionada com a dinâmica dos carboidratos solúveis (Buckhout & Tubbe, 1996; Raven et al. 2001). A

mobilização dos açúcares solúveis é diretamente ligada aos eventos climáticos, principalmente temperatura, e tem grande importância nos estudos de adaptação de plantas. No Brasil está sendo muito utilizada para estudar os problemas de falta de frio hibernal (Herter et al., 2001).

Tendo em vista a importância da determinação dos açúcares solúveis, algumas metodologias tem sido desenvolvidas para analisar esses compostos, sendo a cromatografia uma valiosa técnica para este fim. A cromatografia é uma técnica de separação que permite determinar a composição de misturas complexas de diversas substâncias químicas, com grande eficiência e reprodutibilidade. A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes. Considerando o estado físico da fase móvel, distingue-se a cromatografia gasosa, onde a fase móvel é um gás, a cromatografia líquida, onde a fase móvel é um líquido e a cromatografia supercrítica, onde se usa como fase móvel um vapor pressurizado (Collins *et al.*, 1990). Esta técnica possibilita a análise de inúmeros compostos, entre os quais, os carboidratos. Outra vantagem da cromatografia gasosa é que possui a opção do acoplamento de um espectrômetro de massa que já fornece a estrutura dos componentes previamente separados pelo sistema CG.

Outros métodos são usados para a estimativa 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).

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

Material e métodos

O cromatógrafo a gás utilizado para as análises dos açúcares por essa metodologia foi um Shimadzu GC-14B, Series GAS CHROMATOGRAPH com uma 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.

Utilizou-se o detector de Ionização de Chama (FID), ideal para análise de carboidratos. A temperatura do injetor e do detector foram de 200°C. A velocidade do gás de arraste (nitrogênio) de 5mm/min. O programa inicial de temperatura do forno foi de 160°C, permanecendo nesta temperatura por 1 minuto, posteriormente subindo a 200°C numa taxa de 4 °C por minuto, permanecendo nesta temperatura por 3 minutos e logo, subindo para 280°C numa taxa de 20°C por minuto, permanecendo nesta temperatura até o final da corrida, finalizando em 25 minutos.

Após a injeção dos padrões, registra-se o tempo de retenção de cada açúcar, sendo padrão interno pentaeritritol 4'6'', frutose 10'5'', α -glicose 13'5'', β -glicose 15'6'', sacarose 22'0''.

O material vegetal (ramo, folha, gema ou fruto) deve ser coletado e rapidamente congelado em nitrogênio líquido, para conservação da composição vegetal, sendo posteriormente armazenado em ultrafreezer para ser liofilizado e depois moído. Podem ser usadas amostras de tecido fresco ou seco em estufa.

Pesa-se em torno de 300 a 1000mg de tecido seco e moído, ou até 1500mg no caso de tecido fresco e incuba-se a 80-85°C por 5min, em 5mL de etanol 80% para extração dos açúcares. Mistura-se o conteúdo e centrifuga-se por 10min a 3000rpm e separando-se o sobrenadante. Ressuspende-se novamente o precipitado em 10mL de etanol 80% e mistura-se, repetindo-se o processo de centrifugação, juntando-se ao sobrenadante da primeira centrifugação. Esta centrifugação é realizada três vezes, a partir do sobrenadante será determinado os açúcares solúveis e com o precipitado será analisado o amido.

Posteriormente evapora-se o sobrenadante a 45°C, em rotavapor R-114, até não existir mais álcool. As amostras estão prontas para serem purificadas em resinas de troca iônica.

Primeiramente, filtram-se as amostras em colunas contendo as resinas IR120 (catiônica H⁺) para eliminar aminoácidos e a resina IR400 (aniônica OH) para eliminar os ácidos orgânicos. Obs.: Utilizam-se tubos de ensaio furados para o processo de filtragem nas resinas, sobre os quais coloca-se um funil com papel filtro número 2. Tampam-se os furos com fibra de vidro e colocam-se as resinas, tendo o cuidado de eliminar todas as bolhas de ar com pisseta contendo água deionizada.

No processo de filtragem nas resinas, coleta-se as amostras em béqueres, coloca-se 4,8mL de ZnSO₄ 0,5N (5%) e 5mL de Ba(OH)₂ 0,33N (5%), os mesmos tem um pH ácido e básico, respectivamente e quando misturados dever produzir um pH 7,0 para a precipitação e remoção das proteínas existentes nas amostras. Espera-se decantar, e após filtra-se o sobrenadante com papel filtro número 2, coloca-se em balão volumétrico e completa-se o volume de 50mL, sempre utilizando água deionizada, pois o detector do cromatógrafo detecta possíveis cargas existentes em água não deionizada, mascarando os resultados.

