

Determinação de Ácidos Orgânicos em Exsudatos de Raízes de Milho Pela Técnica de HPLC

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

Leonardo José Motta Campos², Hélio Teixeira Prates³, Gilson Vilhaça Exel Pitta³, Cristina Generosa de Senna Queiroz⁴, Robert Eugene Schaffert³ e Vera Maria Carvalho Alves³

¹Projeto parcialmente financiado com apoio da Comissão Europeia; ²Doutorando em Biologia Vegetal pela UFMG/Bolsista Comissão Europeia; ³Embrapa Milho e Sorgo, CP. 151, 35701-970, Sete Lagoas/MG; ⁴Universidade Federal de Minas Gerais, CEP 31270-901, Belo Horizonte/MG. E-mail: leojmc@yahoo.com.br

Palavras-chave: Alumínio, exsudação, CLAE, *Zea mays*

Introdução

O Al^{+3} é considerado um dos principais elementos limitantes da produção vegetal em solos ácidos. O pH baixo favorece a atividade do íon Al^{+3} , considerado a principal forma tóxica do Al^{+3} no solo (Ryan et al., 2001). No Brasil, estima-se que 68% dos solos possuem pH ácido, o que contribui para a elevação dos níveis de Al^{+3} tóxico no solo (Bahia-Filho et al., 1997). O principal sintoma apresentado pelas plantas expostas ao Al^{+3} é a restrição do crescimento do sistema radicular, sendo o ápice da raiz o sítio primário da ação do Al^{+3} , onde o Al^{+3} pode interferir na divisão celular associando-se com ácidos nucleicos (Rout et al., 2001).

Os mecanismos de tolerância ao Al^{+3} podem ser classificados em basicamente dois tipos: exclusão e tolerância interna (Kochian, 1995). Os mecanismos de exclusão impedem o Al^{+3} de penetrar no simplasto e aqueles relacionados com a tolerância interna imobilizam, compartimentalizam ou diminuem a atividade do Al^{+3} na célula. A exsudação de ácidos orgânicos por células de ápice de raiz pode atuar nas duas classes de mecanismos, pois estes ácidos possuem grupos carboxílicos que se ligam ao Al^{+3} , no simplasto ou no apoplasto (quando exsudados), reduzindo sua toxidez (Barceló et al., 1996). Exsudação de ácidos cítrico e málico foi observada em plantas de milho expostas ao Al^{+3} , podendo estar associada a tolerância da planta a este elemento (Ryan et al., 2001; Alves et al., 2000; Delhaise et al., 1993).

A técnica de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ou CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), tem sido utilizada para a determinação destes ácidos em exsudatos de raízes (Jianbo et al. 1998, 1999a). No entanto, para otimizar a obtenção de resultados com esta técnica, em exsudatos de raízes de milho, são necessários ajustes metodológicos, sendo este o objetivo deste trabalho. Assim, esta metodologia poderá constituir-se como uma ferramenta eficiente para a compreensão de mecanismos tolerância ao Al^{+3} em milho.

Material e Métodos

Para a determinação de ácidos orgânicos, foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta resolução, marca Shimadzu LC-10A, equipado com duas bombas reguladoras de fluxo (LC-10AD), um desgaseificador (DGU-4A), um detetor ultravioleta

(SPD-10A), um forno para a coluna (CTO-10A) e um dosador automático (SIL-10A).

A solução padrão do conjunto dos ácidos orgânicos foi obtida de soluções estoque (100 mg.L⁻¹, pH 2,5) dos seguintes ácidos orgânicos: málico, cítrico, succínico, *t*-aconítico. Os reagentes utilizados foram da marca Sigma (St. Louis, MO, USA). A concentração final da mistura dos padrões foi de 10 mg.L⁻¹ para os ácidos cítrico, málico, oxálico, succínico e láctico, 1 mg.L⁻¹ para os ácidos maleico e *t*-aconítico. Os ácidos foram identificados por comparação do tempo de retenção dos ácidos orgânicos em solução padrão com o tempo de retenção dos ácidos nas amostras. Os ácidos orgânicos da solução padrão foram separados em coluna GROM-SIL, fase reversa, C-18, partícula 5µm, dimensão 250x4 mm, usando como fase móvel uma solução de 18 mmol.L⁻¹ KH₂PO₄ com o pH ajustado em 2,15 com H₃PO₄. Os ácidos foram detectados por detetor UV Shimadzu (modelo SPD10A), regulado em comprimento de onda (λ) de 215 nm. A área dos picos e o tempo de retenção foram determinados por meio do programa Shimadzu Class 10-A.

