

TIRAS REAGENTES PARA UROANÁLISE COMO MÉTODO ALTERNATIVO NA DETERMINAÇÃO DE GLICOSINOLATOS TOTAIS EM SEMENTES DE COLZA¹

EXPEDITO PAULO SILVEIRA², GASTÃO C. GISLER³ e MARTA REGINA M. DE CERQUEIRA⁴

RESUMO - Foram desenvolvidos, em 1985, testes de laboratório em que se utilizou uma semente esmagada de cada uma das doze cultivares de *Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzg. e de uma de *Brassica campestris* L. disponíveis. Após o esmagamento, as sementes foram embebidas em 0,1 ml de água destilada, durante 24 horas, à temperatura ambiente, e submetidas à reação com tira de papel para uroanálise, que contém glicose-oxidase-peroxidase e cromógeno, para determinar a concentração de glicose. A correlação positiva não-quantificada, existente entre os resultados obtidos no teste de glicose, e os dados de determinação de glicosinolatos totais por cromatografia fase líquida/gasosa, divulgados na literatura pertinente, para as mesmas cultivares, valida aquele teste para os propósitos mencionados, embora careça de aperfeiçoamentos metodológicos, para se adquirir a rapidez e exatidão desejáveis.

Termos para indexação: *Brassica napus*, *Brassica campestris*.

UROANALYSIS TEST PAPER AS AN ALTERNATIVE METHOD TO DETERMINE TOTAL GLUCOSINOLATES IN OILRAPESEED

ABSTRACT - A bench test was conducted, in 1985, using a crushed seed of each one of the twelve cultivars of *Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzg. and one of *Brassica campestris* L. available. After crushing, the seeds were embebbed on 1 ml of distilled water, during 24 hours at room temperature, and submitted to reaction on uroanalysis test paper containing glucose-oxidase-peroxidase and a chromogen for determining the concentration of glucose. The positive nonmesuared correlation between the results obtained through this glucose test and the data of determination of glucosinolates by gas/liquid chromatography for the same cultivars as published in the current bibliography, indicates the validity of that test for the mentioned purposes, although some methodological improvements are needed to acquire the desirable rapidity and accuracy.

Index terms: *Brassica napus*, *Brassica campestris*.

INTRODUÇÃO

Colza é a denominação popular dada às espécies oleaginosas *Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzg., *Brassica campestris* L. e *Brassica juncea* (L.) Czern.

Essas espécies são cultivadas intensamente em regiões de clima subtropical, especialmente no hemisfério norte.

No Brasil, cultivares européias e canadenses de *napus* do tipo primaveril são cultivadas no Rio Grande do Sul, onde, no início da década de 80, alcançaram mil hectares anuais.

Antes e durante a II Grande Guerra, o óleo de colza era utilizado apenas como lubrificante alternativo, na falta do similar de origem mineral. Após, com a redução do ácido erúico de sua composição química, ao nível aceitável para a alimentação humana, tem sido amplamente utilizado para essa finalidade (Kramer et al. 1983).

Os valores nutritivos e comerciais do farelo, subproduto da extração química do óleo das sementes dessas oleaginosas, são prejudicadas pela presença de glicosinolatos, família

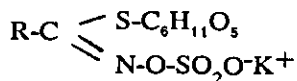
¹ Aceito para publicação em 13 de novembro de 1989

² Eng.-Agr., EMBRAPA/Centro de Pesquisa Agropecuária de Terras Baixas de Clima Temperado (CPATB), Caixa Postal 553, CEP 96100 Pelotas, RS.

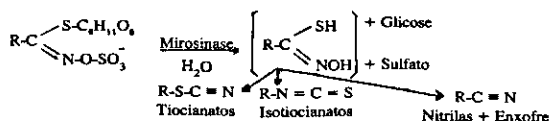
³ Bioquímico, Prof.-Assist., Inst. Quím. Geocien. UFPEL, Caixa Postal 577, Pelotas, RS.

⁴ Eng.^a Agr.^a, Estagiária-bolsista do CPATB/EMBRAPA.

química cuja fórmula geral, segundo Lerin (1980), é:



Pela ação hidrolítica de enzimas do grupo microsinase, presentes nos tecidos das espécies cultivadas de colza, os glicosinolatos desdobram-se em tio e isocianatos, nitrilas, aminas, sulfatos e glicose, conforme a reação descrita por Downey (1983):



Esses derivados têm sabor pungente, são tóxicos e goitrogênicos ativos, influenciando nas eficiências alimentar e reprodutiva, bem como no ganho de peso de animais não-ruminantes, quando presentes na sua dieta alimentar.

