

Quantificação dos Ácidos Ferúlico e 5,5 - Diferúlico de Parede Celular de Milho

XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC

HÉLIO T. PRATES¹, ISABEL R. P. SOUZA¹, NADJA M. PIRES², MARCUS J. C. LOPES³, FREDERICO O. NAVES⁴, CRISTIANE TEIXEIRA⁴

¹Embrapa Milho e Sorgo. C. P. 151, 35701-970 Sete Lagoas, MG.
htprates@cnpms.embrapa.br, isabel@cnpms.embrapa.br, ²Bolsista RD CNPq,
nadja_oliveira@hotmail.com, ³Bolsista Convênio Embrapa/Unicentro Isabella Hendrix, ⁴BAP
Fapemig 885/97
Suporte financeiro: Prodetab 162-01/98, Fapemig CAG 885/97, CNPq

Palavras-chave: HPLC, *Zea mays* L., metabólitos secundários, ácidos fenólicos

Introdução

A quantificação dos ácidos ferúlico e di-ferúlico está associada à compreensão de diversos mecanismos em plantas. Ácido ferúlico se liga a parede celular de gramíneas através de reação de acoplamento catalisada pela peroxidase produzindo ácido diferúlico (Markwalder e Neukom, 1976). Ésteres diferulatos reforçam e entrelaçam a parede celular primária e ajudam as plantas a se defenderem de patógenos invasores (Bartolome et al., 1997, Bervingson et al., 1997). Ácidos fenólicos, em particular ácido diferúlico, tem aumentado em milho em ciclos de seleção para resistência a insetos herbívoros, resultando em uma parede celular mais rígida, especialmente nas folhas (Bergvinson et al., 1997). Devido a importância destes ácidos em plantas, este trabalho tem como objetivo proceder ajustes metodológicos necessários para análise qualitativa e quantitativa desses ácidos utilizando a técnica HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ou CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). As metodologias descritas por Shibuya (1984) e Kamisaka et al. (1991) serviram como referências.

Material e Métodos

Equipamento: cromatógrafo líquido de alta resolução (HPLC), marca Shimadzu, modelo LC-10A, equipado com duas bombas reguladoras de fluxo (LC-10AD), um degaseificador (DGU-4A), um detetor ultravioleta (SPD-10A), um forno para a coluna (CTO-10A) e um dosador automático (SIL-10A) foram usados para as análises.

Materiais: o padrão analítico de ácido ferúlico foi adquirido da Sigma/Aldrich, enquanto que o padrão de ácido 5-5' di-ferúlico foi sintetizado e fornecido pelo pesquisador Dr. John Ralph da "US Dairy Forage Research Center, Madison – Wisconsin, USA".

Utilizou-se coluna tipo fase reversa (C18), Hewlett Packard, com 4,6 mm x 250 mm, 5 µm de diâmetro de poro, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, volume injetado da amostra de 50 µL, comprimento de onda (λ) igual a 300 nm. Nessas condições foi estabelecido o

cromatograma dos ácidos ferúlico e di-ferúlicos (5,5) com os tempos de retenção (t_R) de: 17,1 e 18,8 min, respectivamente.

As amostras foram ressuspensas em 300 μ L de MeOH 50% (MeOH:H₂O), colocadas em ultrassom por 5 min e filtradas utilizando-se seringa descartável de 5 mL, acoplada na sua extremidade com filtro Millipore de 13mm de diâmetro, com poro de membrana de 0,45 μ m e injetadas no HPLC através do amostrador automático.

Resultados e Discussão

As condições analíticas empregadas para análise por HPLC dos padrões dos ácidos ferúlico e 5-5'-di-ferúlico e das amostras de folhas de milho foram: fase móvel em gradiente (Tabela 1) linear de metanol (0-100%) em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 4,0 (ajustado com ácido acético).

Tabela 1. Gradiente utilizado na bomba B

Tempo (min)	Metanol (%)
0,01	0
15,00	60
40,00	80
60,00	100
70,00	100
71,00	0
71,01	Stop

Os ácidos foram identificados por comparação do tempo de retenção dos ácidos em solução padrão com o tempo de retenção dos ácidos nas amostras.