Após os ajustes iniciais para a determinação dos ácidos orgânicos com a técnica de HPLC, foram realizadas avaliações de amostras de exsudatos de raízes de plantas de milho, submetidas a tratamento com Al₃. Sementes de milho de duas linhagens com tolerância diferencial ao Al₃, L3 tolerantes ao Al₃, e L53 sensível, após desinfecção com hipoclorito de sódio, foram colocadas para germinar em papel de filtro umedecido com água destilada. Depois de 3 dias, as plântulas foram transferidas para bandejas contendo solução nutritiva (Clark modificada por Magnavaca, 1982), pH 4,0 constantemente arejadas, onde permaneciam por 24 horas para adaptação. Após este período, a solução nutritiva foi trocada e foram aplicados os tratamentos de 0 µM e 222 µM de Al₃. As bandejas permaneceram em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 12h, a 28°C/20°C de temperatura diurna e noturna, com umidade relativa de 80%.

A coleta do exsudato radicular foi realizada 24 horas após o início do tratamento com Al₃. As raízes foram lavadas por três vezes com água 18Ω e em seguida colocadas em 9 L da mesma água, com arejamento por 30 min. Após este período, as plantas foram colocadas entre duas camadas de papel de filtro umedecido, cobrindo toda a raiz, exceto nos espaços onde foram colocados discos de papel de cromatografia (Watmam com 3 mm de diâmetro), lavados com água 18Ω por 15 minutos, visando a coleta dos exsudados. Os discos foram colocados no ápice das raízes (1-3 mm). Após 2 horas os discos foram retirados, colocados em frascos contendo 300 µL de água 18Ω, e agitados por 20 segundos. Em seguida foi feita a centrifugação (14000 rpm por 15 min.), transferindo-se uma alíquota para outro frasco e congelando-a em nitrogênio líquido para posterior análise no HPLC.

Resultados e Discussão

Para o ajuste metodológico de análise no HPLC, foram trabalhados o fluxo da fase móvel (Figura 1), a temperatura da coluna (Tabela 1), o comprimento de onda utilizado e a absorção do UV pelos ácidos orgânicos (Tabela 2).

Primeiramente, foram realizadas leituras com alteração do fluxo da fase móvel (0,3, 0,4 e 0,5 ml.min⁻¹). Observou-se a diminuição do tempo de retenção com o aumento do fluxo (Figura 1), semelhante a resultados obtidos por Jianbo et al. (1999a). O

fluxo de 0,4 mL.min⁻¹ proporcionou melhor resolução do cromatograma (Figura 1A) e os tempos de retenção dos ácidos foram semelhantes, mas não iguais, aos obtidos por Jianbo et al. (1999a). Estes autores trabalharam testando diferentes fluxos na coluna, porém com diferente temperatura (37 °C), pH (2,10) e coluna (ODS-C18), o que justifica as diferenças dos tempos de retenção (Jianbo et al., 1998; Jianbo et al., 1999a). Testando-se duas temperaturas da coluna (35 °C e 40 °C), verificou-se que a diminuição da temperatura aumentou o tempo de retenção e diminuiu a absorção do UV pelos ácidos (somente o ácido succínico aumentou sua absorção no UV), diminuindo, conseqüentemente, a altura dos picos (Tabela 1). Estes resultados concordam com aqueles verificados por Jianbo et al. (1999a).