Para quantificá-los, o procedimento analítico usual utiliza a hidrólise enzimática do farelo e dosa os produtos resultantes desta reação por métodos titrimétricos (Wetter 1955), fotométricos (Wetter 1957), colorimétricos (Johnston & Jones 1966, Jürges 1978, McGregor 1978), de cromatografia de fase líquida/gasosa (Youngs & Wetter 1967) e de absorvância na faixa de UV (Wetter & Youngs 1976), todos citados por Röbbelen (1981).

Embora precisos, são métodos complicados, lentos e onerosos, características que limitam o uso de informações no melhoramento de plantas. É mais adequado a essa atividade o método opcional, que avalia, quantitativamente, até traços de B-D-glicose liberados na hidrólise enzimática de uma semente dessa espécie (Lein & Schön 1969, Lein 1970) e, até, de um cotilédone isolado (Lein 1970), autores citados por Röbbelen (1981). Uma versão simplificada desse método, barata e capaz de auxiliar na análise de milhares de amostras por dia, quantifica aquela substância pela dupla reação sequencial enzimática glicose-oxidase-peroxidase.

A necessidade de se dispor de um procedimento analítico de apoio às atividades do melhorista de colza, semelhante ao alternativo descrito, motivou a execução deste estudo, que analisou a viabilidade da utilização de tiras reagentes, para uroanálise, na avaliação indireta do teor de glicosinolatos totais das cultivares de *napus* e *campestris*, disponíveis para cultivo comercial no Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se sementes colhidas da base do racemo principal da inflorescência de plantas maduras de colza das cultivares Altex, Brutor, CTC 2, CTC 4, CTC 614, Gulliver, GB 8008, Lora, Niklas, Regent, SR 8 e Tower da espécie *Napus*, e Candle da espécie *Brassica campestris*, todas desenvolvidas em parcelas experimentais do ensaio de competição de tipos introduzidos, executado nas condições de cultivo do solo Vermelho-Amarelo Podzolizado da Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS. São populações de plantas originárias de países europeus e do Canadá; as identificadas pelas siglas CTC - Centro de Treinamento Cotrijuf, Ijuí, RS - e GB - Estação Experimental de Guaíba -, IPAGRO, RS se referem a introduções alienígenas bem sucedidas e que, por isto, foram rebatizadas por quem as selecionou e as recomendou no Brasil.

Noventa dias após a colheita, ocasião em que as sementes apresentavam 7,8% de umidade, uma delas, tomada aleatoriamente entre as colhidas de cada cultivar, foi colocada no interior de uma placa-de-Petri. Ato contínuo, essas sementes foram esmagadas, uma a uma, com um pedaço de ferro adequado, que, após cada esmagamento, tinha o local de contato limpo com uma estopa de algodão, umedecida em álcool. Em seguida, com uma pipeta decimal, colocou-se 0,1 ml de água destilada sobre cada uma das esmagaduras e procedeu-se à cobertura de cada placa com a sobreplaca correspondente.

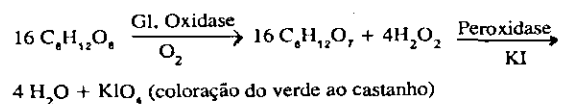
As sementes esmagadas permaneceram resguardadas, em contato com água destilada, durante 24 horas, na temperatura ambiente. Vencido esse prazo, efetuaram-se as aferições dos teores de glicose dissolvida, utilizando-se tiras de papel reagente Diastix para uroanálise, produzidas pelos Laboratórios Miles do Brasil Ltda. Adotaram-se os procedimentos da bula respectiva, com adaptações para as condições do teste em estudo.

As informações sobre os teores de glicosinolatos totais do farelo de algumas das cultivares estudadas, determinados por cromatografia de fase líquida/gasosa, foram obtidas na bibliografia especializada disponível.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora os glicosinolatos possam ser encontrados em todas as partes das plantas das brássicas cultivadas, a maioria dos trabalhos desenvolvidos se refere às relações entre estas substâncias e as estruturas que constituem as suas sementes, em decorrência, sem dúvida, da importância genética e econômica deste órgão reprodutivo. Esses compostos são acumulados gradativamente, à medida que a semente se desenvolve, e alcançam o teor máximo na ocasião da sua maturação (Kondra & Downey 1969, Byczynska et al. 1970), citados por Röbbelen (1981). Os dois autores, em 1970, apontaram a existência de uma correlação positiva entre a posição da síliqua na planta de colza e o conteúdo de glicosinolatos totais nas sementes; as provenientes da base do racemo principal da inflorescência tendem a formar maior quantidade dessas substâncias do que as demais. Das diversas partes da semente, a que corresponde ao embrião tem maior concentração desses compostos químicos (Josefsson 1970 b), citado por Röbbelen (1981).

