

Ajuste de Metodologia de Extração de Parede Celular e de Liberação de Ácidos Fenólicos para Quantificação por HPLC

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

Isabel R. P. Souza¹, Hélio T. Prates¹, Marcus J. C. Lopes², Nadja M. Pires³, Frederico O. Naves⁴, Cristiane Teixeira⁴

¹Embrapa Milho e Sorgo, CP. 151, Sete Lagoas, MG, e-mail: isabel@cnpms.embrapa.br ; ² Bolsista Convênio Embrapa/Unicentro Isabella Hendrix, ³ Bolsa Recém-doutor CNPq, ⁴BAP Fapemig

Palavras-chave: milho, parede celular, ácido ferúlico, ácido 5,5`-diferúlico, HPLC

Fonte Financiadora: Fapemig Processo CAG 885/97, Prodetab N. 162-01/98

Introdução

Ácido ferúlico e alguns outros ácidos fenólicos tem sido encontrado como componentes de parede celular de várias monocotiledôneas (Harris e Hartley, 1976; Shibuya, 1984) e também de algumas dicotiledôneas (Fry, 1976). Ácido ferúlico é esterificado a polissacarídeos da parede celular de gramíneas, onde sofre reação de ligação catalisada pela peroxidase e produz ácido diferúlico (Figura 1), o qual entrelaça as cadeias polissacarídeas (Fry, 1979). Esta reação tem sido sugerida como responsável pelo decréscimo na extensibilidade da parede celular. De fato, um aumento no conteúdo de ácidos diferúlicos em parede celular de coleóptilo de aveia (Kamisaka et al., 1990) e de arroz (Tan et al., 1991) correlacionou com o decréscimo na extensibilidade da parede celular. Numerosos exemplos de ácidos fenólicos tem sido relatados como fungistáticos, fitoalexínicos, fitohormonais, bacteriostáticos e como agentes alelopáticos (Brown, 1981). Devido a importância de se determinar o conteúdo de ácidos fenólicos em milho, um processo de extração destes ácidos foi ajustado, possibilitando a preparação de maior número de amostras e permitindo prover melhores quantidades. Para isto, as metodologias descritas por Tan et al. (1991), por Ishii e Nishijima (1995), por Ikegawa et al. (1996) e por Warldron et al (1996) foram ajustadas e serviram como referência.

Material e Métodos

Utilizaram-se tecido foliar de milho nos estádios de plântula e de folha adulta para a o ajuste das metodologias de extração de parede celular e liberação dos ácidos ferulico e diferúlico. As metodologias descritas, nas referências mencionadas acima, foram ajustadas para que os procedimentos pudessem ser realizados empregando-se tubinhos de capacidade de 2 mL. Desta forma, permitindo o preparo de um maior número de amostras em nível laboratorial.

Resultados e Discussão

Foram ajustadas as metodologias de extração de parede celular e liberação de ácidos fenólicos éster ligados a esta parede, para posterior quantificação dos mesmos através de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC - "High Performance Liquid Chromatography"). Estas metodologias foram testadas e otimizadas utilizando-se tecido foliar de planta jovem e adulta de milho. Para facilitar a extração de grande número de amostras em laboratório, ajustou-se o procedimento para tubinhos de capacidade de 2 ml.

Foram gerados os seguintes protocolos:

1 - Extração de Parede Celular de Folha de milho

É imprescindível a utilização de capela no desenvolvimento destes protocolos, uma vez que envolve a manipulação de acetona, clorofórmio e metanol.

