

Foto: Oscar Fontão de Lima Filho



Metodologia para Quantificação de Sorgoleona em Raízes de Sorgo Sacarino

Rômulo Penna Scorza Junior¹

A utilização do sorgo-sacarino (*Sorghum bicolor* L. Moench) como matéria-prima complementar à cana-de-açúcar, para maximização da produção de etanol, tem sido vislumbrada pelo setor sucroalcooleiro energético em Mato Grosso do Sul. Uma das vantagens é a utilização do sorgo sacarino no período de entressafra da cana-de-açúcar. No entanto, ainda existem incertezas com relação à viabilidade técnica e econômica do cultivo do sorgo sacarino em Mato Grosso do Sul. Uma das incertezas se refere ao efeito alelopático do sorgo sacarino e à possível interferência deste no desenvolvimento, por

exemplo, da soja em sucessão (OLIBONE et al., 2006). Esse efeito alelopático é causado pela liberação de compostos fenólicos, glicosídeos cianogênicos e, principalmente, pela benzoquinona denominada sorgoleona (Figura 1), onde os maiores teores são encontrados nos pelos radiculares de plântulas de sorgo (WESTON et al., 2013). Amali et al. (2014) mencionam que a sorgoleona pode corresponder de 76% a 99% da constituição total dos exsudatos dos pelos radiculares em plantas de sorgo. Sua concentração pode chegar a 20 mg g⁻¹ de raiz seca (DAYAN et al., 2010).

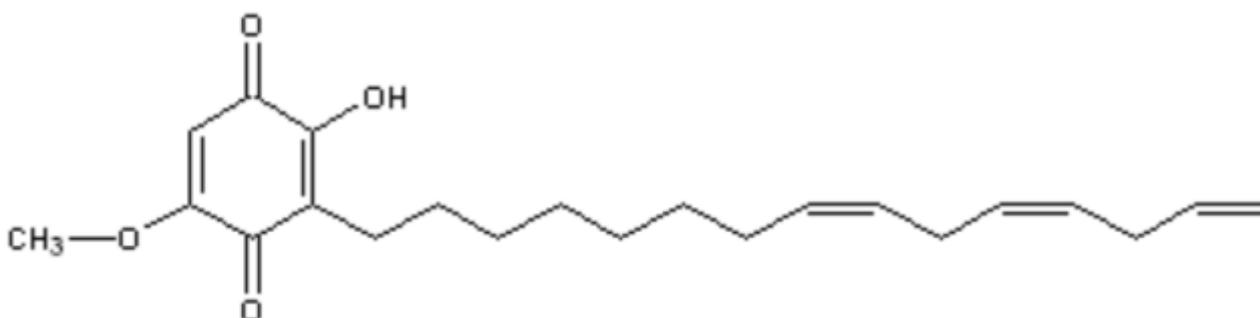


Figura 1. Estrutura química da sorgoleona (2-hidroxi-5-metoxi-3[(8'Z,11'Z)-8',11',14'-pentadecatrieno]-p-benzoquinona).

⁽¹⁾Engenheiro-Agrônomo, doutor em Ciências Ambientais, pesquisador da Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS.

Com o propósito de subsidiar a introdução desta cultura de forma segura nos sistemas de produção em Mato Grosso do Sul, é de fundamental importância a quantificação dos teores de sorgoleona em plantas de sorgo sacarino, pois, com essa informação, é possível gerar subsídios para minimizar os possíveis efeitos negativos nas culturas em sucessão ao sorgo sacarino. Sendo assim, a definição de uma metodologia para quantificação dos teores de sorgoleona em raízes das plântulas de sorgo sacarino é de grande importância. Essa metodologia foi baseada na proposta de Franco et al. (2011), adaptando-se conforme disponibilidade de reagentes e estrutura do Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas da Embrapa Agropecuária Oeste. Como os maiores teores de sorgoleona são encontrados nos pelos radiculares de plântulas de sorgo sacarino, optou-se neste trabalho pelo uso dessas plântulas, procurando-se obter os maiores teores possíveis de sorgoleona a serem extraídos.

