

I. FITOQUÍMICA E FISIOLOGIA DE PLANTAS

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÓLEO EM SEMENTES DE GIRASSOL PELOS MÉTODOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR E "SOXHLET" ^(1,2)

MARIA REGINA GONÇALVES UNGARO ^(3,7), NILVA MARIA PRESTES DE TOLEDO ⁽⁴⁾,
JOÃO PAULO FELJÃO TEIXEIRA ⁽⁵⁾ e JOSÉ SUASSUNA FILHO ⁽⁶⁾

RESUMO

Progênies e sementes individuais de algumas populações de girassol foram utilizadas em um estudo da adequação da técnica da ressonância magnética nuclear (RMN) para determinação do teor de óleo das sementes. Foram feitas análises de correlação entre essa técnica e o método de extração por "Soxhlet". Os resultados indicaram que o óleo contido nas sementes de girassol comporta-se como líquido na análise pela RMN; o fator geométrico não influenciou nas medições pela RMN; houve alta correlação entre os teores de óleo obtidos por "Soxhlet" e pelo método da RMN; os valores obtidos com o uso da RMN foram estatisticamente superiores aos obtidos por "Soxhlet"; não houve correlação significativa entre massa da semente e teor de óleo; houve uma variação de teor de óleo maior entre as sementes de um mesmo capítulo que entre capítulos de uma população. A amplitude de variação do teor de óleo entre as sementes de um mesmo capítulo indica a importância de se proceder à análise individual do teor de óleo das sementes, pela técnica da RMN, para o melhoramento visando aumento no conteúdo de óleo.

Termos de indexação: girassol, *Helianthus annuus* L., teor de óleo, RMN, "Soxhlet".

ABSTRACT

ANALYSIS OF OIL CONTENT IN SUNFLOWER SEEDS WITH NUCLEAR MAGNETIC RESSONANCE AND "SOXHLET" METHODS

Individual and group of seeds of some sunflower populations were utilized in order to evaluate the feasibility of oil content evaluations by the Nuclear Magnetic Resonance method (NMR). Correlation analysis with the extractive method ("Soxhlet") was performed. The results showed that: 1) the oil in the seeds behaved like a liquid in the NMR analysis; 2) there was a high and positive correlation ($r = 0.93$) between NMR and "Soxhlet" and data obtained by NMR were statistically higher than those obtained by "Soxhlet"; 3) there was no correlation between seed weight and oil content; 4) the observed variability in oil content among seeds of a plant were higher than between plants of a population; these values indicate the importance of making individual analysis of oil content by the NMR method for the sunflower breeding for oil content.

Index terms: sunflower, *Helianthus annuus* L., oil content, NMR, "Soxhlet".

⁽¹⁾ Trabalho apresentado na VII Reunião Nacional de Pesquisa de Girassol, realizada em Ijuí, RS, em julho de 1989. Recebido para publicação em 7 de março de 1991 e aceito em 30 de março de 1992.

⁽²⁾ Parcialmente financiado pelo Convênio IAC/FINEP/FUNDEPAG.

⁽³⁾ Seção de Oleaginosas, Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Caixa Postal 28, 13001-970 Campinas (SP).

⁽⁴⁾ Seção de Técnica Experimental e Cálculo, IAC, Caixa Postal 28, 13001-970 Campinas (SP).

⁽⁵⁾ Seção de Fitoquímica, IAC, Caixa Postal 28, 13001-970 Campinas (SP).

⁽⁶⁾ Departamento de Física, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 1170, 13081-970 Campinas (SP).

⁽⁷⁾ Com bolsa de pesquisa do CNPq.

1. INTRODUÇÃO

A determinação do conteúdo de óleo em sementes utilizando-se um método de extração é trabalhosa, demorada, e requer a destruição das sementes, apesar de apresentar boa precisão. A técnica da ressonância magnética nuclear (RMN), para análise do teor de óleo em sementes, é rápida e não destrutiva e tem sido comumente adotada por geneticistas e melhoristas de plantas.

O método da espectrometria da ressonância magnética nuclear baseia-se nas propriedades magnéticas dos núcleos atômicos. Alguns núcleos atômicos - no caso, os átomos de hidrogênio presentes na matéria graxa - estão aptos a absorver energia de determinada frequência quando colocados em um campo magnético. Este método se aplica somente para determinação de óleo nas sementes secas ou com umidade muito baixa (Madsen, 1976). O método da ressonância magnética nuclear pulsada parece ser mais específico para uma rápida determinação do conteúdo de óleo em sementes que contenham um nível mais elevado de umidade (5 a 6% em girassol).