Pesar 300 mg de folha, peso fresco, de cada amostra

- 1) Macerar as amostras de plantas em N₂ líquido até a obtenção de um pó fino.
- 2) Colocar este macerado em tubinho transparente, capacidade de 2 ml.
- 3) Adicionar 1,0 ml de tampão fosfato 50 mM, pH 7,0
- 4) Homogeneizar utilizando-se o vortex
- 5) Centrifugar por 5 min a 14.000 rpm
- 6) Remover e descartar o sobrenadante. Nesta etapa deve-se tomar o cuidado de não estar descartando precipitado junto com sobrenadante
- 7) Extrair novamente o precipitado com o mesmo tampão fosfato, para isto, repita as etapas de número 3 a 6, por 4 vezes
- 8) Lavar o precipitado com acetona 99%, utilize quantidade suficiente para preencher o volume do tubinho de 2 ml
- 9) Homogeneizar utilizando-se o Vortex
- 10) Centrifugar por 5 min a 14.000 rpm
- 11) Remover e descartar o sobrenadante. Nesta etapa deve-se tomar o cuidado de não estar descartando precipitado junto com o sobrenadante. Repetir as etapas de número 8 a 11, por aproximadamente 9 vezes. O que indica o final desta etapa é a obtenção de um precipitado de coloração clara e um sobrenadante (acetona) claro
- 12) Adicionar ao precipitado uma mistura de clorofórmio e metanol (2:1). Utilizar volume desta solução, suficiente para preencher a capacidade de 2 ml do tubinho.
- 13) Homogeneizar utilizando-se o vortex
- 14) Centrifugar por 5 min a 14.000 rpm
- 15) Repetir as etapas de número 12 a 14 por duas vezes
- 16) Adicionar acetona ao precipitado. Utilizar volume de acetona, suficiente para preencher a capacidade de 2 ml do tubinho.
- 17) Homogeneizar utilizando-se o vortex
- 18) Centrifugar por 5 min a 14.000 rpm
- 19) Retirar e descartar o sobrenadante, entretanto, não retirar em excesso para não haver perda de precipitado.
- 20) Dispor os tubinhos (contendo os precipitados) abertos em suporte e envolva este conjunto, folgadoamente em papel alumínio, deixando a lateral semi-aberta. Desta forma os precipitados secarão ao ar e na ausência de luz. Tempo suficiente para secagem completa do precipitado é de aproximadamente 1 dia.
- 21) Os tubinhos contendo a parede celular devem estar protegidos da luz para evitar degradação de componentes fotosensíveis.

2 - Liberação dos Ácidos Ferúlico e Diferúlico da Parede Celular para posterior quantificação em HPLC

- 1) Pesar 15 mg de parede celular. Colocar esses 15 mg de parede celular em um novo tubinho de 2 ml
- 2) Adicionar 1,5 ml de NaOH 0,1M (para cada 1 mg de parede celular usar 0,1ml de NaOH) às amostras e deixar por 24 horas protegidas da luz.
- 3) Ajustar o pH destas amostras para 3, empregando-se HCl 5,3 N. Normalmente, para este protocolo, são necessários 29 µL de HCl 5,3N (considerando-se 1,5 ml de NaOH na amostra). Neste caso, tanto para folhas jovens quanto adultas, 29 µL de HCl 5,3N

- foram suficientes para ajustar o pH para 3.
- 4) Homogeneizar utilizando-se o Vortex
 - 5) Centrifugar por 5 min a 14.000 rpm.
 - 6) Retirar e reservar o sobrenadante, pois nesta etapa os ácidos fenólicos liberados estão na fração NaOH.
 - 7) Pegar um volume fixo de 500 µl deste sobrenadante e colocá-lo em tubinho, capacidade de 2 mL, e tratá-lo com 1,5 ml de acetato de etila (a quantidade de acetato de etila deve ser 3 x o volume utilizado da fração de NaOH)
 - 8) Passar no vortex por 2 vezes.
 - 9) Retirar 1 mL da fração acetato de etila, fase superior, e coloca-lá em tubinho, capacidade de 2 mL.
Cuidado nesta etapa, pois após a adição do acetato de etila à fração de NaOH, tem-se a separação em duas fases, sendo a superior a do acetato de etila, aonde agora estão os ácidos de interesse.
 - 10) Dispor os tubinhos (contendo a fração acetato de etila) abertos em suporte e envolva este conjunto, folgadoamente em papel alumínio, deixando sempre a lateral semi-aberta. Desta forma, o acetato de etila volatilizará, restando nos tubinhos os ácidos liberados da parede celular. Para este volume de acetato de etila, 1 ml, o tempo para volatilização completa é de aproximadamente 2 dias, entretanto, depende das condições de temperatura e umidade local.
 - 11) Os tubinhos contendo os ácidos liberados da parede celular, devem ser fechados e protegidos da luz para evitar fotodegradação de compostos fenólicos. Observação importante; como a metodologia foi otimizada e ajustada para ser realizada utilizando-se tubinhos de capacidade de 2 ml, e uma amostra inicial de tecido foliar, somente de 300 mg, dificilmente será visível nos tubinhos os resíduos dos ácidos, por isto, não inverta os tubinhos para evitar perda de amostra.
 - 12) Nesta etapa as amostras podem ser armazenadas à temperatura ambiente, desde que protegidas da luz.
 - 13) Quando da análise em HPLC, as amostras devem ser resuspendidas em 300 µl de metanol 50% (MeOH:H₂O).