Como primeiro passo na definição da metodologia para extração e quantificação de sorgoleona em raízes de sorgo sacarino, obteve-se o padrão analítico de sorgoleona com 95% de pureza, que foi doado pelo Dr. Frank E. Dayan, pesquisador do Natural Products Utilization Research, do Agricultural Research Service, do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). A partir do padrão analítico, preparou-se uma solução estoque com concentração de 1 mg mL^{-1} , diluindo-se 5 mg de sorgoleona em 5 mL de acetonitrila grau HPLC. A partir dessa solução estoque, foram feitas as soluções de trabalho por meio de diluições sucessivas, obtendo-se as seguintes concentrações para construção da curva analítica de quantificação: 5, 10, 20, 50 e $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Todas as soluções foram armazenadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Para identificação e quantificação de sorgoleona foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo Varian 920-LC[®] equipado com uma coluna de fase reversa C-18 Polaris[®] (25 cm x 4,6 mm x 5 μm), pré-coluna C-18 Polaris (2,5 cm x 4,6 mm x 5 μm) e detector de arranjo de diodos. As condições para quantificação da sorgoleona foram por eluição isocrática (75:25 v/v acetonitrila:solução de ácido acético 88:12 v/v), com fluxo de 1 mL min^{-1} e volume de injeção de 20 μL . A temperatura do forno da coluna foi de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e o comprimento de onda de leitura igual a 280 nm. Nessas condições, o tempo de retenção da sorgoleona foi de 20,35 minutos. A quantificação de sorgoleona foi realizada por meio da comparação das áreas dos picos nas amostras com a curva de calibração obtida com as injeções dos padrões analíticos. Após a definição das condições para

quantificação de sorgoleona por cromatografia líquida de alta eficiência, estabeleceu-se um experimento para caracterização de quatro variedades de sorgo sacarino (BRS 506, BRS 508, BRS 509 e BRS 511), quanto à presença de sorgoleona. Para esse experimento utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (variedades) e cinco repetições. Para extração de sorgoleona foram utilizadas raízes de 100 plântulas de cada variedade. Essas raízes foram obtidas colocando-se 50 sementes, de cada variedade, em caixas gerbox forradas com papel de filtro umedecido com água ultrapura. Para germinação das sementes, as caixas gerbox foram colocadas, por 12 dias, em câmaras tipo BOD a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e 24 horas de luz. Para a extração da sorgoleona nas raízes de 100 plântulas, essas foram imersas durante 10 segundos em uma solução de 20 mL de diclorometano PA ACS ISO com 12 μL de ácido acético. Posteriormente, esse extrato foi evaporado na capela de exaustão em temperatura ambiente, sendo o material sólido ressuspenso em acetonitrila grau HPLC. Todas as amostras foram filtradas em filtro de celulose regenerada de 0,45 μm e armazenadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento da injeção no cromatógrafo líquido de alta eficiência. Após extração, determinou-se o peso seco das raízes utilizando-se estufa de secagem e deixando as raízes por 4 horas a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, até peso constante.

Os dados referentes à quantidade de sorgoleona, por peso seco de raiz, foram submetidos à análise de variância utilizando o programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012) e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

A curva analítica para quantificação da sorgoleona é apresentada na Figura 2. Observa-se que a faixa linear de concentração ficou entre 5 e $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, com valor do coeficiente de determinação superior a 0,99. Diante disso, todas as quantificações de sorgoleona utilizando essa metodologia foram feitas nesse intervalo de concentração e, quando necessário, foram feitas diluições das amostras. O limite de quantificação do método analítico utilizado foi de $5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, que corresponde ao menor valor da curva analítica.

Os cromatogramas dos padrões analíticos nas concentrações de 5, 10, 20, 50 e $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ são apresentados na Figura 3. Observa-se que, para todas as concentrações, os picos cromatográficos apresentaram resolução adequada, permitindo uma boa eficiência para separação.