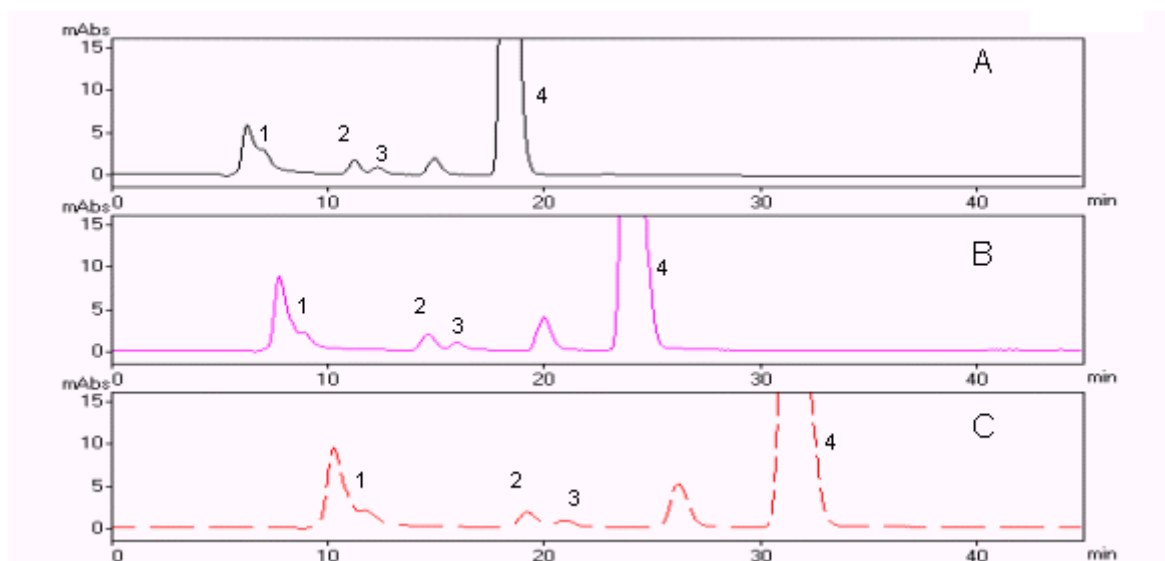


Figura 1- Cromatograma de padrões de ácidos orgânicos (1-málico, 2-cítrico, 3-succínico, 4-t-aconítico) com diferentes fluxos, 0,3 mL.L⁻¹ (A), 0,4 mL.L⁻¹ (B) e 0,5 mL.L⁻¹ (C), temperatura da coluna fixada em 40 °C e o comprimento de onda (λ) em 215 nm.

Tabela 1. Tempo de retenção e absorção ultra-violeta de quatro ácidos orgânicos em função de duas diferentes temperaturas da coluna (35 ° e 40 °C), no HPLC. Embrapa Milho e Sorgo 2002.

Ácidos Orgânicos	Temperatura da Coluna			
	35°C		40°C	
	Tempo de Retenção (min.)	Absorção UV (mAbs)	Tempo de Retenção (min.)	Absorção UV (mAbs)
Málico	9,05	1601	8,80	2163
Cítrico	15,81	1732	14,60	1855
Succínico	16,84	930	15,93	898
t-Aconítico	26,87	514	24,01	4036

Segundo Jianbo et al. (1998) os melhores picos de absorção observados no UV situam-se entre 200 e 220 nm, elegendo 214 nm como o comprimento ideal. Entretanto, trabalhando com três comprimentos de onda (214, 215 e 216 nm) (Tabela 2), verificou-se que o comprimento ideal para as condições destas análises foi de 215 nm, onde os ácidos apresentaram maior absorção no UV e melhor resolução dos picos no cromatograma.

Após a realização de análises com a mistura dos padrões dos ácidos orgânicos, foi

feita a leitura das amostras obtidas em exsudatos de plantas, com o fluxo de 0,4 mL.L⁻¹, comprimento de onda de 215 nm e temperatura da coluna de 40 °C (Figura 2), que mostraram-se mais adequados à realização das análises. As amostras nestas condições, mostraram os picos dos ácidos observados com boa resolução, com exceção do ácido málico, que ficou próximo do primeiro pico, provocado por uma interferência do nitrato, originado da solução nutritiva usada (Figura 2A e 2B). Esta proximidade pode interferir na determinação do ácido málico. Uma das alternativas para a diminuição deste problema seria o uso de resina trocadora de íons na amostra, o que de acordo com Jianbo et al. (1999b), poderia solucionar este problema. Outra maneira de diminuir a interferência do nitrato, seria o aumento do número de lavagens da raiz dentro da meia hora antes da coleta dos ácidos orgânicos, visando a retirada do nitrato do espaço livre aparente da raiz. Observando o cromatograma do exsudato coletado do ápice de raiz da linhagem L3 (tolerante ao Al³⁺), na presença e na ausência de Al³⁺, verifica-se que existe diferença entre a altura dos picos de ácido cítrico no tratamento com e sem Al³⁺ (Figura 2A). Na linhagem L53, suscetível ao Al³⁺, não foi observada diferença significativa nos picos do ácido cítrico coletado nos ápices das raízes analisadas (Figura 2B). Foi verificado ainda, uma pequena diminuição no picos do ácido málico (Figura 2B). Estes resultados mostram a eficiência da técnica utilizada, onde a determinação de alterações na exsudação dos ácidos orgânicos, pode ser verificada pelo comportamento dos picos do cromatograma.