Os ácidos ferúlico e diferúlico, extraídos de tecido foliar de milho, empregando-se estes protocolos ajustados e descritos acima, foram posteriormente quantificados por meio de análise em HPLC (Figura 2).

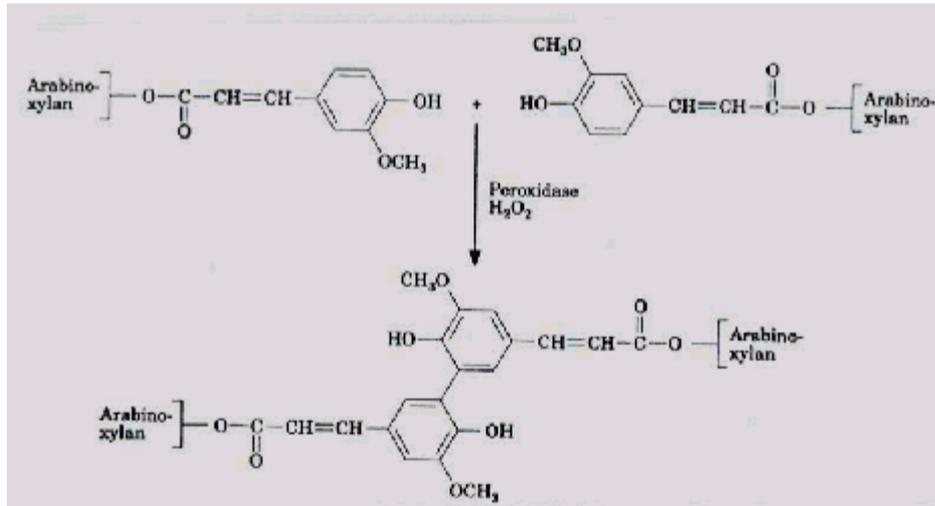


Figura 1. Ácido ferúlico ligado à matriz polissacarídea, sendo oxidado em reação catalisada pela peroxidase, formando o ácido diferúlico.