Pipetar 20mL do sobrenadante e colocar em cadinho de porcelana para secar em chapa quente a 160°C, quando estiver quase todo evaporado, apenas uma pequena quantidade, passa-se para vidros de injeção. Adiciona-se 1mL de pentaeritritol (na concentração de 1mg/mL, açúcar padrão interno do cromatógrafo), retornando para a chapa quente (120°C), até a completa secagem, tendo cuidado para não queimar os açúcares. Após, conserva-se em local seco (dessecador com sílica gel) por no mínimo 24 horas.

Após a secagem, na preparação das amostras para a injeção, colocam-se os vidros de injeção sobre a chapa quente (120°C) dentro de uma capela (câmara de exaustão), acrescentando-se 1mL de piridina para solubilização da amostra,

200µl de hexamethyldisilazane (HMDS) e 100µl de trimethylchlorosilane (TMCS), para a metilação. Forma um precipitado branco (silicatos), espera-se esfriar e decantar por 30min, estando pronta para injeção no cromatógrafo.

Injeta-se no cromatógrafo 2µl do analito, após cada amostra injetada lava-se a micro seringa com acetona (5x).

Obs: Quando injetar o analito, fazer de uma só vez. Os resultados são processados por um integrador e os resultados são dados em mg, bastando apenas fazer correções de diluição e peso de amostra. Os cromatogramas são impressos conforme apresentados na figura 1.

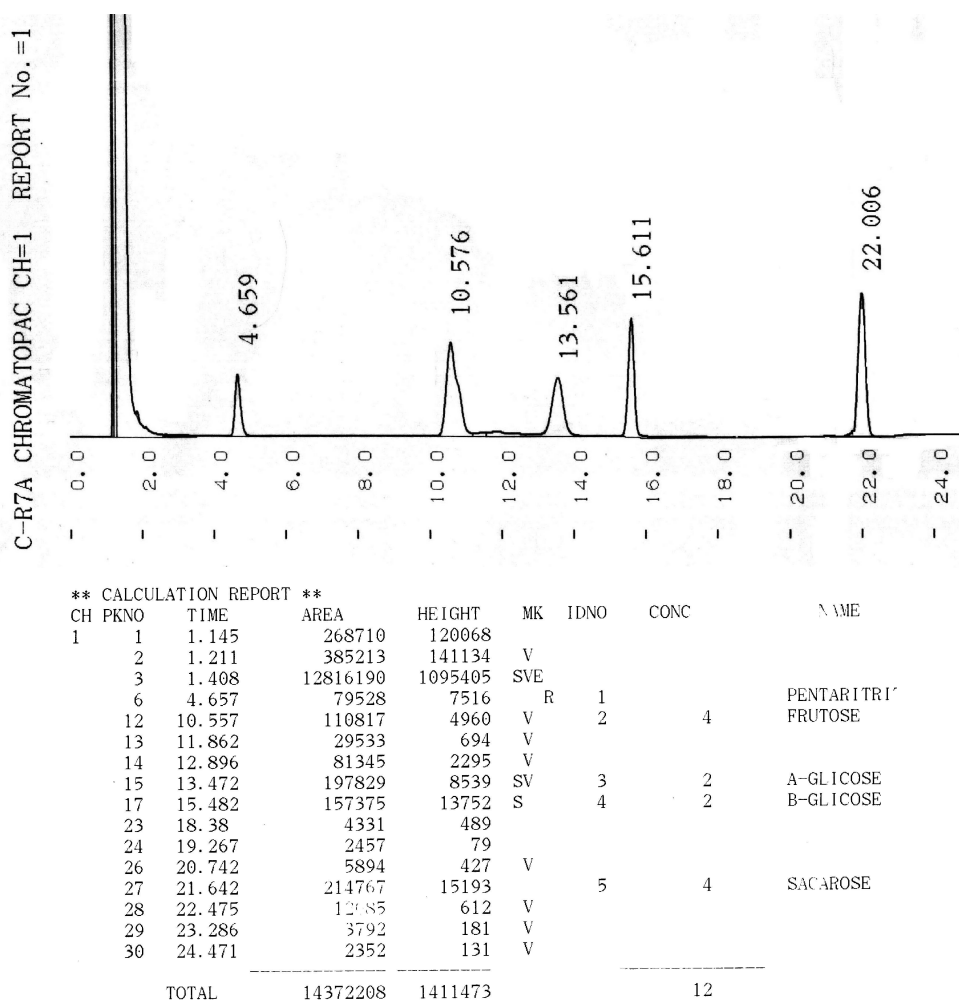


Fig.1. Cromatograma padrão de análise de açúcares solúveis por cromatografia gasosa, em tecido vegetal de cafeeiro.