Conforme ficou evidenciado na introdução deste trabalho, a glicose é uma das substâncias liberadas sempre que os glicosinolatos são hidrolisados enzimaticamente. A quantificação da sua presença, com a utilização de tiras de papel reagente para uroanálise, dá-se pela dupla reação seqüencial enzimática, ilustrada a seguir, em que a ação catalisadora da glicose oxidase possibilita a transformação da glicose,



dissolvida no meio aquoso, em ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Por sua vez, a ação semelhante da peroxidase permite a rea-

ção do peróxido de hidrogênio com o cromógeno iodeto de potássio, oxidando-o de modo a exibir colorações do verde ao castanho, respectivamente, em função da sua menor ou maior concentração na reação, o que está relacionado, por conseguinte, com a quantidade de glicose formada na amostra.

Esse método é aplicável apenas às sementes, pois estas estruturas formam somente traços de glicose livre, enquanto as folhas e outras partes verdes das plantas de colza possuem quantidades razoáveis dessas substâncias, em decorrência da fotossíntese.

A Tabela 1 ilustra os resultados das determinações de glicose nas sementes de treze cultivares de *B. napus* e *B. campestris*, e os de glicosinolatos totais, no farelo desengordurado de algumas delas. Esses valores foram obtidos, respectivamente, pelo teste em que se utilizaram tiras reagentes para a determinação de glicose na urina e de aferições, via cromatografia de fase gasosa/líquida, cujos resultados foram compilados da bibliografia especializada disponível.

De modo geral, as cultivares comerciais introduzidas para cultivo no Rio Grande do Sul, têm teores baixos de glicose nas sementes e de glicosinolatos totais no farelo livre de óleo, pois 76% delas os apresentam, respectivamente, 100 mg/100 ml de solução e até 20,92 $\mu\text{mol/g}$ deste subproduto. As demais, ao contrário, os contêm de 250 a 500 mg/100 ml e até 72,07 $\mu\text{mol/g}$ da primeira e da segunda substância contidas nos mesmos meios mencionados anteriormente, valores que se revelam até cinco vezes superiores aos do grupo anterior.

As cultivares CTC 4, CTC 614, SR 8 e Tower, da espécie *napus*, formam o grupo das que apresentaram o menor teor de glicose (< 100 mg/100 ml de solução), mas que adquire uma posição intermediária, quando se consideram as concentrações de glicosinolatos totais de todas as que estão relacionadas na Tabela 1 (de 7,82 a 20,92 $\mu\text{mol/g}$ de farelo). Situação inversa é proporcionada pela cultivar Candle, da espécie *Brassica campestris*, que exibiu os mais baixos teores desses compostos

químicos (de 8,8 a 9,78 $\mu\text{mol/g}$ de farelo), mas apresentou quantia maior de glicose (100 mg/100 ml de solução), fato que a assemelha às integrantes de grupo de *napus* formado por Altex, CTC 2, GB 8002, Lora e Regent.

O fato de as cultivares Tower e CTC 4 (ex-Erglu) terem sido as primeira melhoradas geneticamente para baixos teores de óleo erúxico e glicosinatos nas sementes, respectivamente no Canadá (Stefansson & Kondra 1975) e na Alemanha (Röbelen 1976), citados por Stefansson (1983), reforça a validade dos resultados da Tabela 1. Posteriormente, de 1977 a 1981, as cultivares Altex, Regent e Candle, também listadas nessa tabela, foram desenvolvidas no Canadá (Stefansson 1983), com o mesmo objetivo mencionado anteriormente, o que, por analogia, possibilita a inferência de

que as duas primeiras podem apresentar, também, quantias relativamente baixas daqueles compostos químicos.

As cultivares Brutor, Niklas e Gulliver formam o grupo das que apresentaram os maiores teores de glicose (de 250 a 500 mg/100 ml de solução). As duas primeiras não dispõem, no âmbito deste trabalho, de informações sobre o teor de glicosinatos totais, mas a última, comparativamente às demais da tabela, o exibiu no nível máximo (de 66,26 a 72,07 $\mu\text{mol/g}$ de farelo). Aliás, no que respeita ao desempenho da cultivar Gulliver, em relação a essas substâncias, Olsen & Sørensen (1980), citados por Larsen et al. (1983), sugerem serem estas dez vezes superior nela, quando comparada, quantitativamente, com outras cultivares européias.