Alguns trabalhos mostraram a quelatação do Al³⁺ pelos ácidos orgânicos, formando compostos de menor toxidez, como um dos fatores responsáveis pela tolerância ao Al³⁺ (Delhaise et al., 1993; Pellet et al., 1995). Alves et al. (2000), trabalhando com algumas linhagens de milho, entre elas L3 e L53, também verificaram resultados semelhantes aos das amostras, sugerindo a exsudação de ácidos orgânicos (principalmente ácido cítrico) como um possível mecanismo de tolerância ao Al³⁺, presente na linhagem L3. Ryan et al. (2001), verificaram que no milho, o principal ácido orgânico exsudado, relacionado a tolerância ao Al³⁺, foi o ácido cítrico.

Tabela 2. Absorção ultra-violeta (mAbs) de quatro ácidos orgânicos em função de três diferentes comprimentos de onda (214, 215 e 216 nm), utilizados no HPLC. A temperatura da coluna foi fixada em 40 °C e o fluxo da fase móvel em 0,4 mL.L⁻¹. Embrapa Milho e Sorgo 2002.

Ácidos Orgânicos	Comprimento de onda (λ)		
	214 nm	215 nm	216 nm
Málico	1930	2163	1742
Cítrico	1835	1855	1670
Succínico	865	898	691
<i>t</i> -Aconítico	5378	4036	5269

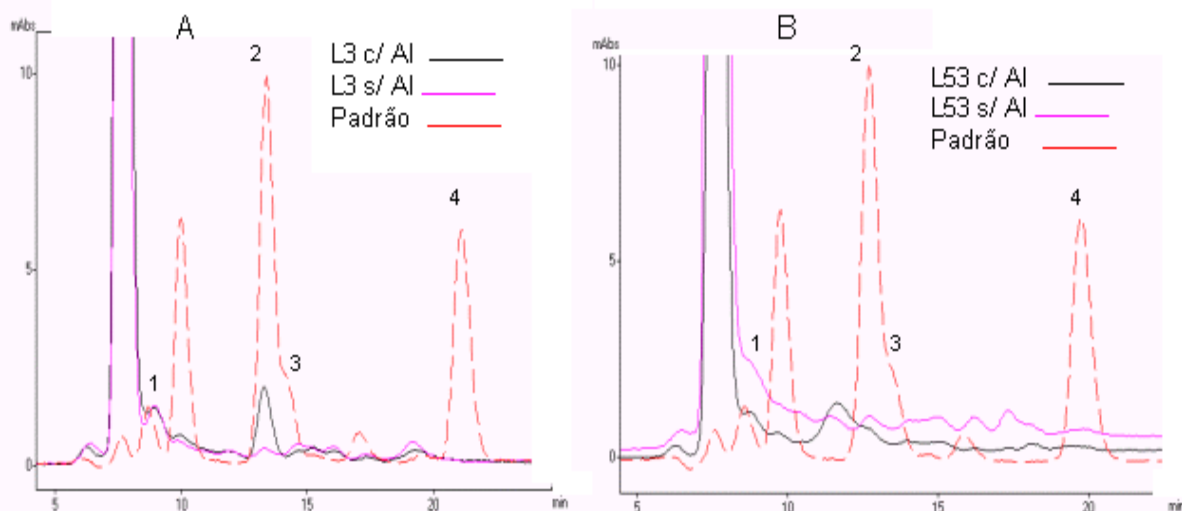


Figura 2. Cromatograma de exsudados de ápice de raízes de milho das linhagens L3 (A) e L53 (B), coletados após 24 horas em solução com e sem Al^{+3} , e analisados no HPLC para a identificação de ácidos orgânicos (1- málico, 2- cítrico, 3- succínico, 4- *t*-aconítico).