Fonte: Ikegawa et al., 1996

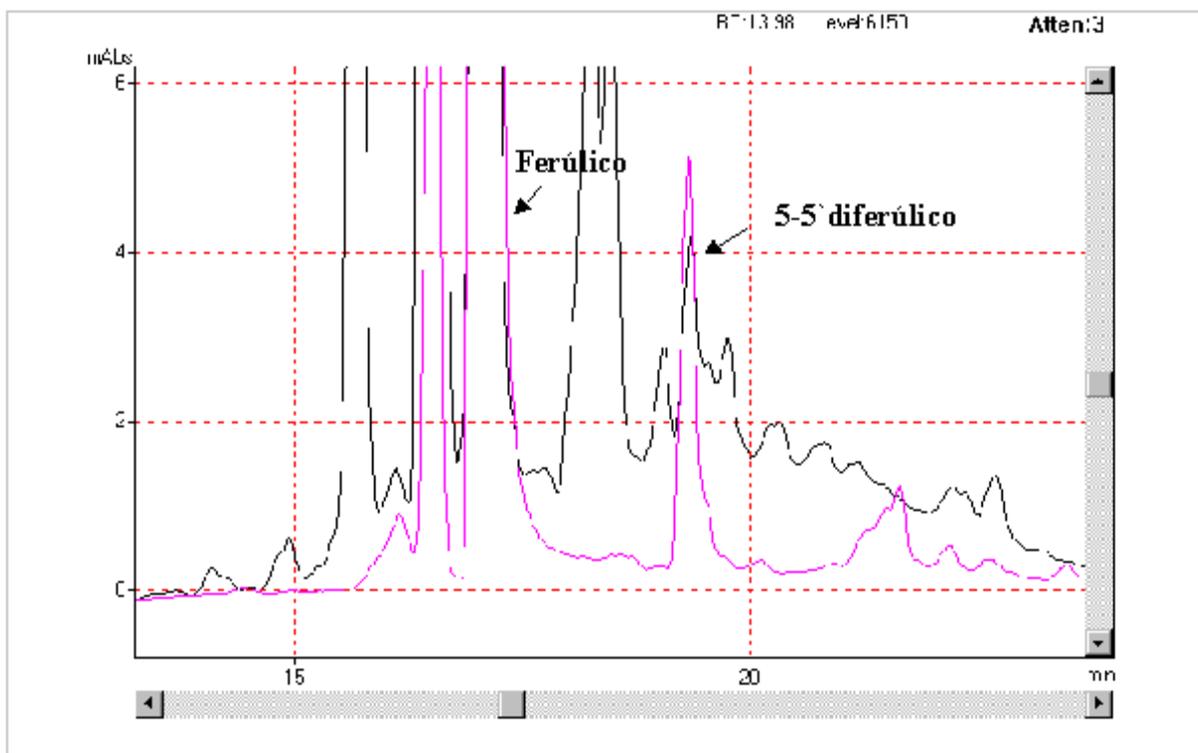


Figura 2. Cromatograma de HPLC mostrando os picos apresentados pelos padrões (em rosa) dos ácidos ferúlico e 5-5' diferúlico e os respectivos picos (em preto) apresentados por uma das amostras.

Literatura Citada

- BROWN, S. Coumarins. *In: In the Biochemistry of Plants*, Vol.7, Secondary Plant Products, Conn, E.E.(eds)pp. 269-300. Academic Press, New York.
- FRY, S.C. Phenolic components of the primary cell wall and their possible role in the hormonal regulation of growth. **Planta** 146: 343-351, 1979
- HARRIS, P.J.; HARTLEY, R. D. Detection of bound ferulic acid in the cell walls of the Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy. **Nature** 259: 508-510, 1976
- HARTLEY, R.D.; FORD, C.W. *In: Plant Cell Wall Polymers, Biogenesis and Biodegradation*, eds. N. G. Lewis and M. G. Paice , American Chemical Society, Washington, 1989, pp. 147-145, 1989
- IKEGAWA, T.; MAYAMA, S.; NAKAYASHIKI, H.; KATO, H. Accumulation of diferulic acid during the hypersensitive response of oat leaves to *Puccinia coronata* f. sp. *Avenae* and its role in the resistance o oat tissues to cell wall degrading enzymes. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 48: 245-255, 1996
- KAMISAKA, S.; TAKAEDA, S.; TAKAHASHI, K.; SHIBATA, K.; Diferulic and ferulic acids in the cell wall of *Avena* coleptiles – their relationships to mechanical properties of the cell wall . **Physiol Plant**, **78**: 1-7, 1990
- SHIBUYA, N. Phenolic acids and their carbohydrate esters in rice endosperm cell walls. **Phytochemistry**, **23**: 2333-2237, 1984
- TAN, K.S.; HOSOS, T.; MASUDA, Y.; KAMISAKA, D. Correlation between cell wall extensibility and the content of diferulic acid and ferulic acid in cells walls of *Oryza sativa* coleoptiles grown under water and in air. **Physiol Plant** 83: 397-403, 1991