A técnica da RMN permite a determinação quantitativa e qualitativa (Lakshminarayana et al., 1980) do óleo em sementes individuais de girassol, as quais poderão ser posteriormente utilizadas no plantio, ao contrário do método por extração em "Soxhlet", em que as sementes são destruídas e o que é plantado, na verdade, vem a ser a progênie de meios-irmãos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Antes de se iniciarem as determinações, foram feitas medições do tempo de relaxação transversal tanto em algumas amostras quanto no óleo delas extraído. O termo relaxação transversal diz respeito à energia transferida entre diferentes núcleos do sistema (Farlane & White, 1972). A importância do tempo de relaxação está em que ele estabelece um limite para a taxa na qual a energia de rádio-frequência pode ser administrada à amostra e, portanto, a magnitude do sinal que pode ser obtido.

Na primeira etapa de determinações, foram analisadas cem sementes individuais de girassol das populações Airelli e Uruguai, perfazendo um total de 200 sementes, pelo método não destrutivo, utilizando a técnica da ressonância magnética nuclear pulsada. As sementes foram analisadas com relação à porcen-

tagem em peso de óleo, através da comparação com amostras-padrão de óleo de girassol, extraídas quimicamente das sementes dessas populações. Tal procedimento foi utilizado em todas as análises realizadas com a RMN.

De posse dos resultados, as sementes foram separadas em grupos, de acordo com o teor de óleo acusado. Esses grupos foram, então, analisados pelo método "Soxhlet".

As sementes da população Uruguai foram separadas em três classes de teor de óleo: <30%; entre 30 e 35%, e >35%; a da população Airelli, em quatro classes: <30%; entre 30 e 35%; entre 35,01 e 40%, e >40%. Tais classes foram analisadas pelo método "Soxhlet" (AOAC, 1965). De posse dos resultados de ambos os métodos, procedeu-se a uma análise de correlação entre os valores médios de cada amostra obtidos pela RMN com os obtidos por "Soxhlet".

Como a classificação se baseou nos resultados da RMN, os teores médios de óleo por "Soxhlet" nem sempre permaneceram dentro das referidas classes.

O mesmo procedimento foi aplicado para sementes da população IAC-Anhandy.

Visando a um estudo da relação entre massa de semente e teor de óleo, instalou-se um campo da população IAC-Anhandy no Centro Experimental de Campinas (IAC). Após o florescimento, foram selecionados 146 capítulos pertencentes a plantas que se sobressaíram dentro da população, com relação às suas características agrônômicas, completando a secagem no laboratório. Foram, então, debulhados, retirando-se uma amostra de 40 sementes de cada um para análise de óleo por RMN, pelo método de análise de progênies.

Foram utilizados três padrões de óleo, a saber:

padrão n.º 1: massa das sementes de 1.564mg;

padrão n.º 2: massa das sementes de 2.550mg;

padrão n.º 3: massa das sementes de 3.092mg.

Cada um deles foi utilizado para medir o óleo das progênies com pouca, intermediária e bastante massa. De posse dos resultados, procedeu-se a uma análise de correlação entre massa das sementes e porcentagem de óleo.

Com a finalidade de avaliar o desempenho da técnica da RMN para seleção visando a teor de óleo em girassol, procedeu-se à análise de sementes indi-

viduais de 10 capítulos da população IAC-Anhandy. Esses capítulos foram selecionados do lote de 146 capítulos que haviam sido analisados como progênie, separando-se as plantas que apresentaram teor médio de óleo superior a 45%. Calculou-se o coeficiente de variação entre capítulos e dentro de um mesmo capítulo e a amplitude de variação entre e dentro de capítulos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média do tempo de relaxação transversal, T2, nas duas populações estudadas, bem como nos respectivos padrões de óleo, apresentou o valor de 100μs (microsegundos) com 10% de erro absoluto, indicando, portanto, que o óleo contido nas sementes de girassol se comportou como líquido.

As medidas fornecidas tiveram erro relativo de aproximadamente 3%, ou seja, para uma semente com teor de óleo de 30%, estima-se que o valor real esteja entre 29 e 31%.

Os dados do teor médio de óleo das sementes, agrupadas por classe, obtidos pela RMN e por "Soxhlet", encontram-se no quadro 1; os resultados dos dois métodos deram alta correlação (r = 0,96**) (Figura 1).

Para as análises realizadas na população IAC-Anhandy, o coeficiente de correlação também foi estatisticamente significativo (r = 0,93**) (Figura 2), encontrando-se os resultados no quadro 2.

Quadro 1. Resultados pela RMN e por "Soxhlet" das análises de sementes das populações Airelli e Uruguai, agrupadas por classe de teor de óleo pela RMN

Cultivar	Classe de teor de óleo %	Óleo	
		RMN	"Soxhlet"
Airelli	< 30	25,16	19,20
Airelli	30-35	32,14	25,52
Airelli	35-40	37,46	33,15
Airelli	> 40	44,09	39,39
Uruguai	< 30	28,37	27,01
Uruguai	30-35	32,45	27,17
Uruguai	> 35	35,92	32,39

r = 0,96**.

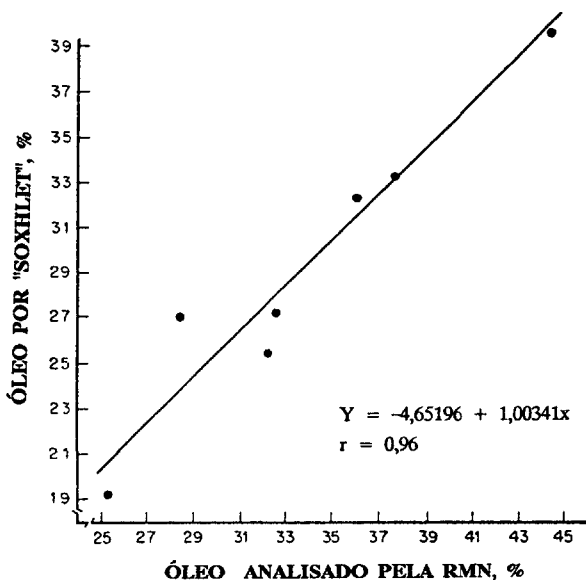


Figura 1. Relação entre os teores de óleo em sementes de girassol determinados por "Soxhlet" e RMN em classes de teor de óleo dos cv. Airelli e Uruguai

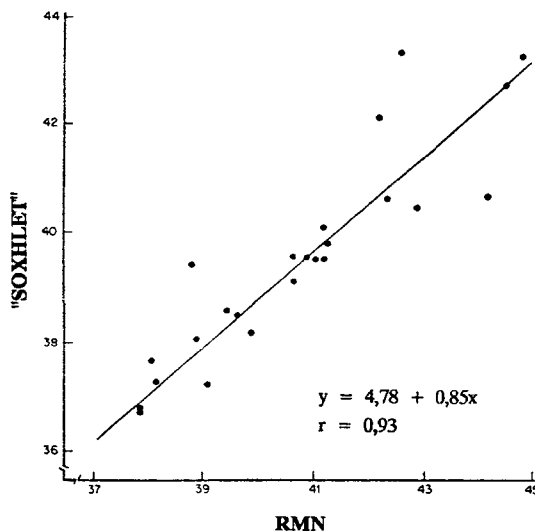


Figura 2. Relação entre "Soxhlet" e RMN na análise da população IAC-Anhandy

A análise estatística entre os dois métodos indicou que os dados obtidos pela técnica da RMN são superiores aos obtidos por "Soxhlet", a 5% de significância. Aliás, esse fato, já verificado no trabalho de Gupta et al. (1985), em diversas sementes oleaginosas, foi atribuído à extração incompleta e perda de óleo no processo de moagem da amostra antes da determinação por solvente ("Soxhlet").

Não houve correlação significativa entre massa de sementes e teor de óleo (Quadro 3), apesar da tendência de a semente mais pesada apresentar maior teor de óleo.

Observou-se uma variação muito grande no teor de óleo - entre as sementes pertencentes a um mesmo capítulo, o que viria explicar a baixa eficiência de seleção quando se utilizam como base os resultados de determinação por "Soxhlet", visto que as sementes a serem plantadas não são as que foram analisadas, pertencendo apenas ao mesmo capítulo (meios-irmãos). Apesar de a fonte de pólen ter pouca influência no conteúdo de óleo (Pawlowski, 1964), uma vez que o mesmo é determinado principalmente pelo genótipo materno, onde a semente se desenvolve, pequenas variações nesse teor são importantes em termos de melhoramento.

Tomando como exemplo o capítulo de nº 79 (Quadro 4), observou-se, através dos dados da análise individual pela RMN, que o conteúdo de óleo variou de 38,6 a 50,3%. Esse capítulo seria certamente selecionado, quer tivesse sido analisado pela RMN, quer pelo "Soxhlet". No entanto, no primeiro caso, só seriam utilizadas as sementes que apresentassem, na análise individual, teor de óleo superior a 45% (cerca de 40%); no entanto, se a análise tivesse sido feita por "Soxhlet", a chance de plantar sementes com teor de óleo inferior a 45% (cerca de 60% do capítulo) seria maior que no primeiro caso. Descontando toda a influência ambiental, a influência da localização da semente no capítulo - que é da ordem de 2 pontos percentuais - (Matthes & Ungaro, 1983) e a precisão da análise, ainda haveria uma diferença notável entre os dois extremos da amostra.