As amostras apresentaram um pico (provocado provavelmente por alguma substância interferente) entre 28 e 30 minutos. Portanto, o tempo total da análise foi de 40 minutos, pois foi fixado um tempo de 10 minutos (para limpeza da coluna) entre o último pico observado e o início da leitura de outra amostra. Porém, há possibilidade deste tempo ser diminuído, bastando-se observar, em outras amostras, se a linha de base do cromatograma permanece constante após 10 minutos do último pico. Esta diminuição contribuirá para o aumento da eficiência das análises. Assim, o uso do HPLC na determinação de ácidos orgânicos em exsudatos de raiz, constitui-se numa ferramenta eficiente, desde que adaptações da metodologia sejam realizadas. Além disso a técnica mostrou-se adequada a verificação de exsudação de ácidos orgânicos em partes específicas da raiz (ápices, pêlos radiculares), o que contribuirá para elucidação dos mecanismos de tolerância ao Al^{+3} em milho, associados a exsudação de ácidos orgânicos.

Bibliografia

- ALVES, V.M.C.; MAGALHÃES, J.V.; SHAFF, J.E., PIÑEROS, M.A.; PURCINO, A.A.C.; PARENTONI, S.N.; PITTA, G.V.E.; PRATES, H.T.; SCHAFFERT, R.E.; KOCHIAN, L.V. Exsudação de ácidos orgânicos como mecanismo de tolerância a alumínio em milho. **Anais do XXIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, p. , 2000.
- BAHIA FILHO, A.F.C.; MAGNAVACA, R.; SCHAFFERT, R.E.; ALVES, V.M.C. Identification, utilization and economic impact of maize tolerant to low levels of phosphorus

- and toxic levels of exchangeable aluminum in Brazilian soils. In: MONIZ, A.C.; FURLANI, A.M.C; SCHAFFERT, R.E.; FAGERIA, N.K.; ROSOLEM, C.A.; CANTARELLA, H. (eds), **Plant-soils interactions at low pH: Sustainable agriculture and forestry production**. Campinas/Viçosa: Brazilian Soil Science Society, 1997. p. 59-72.
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C.H.; VAZQUEZ, M.D.; GUNSE, B. Aluminium Phytotoxicity: A challenger for plant scientists. **Fertilizer Research**, v. 43, p. 217-223, 1996.
- DELHAISE, E.; RYAN, P.R.; RANDALL, P.J. Aluminum tolerance in wheat. II. Aluminum-stimulate excretion of malic acid from root apices. **Plant Physiol.**, n. 103, p. 695-702, 1993.
- JIANBO, S.; ZHANG, F.; DARU M. Determination of organic acid in root exudates by high liquid performance chromatography: development and assessment of chromatographic conditions. **Pedosphere**, v. 8, n. 2, p. 97-104, 1998.
- JIANBO, S.; ZHANG, F.; DARU M. Determination of organic acid in root exudates by high liquid performance chromatography: influence of several testing conditions. **Pedosphere**, v. 9, n. 1, p. 45-52, 1999a.
- JIANBO, S.; ZHANG, F.; DARU, M. Determination of organic acid in root exudates by high liquid performance chromatography: effects of interfering factors. **Pedosphere**, v. 9, n. 2, p. 97-104, 1999b.
- KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminium toxicity and resistance in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.**, v. 46, p. 237-260, 1995.
- PELLET, D.M.; GRUNES, D.L.; KOCHIAN, L.V. Organic acid exudation as an aluminium tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). **Planta**, n. 196, p. 103-110, 1995.
- PIÑEROS, L.A.; KOCHIAN, L.V. A patch-clamp study of the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of Al³⁺-induced anion channels. **Plant Physiol.**, v. 125, p. 292-305, 2001.
- ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. Aluminium toxicity in plants: a review. **Agronomie**, v. 21, p. 3-21, 2001.
- RYAN, P.R.; DELHAISE, E.; JONES, D.L. Function and Mechanism of Organic Anion Exudation from Plant Roots. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 52, p. 527-560, 2001.