A Figura 1 corresponde à confirmação da detecção dos ácidos padrões ferúlico e 5,5'-diferúlico com os respectivos tempos de retenção. A Figura 2 mostra a confirmação da detecção dos ácidos padrões ferúlico e 5,5'-diferúlico e de ambos em uma das amostras analisadas.

As Figuras 3 e 4 evidenciam a complexidade do cromatograma da amostra. Na Figura 3, atenuação 8, menos sensível, aparece apenas o ácido ferúlico. Por outro lado, na Figura 4 com atenuação 2, mais sensível, já se evidencia o ácido 5,5'-di-ferúlico.

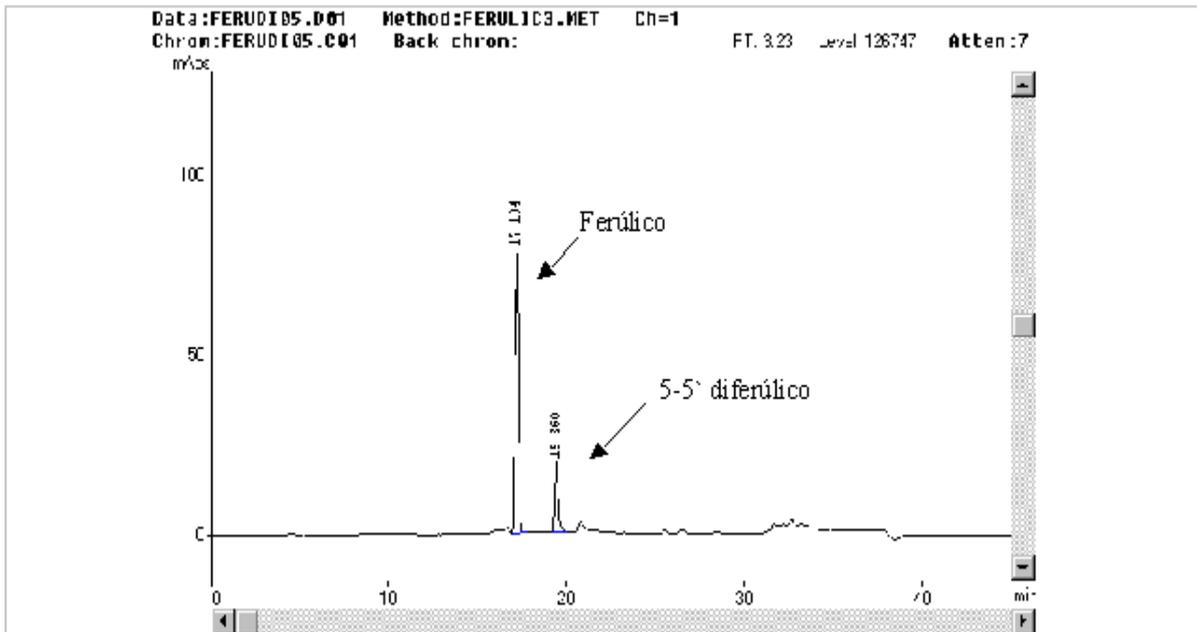


Figura 1. Cromatograma de HPLC mostrando os picos apresentados pelos padrões de ácido ferúlico e 5-5`diferúlico liberados da coluna com o tempo de retenção de aproximadamente 17 e 19 minutos, respectivamente.