A amplitude de variação no teor de óleo entre as sementes de um mesmo capítulo dá uma indicação da provável importância de se proceder à análise individual do teor de óleo das sementes, pela técnica da RMN, para o melhoramento visando ao aumento do conteúdo de óleo em sementes de girassol.

Quadro 2. Resultados do teor de óleo obtidos com a mesma amostra analisada pela RMN e por "Soxhlet" (população IAC-Anhandy) e respectiva análise da variância

Amostra	RMN	"Soxhlet"	Amostra	RMN	"Soxhlet"
	nº			nº	
1	41,2	40,0	13	38,8	39,4
2	42,4	40,6	14	38,9	38,1
3	40,9	39,5	15	37,8	36,7
4	44,6	42,6	16	39,6	38,5
5	41,2	39,5	17	37,8	36,8
6	42,3	42,1	18	39,1	37,2
7	42,6	43,3	19	44,2	41,5
8	38,1	37,5	20	38,0	37,7
9	39,9	38,2	21	37,8	36,7
10	42,9	40,9	22	44,8	43,2
11	41,1	39,8	23	39,5	38,6
12	40,7	39,1	24	41,3	39,8
			25	40,7	39,5
Média	—	—	—	40,6	39,5

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamento	1	17,2813	17,2813	4,06*
Resíduo	48	204,3030	4,2563	
Total	49	221,5810		

Quadro 3. Resultados da análise de óleo pela RMN, considerando-se padrões para cada classe de massa de sementes

Massa	Amplitude de variação de óleo	Média da massa	Média de óleo
mg	%	—	% —
Entre 1.474 e 2.004	31,3 — 48,3	1.731	39,1
Entre 2.005 e 2.999	35,4 — 47,3	2.432	41,3
> 3.000	34,9 — 46,3	3.531	42,0

Quadro 4. Resultados da análise individual das sementes dos capítulos que mostraram maior teor de óleo na análise em grupo pela RMN

Capítulo	Amplitude da variância	Média de óleo	C.V. dentro de plantas
nº			%
04	41,6 — 49,7	44,8	4,45
24	40,2 — 48,6	43,7	15,93
27	40,0 — 50,2	45,3	5,53
40	41,8 — 49,0	46,7	3,85
64	41,8 — 49,2	46,3	4,06
79	38,6 — 50,3	44,6	5,56
112	40,8 — 47,3	43,8	3,97
126	43,7 — 50,0	47,2	3,60
133	42,2 — 48,2	45,7	3,22
150	40,7 — 48,0	44,9	3,25
Média	41,1 — 49,0	45,3	5,34

C.V. entre plantas com maior teor de óleo = 2,6%

4. CONCLUSÕES

1. O óleo contido nas sementes de girassol comportou-se como líquido na análise pela RMN.
2. Houve uma correlação positiva e alta entre os teores de óleo obtidos por "Soxhlet" e pela RMN.
3. Os dados obtidos pela técnica da RMN mostraram valores superiores aos obtidos por "Soxhlet", a 5% de significância.

4. Não houve correlação significativa entre massa de semente e teor de óleo.

5. Houve uma variação maior de teor de óleo entre as sementes de um mesmo capítulo que entre capítulos de uma mesma população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS (AOAC). *Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists*. 10.ed. Washington, D.C., 1965. 957p.
- GUPTA, S.K.; DHAWAN, K. & YADAVA, T.P. Estimation of oil content by side-line NMR. *Oil Crop Newsletter*, Addis Ababa, 2:17-21, 1985.
- LAKSHMINARAYANA, M.R.; SEETHARAM, A.; RAMANATHAN, K.V. & KHETRAPAL, C.L. NMR study of the oil build-up in sunflower seeds. *Current Science*, Bangalore, 49(8):308-309, 1980.
- McFARLANE, W. & WHITE, R.F.M. *Techniques of high resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy*. London, 1972. 137p.
- MADSEN, E. Nuclear magnetic resonance spectrometry as a quick method of determination of oil content in rapeseed. *Journal of the American Oil Chemists Society*, Champaign, 53(7):467-469, 1976.
- MATTHES, L.A.F. & UNGARO, M.R.G. Influência da localização da semente na porcentagem de óleo e no teor de umidade em capítulos de girassol. *Bragantia*, Campinas, 42:239-244, 1983. (Nota, 2)
- PAWLOWSKI, S.H. Seed genotype and oil percentage relationship between seeds of a sunflower. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, Ottawa, 6(3):293-297, 1964.