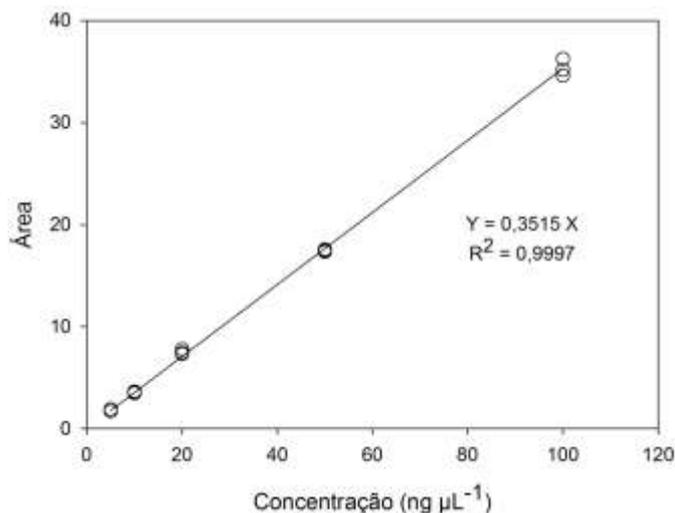


Figura 2. Curva analítica de quantificação de sorgoleona por cromatografia líquida de alta eficiência.

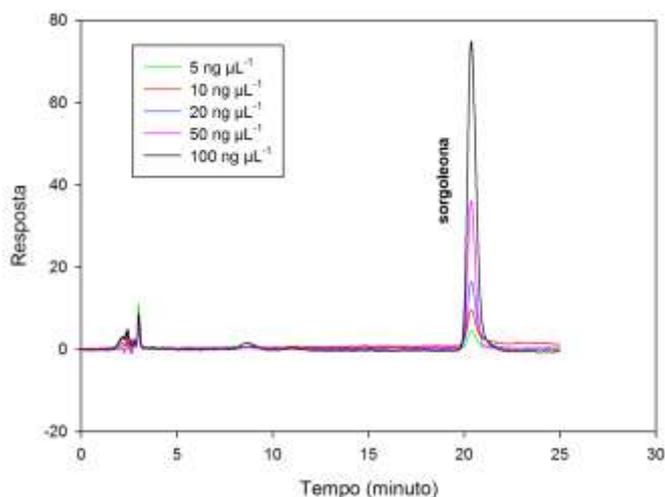


Figura 3. Cromatogramas dos padrões analíticos de sorgoleona nas concentrações de 5, 10, 20, 50 e 100 ng µL⁻¹ por cromatografia líquida de alta eficiência.

Na Figura 4 são apresentados os cromatogramas das amostras referentes aos extratos de raízes das plântulas de quatro variedades de sorgo sacarino: BRS 206, BRS 208, BRS 209 e BRS 211. De maneira geral, não foram observados picos de compostos interferentes próximos ao tempo de retenção da sorgoleona. Em todos os cromatogramas das amostras, também observou-se boa resolução cromatográfica dos picos de sorgoleona. As diferenças observadas nas alturas e áreas dos picos de sorgoleona, para as quatro variedades de sorgo sacarino, se devem às diferenças nas concentrações de sorgoleona nos extratos das raízes. Ilustrando essas diferenças, o maior pico observado para a BRS 506 (Figura 4A) evidencia as maiores concentrações de

sorgoleona no extrato dessa variedade, quando comparada às outras avaliadas. Importante salientar que foi necessário diluir 20 vezes os extratos iniciais antes da injeção das amostras para quantificação.

Utilizando-se dessa metodologia de extração e quantificação de sorgoleona, observa-se que os valores das concentrações de sorgoleona nas quatro variedades de sorgo sacarino avaliadas (BRS 506, BRS 508, BRS 509 e BRS 511) variaram de 8,7 a 21,9 mg g⁻¹ de raiz seca (Figura 5). Os maiores valores de sorgoleona foram encontrados para as variedades BRS 506 e BRS 508, que não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$). Esses valores foram, aproximadamente, duas vezes superiores ao encontrado para a variedade BRS 511, que apresentou o menor valor de sorgoleona. Os valores máximos de sorgoleona encontrados nas variedades BRS 506 e BRS 508 são próximos aos relatados por Dayan et al. (2010) em exsudatos de raízes de sorgo, que foram próximos a 20 mg g⁻¹ de raiz seca.

Em síntese, a metodologia apresentada e descrita para quantificação de sorgoleona em raízes de plântulas de sorgo sacarino, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, tem como principal vantagem a fácil e rápida extração, necessitando apenas a imersão das raízes de sorgo sacarino em solução extratora, sem necessidade de purificação dos extratos. Isso foi possível em razão do não aparecimento de picos interferentes que prejudicasse a identificação da sorgoleona. Além disso, o limite de quantificação do método igual a 5 ng µL⁻¹ é baixo e bem inferior às concentrações de sorgoleona esperadas em raízes de sorgo-sacarino.