Resultados e discussão

Na obtenção dos resultados, a concentração de cada açúcar (Fig.1), com base na área correspondente ao açúcar padrão interno (pentaeritritol), é registrada pelo integrador. As concentrações devem ser ajustadas ao peso e ao volume de diluição de cada amostra, de acordo com a seguinte fórmula: $[Ca] = (2,5[Cc]/M)1000$, sendo $[Ca]$ a concentração do açúcar expresso em $mg.g^{-1}$ de matéria seca, 2,5 o fator de diluição usado no preparo da amostra (o volume era 50 e retirou-se 20 para evaporar na chapa), $[Cc]$ a concentração do açúcar calculada pelo cromatógrafo em mg, M a massa da mostra em mg e 1000 o fator de correção.

Os resultados de análise de açúcares solúveis por cromatografia gasosa, em tecido de cafeeiro, apresentados no cromatograma (Fig.1), determinam o número da amostra, o tempo de retenção de cada açúcar, a área e altura correspondente ao pico de cada composto e a concentração do açúcar que será utilizado na fórmula para fins de cálculos. No cromatógrafo pode-se obter resultados diretamente em $mg.g^{-1}$ MS, sendo necessário usar amostras de mesmo peso. Todas as temperaturas, volumes, pesos e concentrações mencionadas na técnica foram previamente testadas e padronizadas para este fim.

De acordo com Ciola (1998), a cromatografia a gás tem enorme potencialidade devido a sua eficiência, facilidade, baixo custo e possibilidade de analisar misturas voláteis de alta complexidade, como: açúcares, gorduras, óleos essenciais, inseticidas residuais, etc. De um modo geral acredita-se que a cromatografia a gás pode analisar mais de 20% dos compostos existentes. Porém, é necessário que os compostos a serem analisados sejam, nas condições de operação, voláteis e termicamente estáveis.

Conclusão

A metodologia descrita se mostrou adequada para análises de açúcares solúveis em tecidos de cafeeiro, sendo tecnicamente e economicamente viável. Com a cromatografia gasosa obtém-se eficiência e resolução cromatográfica, com menor custo, comparando-se com a cromatografia líquida, além de exibir um perfil qualitativo o que não é possível com o método da antrona.

Referências bibliográficas

- Buckhout, T.J.; Tubbe, A. Structure, mechanisms of catalysis, and regulation of sugar transporters in plants. In: Samski, E.; Schaffer, A. A. Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships. New York: Marcel Dekker, Inc, 1996. p.229-260.
- Ciola, R. Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho – HPLC, 1ªEd. Edgard Blucher, São Paulo, 1998. 179p.
- Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. Introdução a Métodos Cromatográficos. Campinas: Unicamp, 1990. 279p.
- Herter, F.G.; Veríssimo, V.; Camelatto, D.; Gardin, J.P.; Trevisan, R. Abortamento de gemas florais de pereira no Brasil. Seminário sobre fruticultura de clima temperado, 1, p.106-114, Florianópolis, SC. Anais... Florianópolis: Epagri, 2001.
- Hodge, J.E & Hodfreiter, B.R. Determination of reducing sugars and carbohydrate. In: WILSTER, R.C. & Wolfron, M.I. (eds.) Methods in carbohydrates chemistry. New York. Academic Press. 1962, v.1. p.380-398.
- Livramento, D. E. Influência da produção nos teores de carboidratos e na recuperação de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) após “recepta” ou pulverizados com solução de sacarose 2003. 41p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Nelson, N. A photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. Journal of Biological Chemistry. 153: 375-380, 1944.
- Raven, P.H.; Evert, R.F.; Eichhorn, S.E. Biologia Vegetal. Rio de Janeiro: Ed, Guanabara Koogan S.A., 2001. 906p.
- Silva, J.C. Efeito da aplicação de sacarose no teor e no metabolismo de carboidratos em mudas de café (*Coffea arabica* L.) com diferentes níveis de reservas de carbono. 2001. 56p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Somogy, M. Notes on sugar determination. Journal of Biological Chemistry, 95: 19-23, 1952.
- Ucko, D.A. Química para as ciências da saúde: Uma introdução a química geral, orgânica e biológica. São Paulo, 2ªEd: Manole, 1992. 646p.