A precisão e a praticidade do teste de uroa-

TABELA 1. Teores de glicose nas sementes, e de glicosinatos totais no farelo desengordurado, de cultivares de *Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzg. e de *Brassica campestris* L. introduzidas da Europa e do Canadá. Pelotas, RS, 1985/86.

Espécie/cultivar	Origem	Glicose (mg/100 ml solução)	Glicosinatos ($\mu\text{mol/g}$ farelo deseng.)
<i>Brassica campestris</i> L. Candle	Canadá	100	8,8 ^b - 9,78 ^b
<i>Brassica napus</i> L. CTC 4 ^a	Alem./Brasil		7,82 ^b - 12,05 ^b - 15,30 ^c
CTC 614 ^a	Alem./Brasil	< 100	
SR 8 S-T 77-33	Alemanha		
Tower	Canadá		9,86 ^b - 20,92 ^b
Altex	Canadá		
CTC 2 ^a	Alem./Brasil		
GB 8009 ^a	Alem./Brasil	100	
Lora	Alemanha		
Regent	Canadá		
Brutor	França		
Niklas	Suécia	250	
Gulliver	Suécia	500	66,26 ^b - 72,07 ^b

^a Sigla de rebatização das cultivares introduzidas Erglu, SR 8 S-T 77-33 e Egra, e da seleção CTC 4, respectivamente da superior à inferior identificadas.

^b Sørensen 1981.

^c Röbelen 1981.

nálise podem ser melhoradas, em função de ajustes que poderão ser introduzidos na sua metodologia de execução. Aspectos como a relação entre as quantidades de água e de semente, tempo de contato da(s) semente(s) esmagada(s) com a água destilada, e a temperatura do ambiente onde se encontra o recipiente que a(s) contém, durante o período de embebição, são passíveis de serem estudados, futuramente, visando um ajuste mais apropriado às necessidades do melhorista de colza.

A observação não detalhada do conteúdo numérico da Tabela 1 permite visualizar que, embora se tenha aferido a presença de substâncias completamente diferentes, mas intimamente relacionadas entre si, por meios e unidades de medida diversos, em materiais de constituição distintas, de modo geral, aos menores valores de glicose correspondem os de semelhante magnitude de glicosinolatos totais, sendo verdadeiro o inverso desta relação. Isto sugere a necessidade de estudos específicos que, através da calibração dos dois métodos estudados, permitam, via de regra, o estabelecimento de fator(es) de correção, em função de ajustes matemáticos apropriados a esse tipo de relação.

CONCLUSÃO

Embora careça de aperfeiçoamento metodológico, o teste de uroanálise pode ser utilizado na determinação indireta de glicosinolatos totais pelo melhorista de colza.

REFERÊNCIAS

- DOWNEY, R.K. The origin and description of the *Brassica* oilseed crops. In: KRAMER, J.K.L. et al. ed. **High and low erucic acid rapeseed oils**. Toronto, Academic Press, 1983. p.1-20.
- KRAMER, J.K.L.; SAUER, F.D.; PIDGEN, W.J. **High and low erucic acid rapeseed oils**. Toronto, Academic Press, 1983. p.5-82.
- LARSEN, L.M.; LIND, F.; NIELSEN, J.K.; OLSEN, O.; PEDERSEN, L.; SØRENSEN, H. Studies of insects associated with crucifers: host plant selection as a function of allelochemicals present in the plants. Problems related to rape containing high and low concentrations of glucosinolates. In: CONGRÈS INTERNATIONAL SUR LE COLZA, 6, Paris. **Actes ...** Paris, Group Consultative International de Recherche sur le Colza, 1983. p.270-5.
- LERIN, J. Influence des substances allélochimiques des crucifères sur les insectes. **Acta Ecol./Ecol. Gen.**, 1(3):215-35, 1980.
- RÖBELEN, G. Breeding for low content of glucosinolates in rapeseed. In: BUNTING, E.S., ed. **Production and utilization of protein in oilseed crops**. Boston, Martinus Nijhoff publishers, 1981. p.107-26.
- SØRENSEN, H. New method of quantitative analysis of glucosinolates. In: BUNTING, E.S., ed. **Production and utilization of protein in oilseed crops**. Boston, Martinus Nijhoff publishers, 1981. p.91-106.
- STEFANSSON, B.R. The development of improved rapeseed cultivars. In: KRAMER, J.K.L. et al. ed. **High and low erucic acid rapeseed oils**. Toronto, Academic Press, 1983. p.143-59.