

Detecção de antocianinas em flores de soja

SOARES, J. E. S.¹; POLISELI, C. B.²; VERONEZZI, G.³; NUNES, E. O.⁴; GAZZONI, D. L.⁴; HOFFMANN-CAMPO, C. B.⁴

¹UNOPAR, Bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR, jaumlais@hotmail.com; ²Mestranda em Biotecnologia Ambiental, PBA/UEM; ³Laboratório de Ecologia Química da Embrapa Soja;

⁴Pesquisador, Embrapa Soja.

Introdução

A soja (*Glycine max* L. Merrill), é uma planta autógama possuindo características reprodutoras de ambos os sexos, desta forma possibilitando a autopolinização (Gazzoni, 2017). Entretanto, regularmente são encontrados polinizadores forrageando a soja no campo. Um dos recursos para o aumento da produtividade é o uso de abelhas como agentes polinizadores, atraídas por estímulos químicos e visuais, sendo a *Apis mellifera* responsável por 80% da polinização entomófila (McGregor, 1976). Segundo Veddeler et al (2008), mesmo em espécies vegetais onde ocorre a autofecundação, é evidente a contribuição e o valor econômico dos polinizadores em áreas agrícolas. Em geral, a eficiência na polinização está vinculada ao comportamento dos polinizadores, aspectos morfológicos da flor (Ne'eman et al. 2010) e características do néctar, que é a maior recompensa para o agente polinizador (Delaplane; Mayer, 2000), assim como odores florais produzidos por compostos voláteis orgânicos e por pigmentos que conferem diferentes cores a frutos e flores.

As cores florais e de frutas derivam de um pequeno grupo de pigmentos principalmente carotenóides, betacianinas, flavonas e flavonóis e, principalmente, de antocianinas. Esse último flavonoide é responsável pela ampla gama de cores nas pétalas das flores das plantas que podem variar do rosa-salmão, passando pelo escarlata, magenta e violeta, até o azul profundo (Haslam, 1995).

A estrutura da antocianina consiste em três anéis aromáticos, que dependendo da oxidação do carbono do anel central, dá origem as antocianinas, como a pelargonidina (responsável pela coloração laranja a vermelho), cianidina/peonidina, (vermelho a púrpura), delphinidina/petunidina/malvidina (púrpuro a azul). Essa classe de flavonoides pode apresentar substituintes como: açúcares (glicose, galactose, ramnose, arabinose e xilose) e grupos acilas

(ácido hidroxí-cinâmico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico e ácido ferúlico) (Simões et al., 1999), dando origem a mais de 600 tipos diferentes de antocianinas (Davies; Schwinn, 2017). Nas pétalas de flores, as formas conjugadas (antocianinas) localizadas, em geral, nos vacúolos, são solúveis em água e razoavelmente estáveis, enquanto as agliconas (antocianidinas) produzidas por hidrólise ácida são insolúveis em água, instáveis na presença de luz e rapidamente destruídas em meio alcalino (Harborne, 1967). Segundo esse mesmo autor, a principal função das antocianinas é, sem dúvida, a atração de insetos e pássaros para que eles promovam a polinização e a dispersão de frutos, respectivamente.

Esse trabalho teve como objetivo a comparação de duas metodologias de extração das antocianinas, presentes em flores de soja, para se comprovar a eficácia dos métodos testados. Os resultados obtidos nesse trabalho poderão contribuir para futuras pesquisas de para o melhor entendimento da interação soja com abelhas.

Material e Métodos

Planejamento Experimental

O perfil antociânico de flores de soja foi avaliado no Laboratório de Ecologia Química da Embrapa Soja, em Londrina, PR. Para a obtenção das flores utilizadas nas análises, foram cultivadas no campo sementes de soja de dois genótipos com flores roxas (BRS 399 RR e BRS 1001 IPRO) e dois como flores brancas (BRS 388 RR e DonMario 6563 IPRO).

Obtenção, acondicionamento e preparo e das amostras

No período de antese, flores de cada genótipo foram coletadas, envoltas em papel alumínio, transferidas para caixas de isopor contendo bolsas de gelo e, imediatamente, transportadas para o laboratório de Ecologia Química. No laboratório as pétalas foram separadas da estrutura floral com o auxílio de uma pinça metálica, pesadas em uma balança analítica Marte, modelo AY220 (100mg/unidade amostral) e acondicionadas em tubos plásticos com capacidade de 2,0 mL. De cada genótipo foram coletadas no campo pelo menos

quatro amostras individuais, que foram armazenadas a -20°C , em freezer, até o momento da extração pelo Processo A e Processo B.