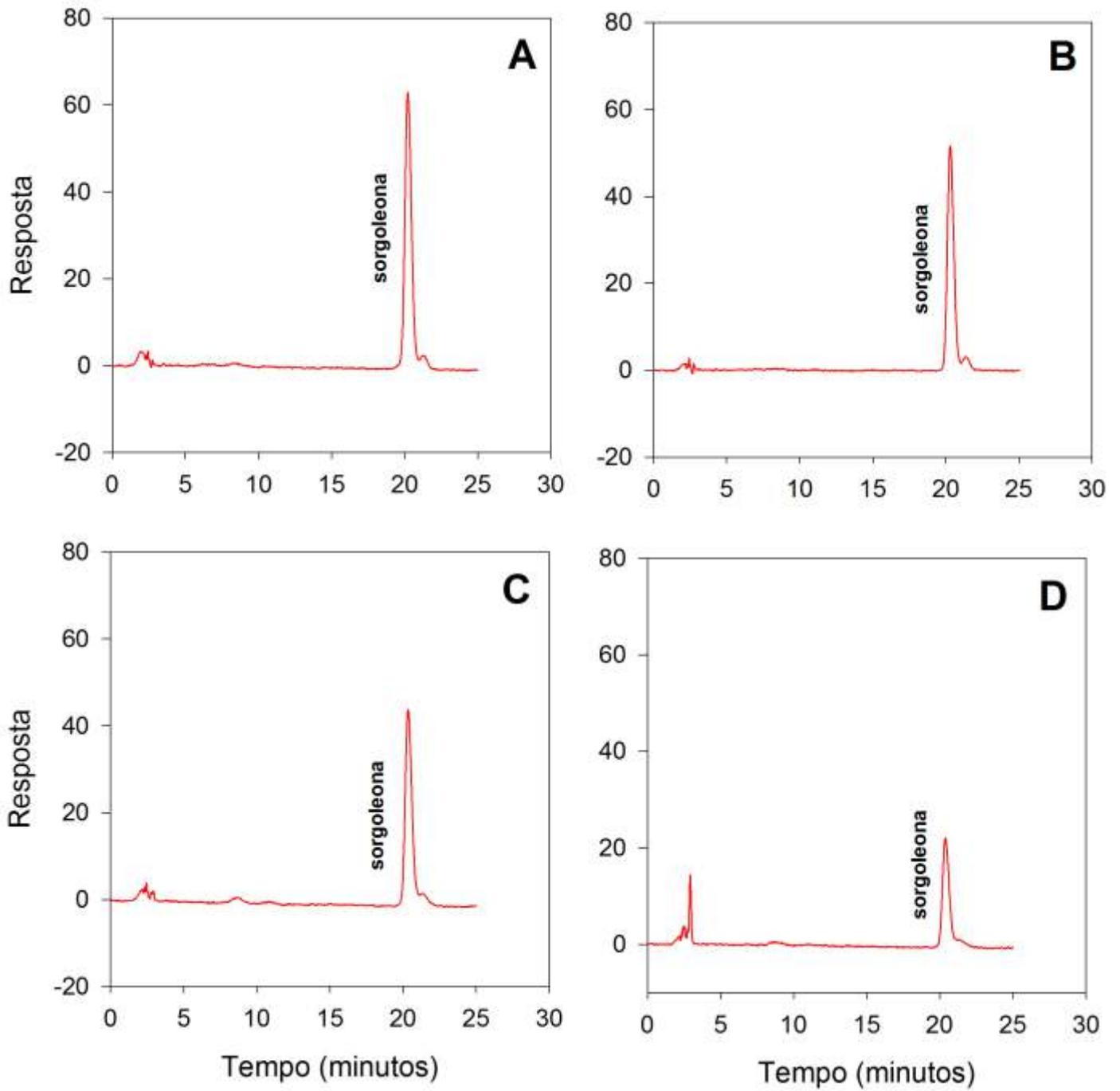


Figura 4. Cromatogramas das análises de sorgoleona nos extratos de raízes (diluição de 20 vezes) de plântulas das variedades: (A) BRS 506; (B) BRS 508; (C) BRS 509 e (D) BRS 511.