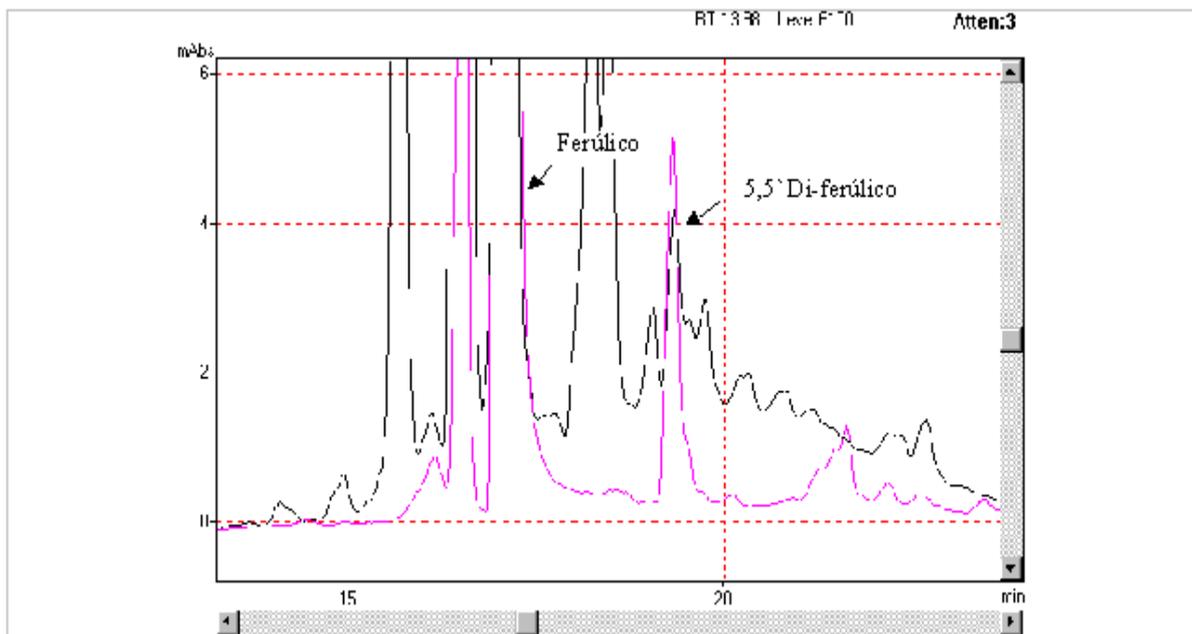


Figura 2. Cromatograma de HPLC mostrando os picos apresentados pelos padrões (em rosa) dos ácidos ferúlico e 5-5` - di-ferúlico e os respectivos picos (em preto) apresentados por uma das amostras.