Processo de extração A

Na extração foram utilizadas 300 mg de pétalas de flor de soja, que foram transferidas para um micro tubo estéril (2,0 mL) contendo 3 microesferas de aço inoxidável, seguido da adição de 1mL de solução extratora composta por metanol: acetonitrila: água + 0,1% de ácido fórmico (8:1:1). Na sequência, as amostras foram submetidas à trituração e maceração por 5min num homogeneizador (L-Beader). Em seguida, foram centrifugadas em centrífuga da marca Thermo modelo, Legend X1R por 15min à 4°C , numa velocidade de 8.000 RPM. A extração foi feita por partição e massa obtida foi submetida a três extrações sequenciais com adição de 1mL de solução extratora a cada partição. O sobrenadante foi coletado em um único micro tubo (amostra composta) e filtrado através de membrana com poro de $0,22\ \mu\text{m}$ da marca Millipore. O extrato filtrado foi seco sob atmosfera de nitrogênio e armazenado em freezer (-20°C). Durante o processo de extração, sempre que possível, as amostras foram mantidas ao abrigo de luz.

Processo de extração B

No segundo processo de extração, 300mg de pétalas de flor de soja foram transferidas para um micro tubo estéril (2 mL) contendo 3 microesferas de aço inoxidável. Em seguida, foram adicionados 2,0 mL da mesma solução extratora utilizada no processo A. Posteriormente, as amostras foram submetidas a agitação por 5min em agitador de tubos do tipo “Vortex” e mantidas em repouso por 10 min ao abrigo da luz para completar a extração. Decorrido esse tempo, as amostras foram centrifugadas à 4°C , por 15min à 8.000 RPM. O sobrenadante foi coletado em um único micro tubo (amostra composta), e filtrado duas vezes através de membranas com poro de ($\text{Ø}=0,45\ \mu\text{m}$ e $\text{Ø}=0,22\ \mu\text{m}$), da marca Millipore. O extrato filtrado foi seco sob atmosfera de nitrogênio e armazenado, ao abrigo de luz, em freezer (-20°C).

Otimização das condições cromatográficas

A análise para quantificação das antocianinas foi realizada em equipamento UPLC® modelo Acquity, da marca Waters. A separação foi realizada utilizando-se uma coluna de fase reversa Acquity UPLC BEH Shield, com 150 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e partículas de 1,7 µm. Para a detecção dos compostos foi utilizado o detector de arranjo de fotodiodos (DAD).

A identificação das antocianinas foi realizada comparando-se os espectros e os tempos de retenção dos picos das amostras com os picos de padrões malvina, pelargonina, cianina, malvidina, pelargonidina, cianidina, peonidina, petunidina e delphinidina (Tabela 1), adquiridos da Sigma Aldrich Brasil. Para a identificação das antocianinas nas amostras foram utilizados os padrões já especificados como referência, com concentrações pré estabelecidas. O método utilizado foi o de padronização externa (altura dos picos).

Tabela 1. Padrões de antocianinas e antocianidinas utilizados

Padrões	Grau de pureza (%)	Presença na pétala de soja
Cloreto de Cianina	90	+
Cloreto de Delphinidina	95	+
Cloreto de Pelargonina	88	-
Cloreto de Malvina	90	+
Cloreto de Cianidina	95	+
Cloreto de Malvidina	95	+
Cloreto de Peonidina-3-O-glucosideo	95	-
Cloreto de Pelargonidina	95	-
Cloreto de Delphinidina-3-O-B-D- glucosideo	95	+
Cloreto de Petunidina-3-O-B-D- glucosideo	96	-

As condições cromatográficas e os parâmetros de controle estabelecidos para a realização das corridas cromatográficas estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros e condições analíticas.

Parâmetros	Condições	Especificação
Fase móvel	Composição	Fase orgânica: ACN 100% Fase aquosa: H ₂ O+0,15% FA
	Sistema de eluição	Gradiente de 5% a 75% de ACN.
	Tempo de corrida cromatográfica	12 minutos e 30 segundos
	Fluxo	0,35 mL/min
Pressão	Coluna	ACQUITY UPLC® BEH Shield RP18 (150mm x 2,1 mm e partículas com 1,7µm)
Temperatura	Auto amostrador	12°C
	Forno da coluna	35°C

Resultados e Discussão

Pelos resultados obtidos foi possível observar maior número de compostos e em maior quantidade quando a extração foi realizada pelo procedimento B, em comparação com o método de extração A (Fig. 1). Nesse método apenas três moléculas foram encontradas, cianina, malvina e pelargonina, sendo as duas últimas observadas apenas na cultivar BRS1001 IPRO. Na análise do extrato obtido pelo processo de extração B foi possível detectar, as duas antocianidinas (cianidina, malvidina) e duas antocianinas (petunidina-3-0-glucosídeo e delphinidina-3-0-glucosídeo), além das três antocianinas detectadas nos extratos obtidos pelo processo de extração A, cianidina, malvidina, petunidina-3-0-glucosídeo e delphinidina-3-0-glucosídeo. O processo de extração com o L-Beader e o fracionamento de extração (processo A), possivelmente pode ter causado maior quebra e degradação das moléculas. O maior tempo de descanso no escuro, antes de centrifugar, também pode ter sido fator determinante para a presença das antocianinas e antocianidinas observadas nas análises dos extratos obtidos pelo processo B. Entretanto, maior a detecção de antocianidinas (agliconas) nos extratos B pode ter causado uma hidrólise mais intensa. Dessa forma é possível sugerir que mais estudos devem ser realizados para se obter um processo de extração ideal para o processamento de amostras de flores de soja.

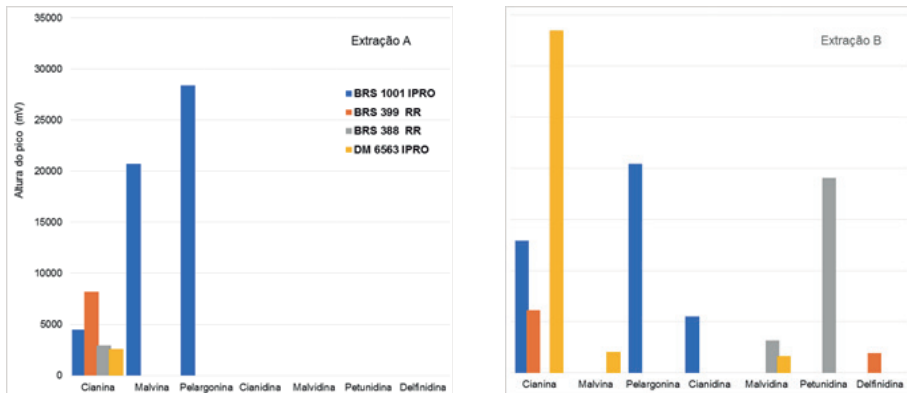


Figura 1. Antocianinas detectadas em extratos de pétalas de flores de quatro cultivares de soja submetidas a dois métodos de extração: fracionada e com agitação por homogeneizador (Extração A) e não fracionada e com agitação em agitador de tubos tipo “Vortex” (Extração B).

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos indicam que pelo Método B mais antocianinas são extraídas em relação ao método A. Entretanto, a maior incidência de agliconas deve ser investigada com mais intensidade e mais estudos deverão ser realizados para que se tenha uma exatidão quanto à concentração e as formas das antocianinas (conjugadas e agliconas) presentes nas flores de soja.

Referências

DAVIES, K. M.; SCHIMM, K. E. Anthocyanins. In: GOULD, K.; DAVIES, K.; WINEFIELD, C. (Ed.). **Encyclopedia of applied plant sciences**. 2. ed. Kidlington: Academic Press, 2017. p. 355-363.

DELAFLANE, K. S.; MAYER, D. F. **Crop pollination by bees**. New York: CABI Publishing, 2000. 301 p.

GAZZONI, D. L. **Soybean and bees**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. 147 p.

HARBORNE, J. B. **Comparative biochemistry of the flavonoids**. New York: Academic Press, 1967. 90 p.

HASLAM, A. Fruit and floral pigmentation. **Review of Progress in Coloration**, Sheffield, v. 25, p. 18-28, 1995.

McGREGOR, S. E. **Insect pollination of cultivated crop plants**. Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, 1976. 411 p.

NE'EMAN, G.; JÜRGENS, A.; NEWSTROM-LLOYD, L.; POTTS, S. G.; DAFNI, A. A framework for comparing pollinator performance: effectiveness and efficiency. **Biological Reviews**, v. 85, n. 3, p. 435-451, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora UFRGS, 1999. 1102 p.

VEDDELER, D.; OLSCHESKI, R.; TSCHARNTKE, T.; KLEIN, A. M. The contribution of non-managed social bees to coffee production: new economic insights based on farm-scale yield data. **Agroforestry Systems**, v. 73, n. 2, p. 109-114, 2008.