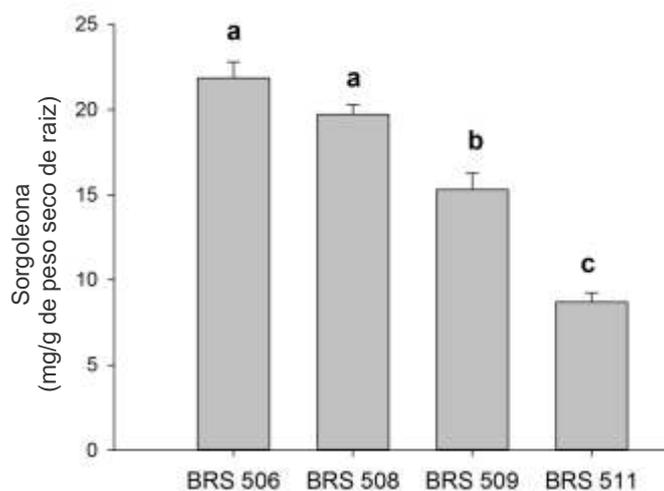


Figura 5. Concentrações médias, com respectivos erros padrões, de sorgoleona nos extratos de raízes de plântulas de sorgo-sacarino, das variedades BRS 506, BRS 508, BRS 509 e BRS 511.

Médias seguidas pela mesma letra nas barras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5%. CV = 15,2%.

Agradecimento

Ao técnico Klerisson de Souza Duro, pela ajuda nas análises laboratoriais e auxílio na condução do experimento.

Referências

- AMALI, J. P.; JAYASURYA, K. S.; IGNACIMUTHU, S. Sorgoleone from *Sorghum bicolor* as a potent bioherbicide. **Research Journal of Recent Sciences**, Indore, v. 3, ISC-2013, p. 32-36, 2014.
- DAYAN, F. E.; RIMANDO, A. M.; PAN, Z.; BAERSON, S. R.; GIMSING, A. L.; DUKE, S. O. Sorgoleone. **Phytochemistry**, Oxford, v. 71, n. 10, p. 1032-1039, 2010.
- FRANCO, F. H. S.; MACHADO, Y.; TAKAHASHI, J. A.; KARAM, D.; GARCIA, Q. S. Quantificação de sorgoleone em extratos e raízes de sorgo sob diferentes períodos de armazenamento. **Planta Daninha**, Campinas, v. 29, p. 953-962, 2011.
- OLIBONE, D.; CALONEGO, J. C.; PAVINATO, P. S.; ROSOLEM, C. A. Crescimento inicial da soja sob efeito de resíduos de sorgo. **Planta Daninha**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 255-261, 2006.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2012. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2012. Disponível em: <http://www.r-project.org/>. Acesso em: 19 dez. 2014.
- WESTON, L. A.; IBRAHIM, S. A.; BAERSON, S. R. Sorghum allelopathy – from ecosystem to molecule. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 39, n. 2, p. 142-153, 2013.

Comunicado Técnico, 200

Embrapa Agropecuária Oeste
Endereço: BR 163, km 253,6 - Caixa Postal 449
 79804-970 Dourados, MS
Fone: (67) 3416-9700
Fax: (67) 3416-9721
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição
 (2014): on-line

Ministério da
 Agricultura, Pecuária
 e Abastecimento



Comitê de Publicações

Presidente: *Harley Nonato de Oliveira*
 Secretária-Executiva: *Silvia Mara Belloni*
 Membros: *Auro Akio Otsubo, Clarice Zanoni Fontes, Danilton Luiz Flumignan, Fernando Mendes Lamas, Germani Concenção, Ivo de Sá Motta, Marciana Retore e Michely Tomazi*

Membros suplentes: *Augusto César Pereira Goulart e Crébio José Ávila*

Expediente

Supervisão editorial: *Eliete do Nascimento Ferreira*
 Revisão de texto: *Eliete do Nascimento Ferreira*
 Editoração eletrônica: *Eliete do Nascimento Ferreira*
 Normalização bibliográfica: *Eli de Lourdes Vasconcelos*