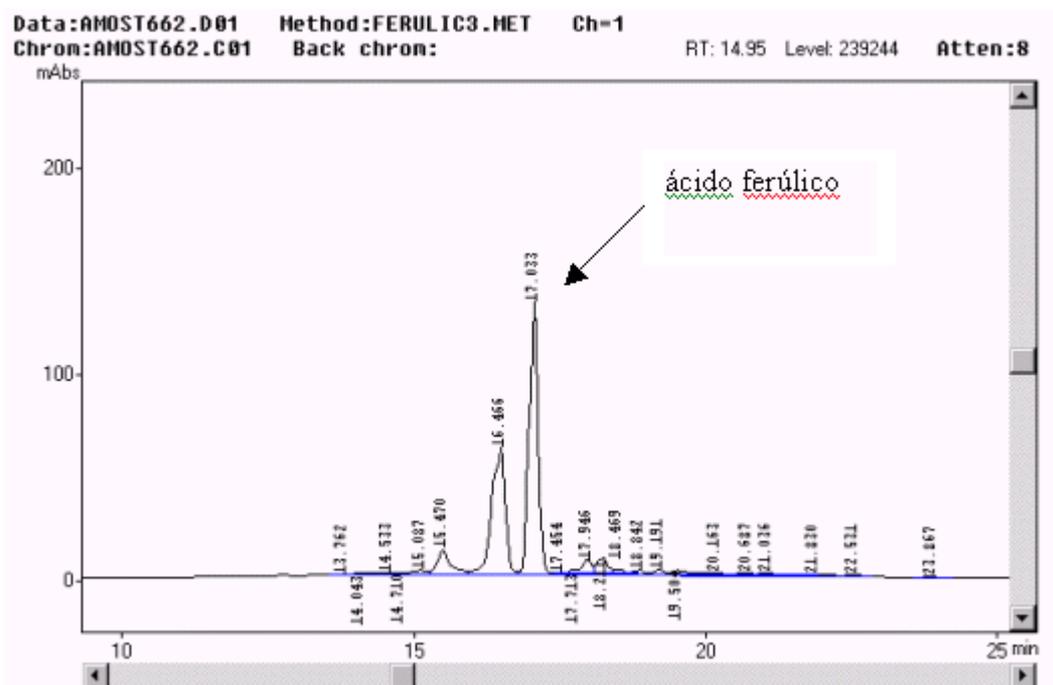


Figura 3. Cromatograma de amostra em atenuação 8 ,menos sensível, evidenciando apenas o ferúlico.

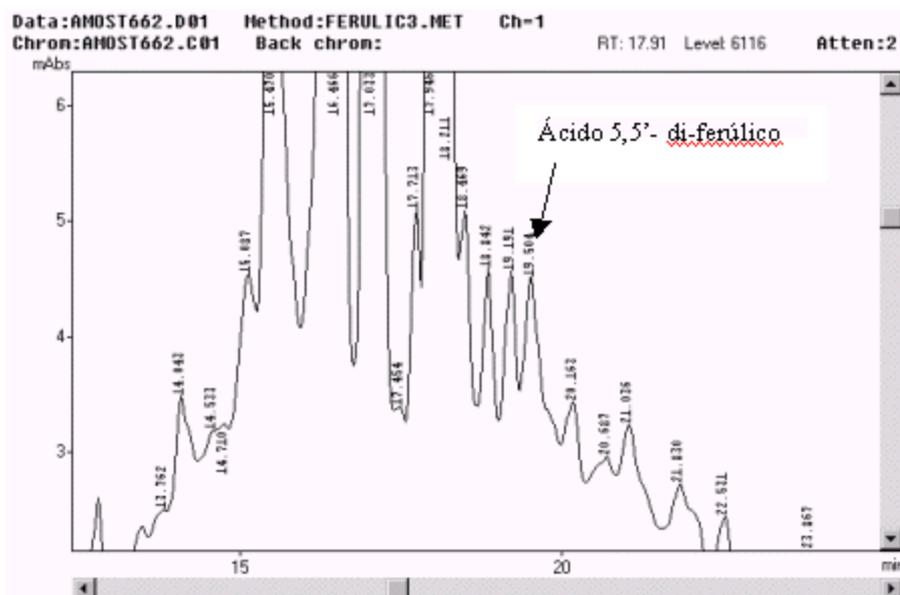


Figura 4. Cromatograma de amostra em atenuação 2, mais sensível, evidenciando a presença do ácido 5,5'- di-ferúlico.

Literatura Citada

BARTOLOME, B.; FAULDS, C.B.; KROON, P.A.; WALDRON, K.; GILBERT, H.J.; HAZLEWOOD, G.; WILLIAMSON, G. Na aspergillus niger esterase (ferulic acid esterase III) and a recombinant Pseudomonas fluorescens subsp. Cellulosa esterase (xyld) release a

5-5`ferulic dehydrodimer (diferulic acid) from barley and wheat cell walls. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.208-212, 1997

Bergvinson, D.J.; Arnason, J.T.; hamilton, r. i. phytochemical Changes during selection for resistance to the european corner borer. **Crop Science**, Madison, v.37, p.1567-1572, 1997

KAMISAKA, s.; Takeda, S.; Takahashi, K.; Shibata K. Diferulic and ferulic acid in the cell wall of avena coleoptiles - their relationships to mechanical properties of the cell wall. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.78, p.1-7, 1990

MARKWALDER, H.; NEUKOM, H. Diferulic acid as possible crosslink in hemicellulose from wheat germ. **Phytochemistry**, Elmsford, v.15, p.836-837, 1976

SHIBUYA, N. Phenolic acids and their carbohydrate esters in rice endosperm cell walls. **Phytochemistry**, Elmsford, v.23, p.2233-2237, 1984

XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC
