

## TEORES DE FENÓLICOS EM RAIZ DE MILHO SOB TOXIDEZ DE ALUMÍNIO

RUY RAPOSEIRAS<sup>1</sup>, ISABEL REGINA PRAZERES DE SOUZA<sup>2</sup>, VERA MARIA CARVALHO ALVES<sup>2</sup>, HÉLIO TEIXEIRA PRATES<sup>2</sup>, PAULO CÉSAR MAGALHÃES<sup>2</sup>, ROBERT EUGENE SCHAFFTER<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Biólogo, MSc., Bolsista de projeto financiado pela McKnight Foundation, Embrapa Milho e Sorgo;*

<sup>2</sup>*Pesquisador(a), Embrapa Milho e Sorgo. Caixa Postal 151, CEP: 35701-970 Sete Lagoas, MG. E-mail: isabel@cnpms.embrapa.br (autor para correspondência)*

*Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.4, n.3, p.374-380, 2005*

**RESUMO** - Os mecanismos de tolerância ao Al propostos na literatura podem ser classificados em mecanismos de exclusão e mecanismos de tolerância interna. Os mecanismos de exclusão previnem o Al de atravessar a membrana plasmática e penetrar no simplasto. Os mecanismos de tolerância interna imobilizam, compartimentalizam ou detoxificam o Al que penetrou no simplasto. Tem sido sugerido que compostos fenólicos atuam em ambos os mecanismos, devido à sua capacidade de complexar metais como o alumínio e também por agirem como um forte antioxidante em resposta a estresses abióticos. O objetivo deste trabalho foi identificar diferenças no teor de ácidos fenólicos solúveis totais e de ácidos fenólicos (ácido ferúlico, 5-5' diferúlico e *para*-cumárico), ligados à parede celular de raízes de milho entre linhagens contrastantes quanto à tolerância ao alumínio, Cateto 237 (tolerante) e L53 (sensível), quando expostos à toxidez desse elemento. As plântulas foram cultivadas em solução nutritiva completa, na ausência (período de 0 h) e na presença de Al ( $AlK(SO_4)_2$ ), na atividade de 39  $\mu M$  (períodos de 12, 24, 48 e 72 h). Fenólicos solúveis totais foram analisados pelo método Azul da Prússia, enquanto os fenólicos liberados da parede celular foram analisados através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Os resultados obtidos sugerem que os fenólicos possam ter participação nos mecanismos de tolerância ao alumínio em milho, considerando-se que a linhagem Cateto 237-tolerante foi capaz de manter a concentração de fenólicos solúveis totais e aumentou as concentrações dos ácidos *p*-cumárico, ferúlico e 5-5' diferúlico, na parede celular, sob toxidez de Al.

**Palavras-chave:** *Zea mays* L., parede celular, ácido ferúlico, 5-5' diferúlico, *p*-cumárico, fenólicos solúveis totais.

## PHENOLICS CONTENTS IN MAIZE ROOTS UNDER ALUMINUM TOXICITY

**ABSTRACT** - Aluminum (Al) tolerance mechanisms proposed in the literature can be classified as exclusion and internal tolerance mechanisms. Exclusion mechanisms prevent the Al from crossing the plasma membrane and penetrating the simplast. Internal tolerance mechanisms immobilize, compartmentalize or detoxify Al that penetrates the simplast. It has been suggested that phenolic compounds act in both mechanisms, due to its capacity to chelate metals as Al and to act as a strong antioxidant in response to abiotic stresses. The objective of this work was to identify differences in the content of total soluble phenolics and phenolic acids (ferulic acid, 5-5' diferulic and *para*-cumaric), bounded to the cell wall of maize roots between inbred lines contrasting in their tolerance to Al, Cateto 237 (tolerant) and L53 (sensitive), when exposed to Al toxicity. Seedlings were

cultivated in nutrient solution in the absence (0 h period) and presence of Al ( $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ ) 39  $\mu\text{M}$  activity (12, 24, 48 and 72 h period). Total soluble phenolics were analyzed by the Prussian Blue method, and phenolic acids bounded to cell wall were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Results obtained suggested that phenolics may participate in Al tolerance mechanisms, considering that the tolerant inbred line Cateto 237 was capable of maintaining total soluble phenolics concentration, and increased the concentration of ferulic, 5-5'-diferulic and *p*-cumáric acids under Al toxicity.

**Key words:** *Zea mays* L., cell wall, ferulic acid, 5-5'-diferulic acid, *p*-cumáric acid, total soluble phenolics

O Brasil encontra-se entre os três primeiros produtores mundiais de milho, com uma produção de 47 milhões de toneladas, na safra de 2002/2003 (CONAB, 2004). A maior parte dessa produção concentra-se nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste, correspondendo a 93% do total produzido no país (IBGE, 2002). Nas décadas de 80 e 90, a produtividade agrícola, principalmente de milho e soja, sofreu um forte impulso, com a incorporação da fronteira agrícola nas áreas dos Cerrados. Essa região representa 20% do território nacional (Lopes, 1987), estando a maior parte dela localizada na área central. Atualmente, apenas 12 milhões de ha são agricultáveis e destes, 3,5 milhões são cultivados com o milho. No entanto, essa porcentagem é considerada baixa, pois cerca de 112 milhões de ha são adequados para a prática da agricultura auto-sustentável (Gama *et al.*, 1996).

Os solos dos Cerrados geralmente apresentam elevada acidez, toxidez de alumínio (Al), baixa capacidade de suprimentos de N, Ca e Mg, além de elevada capacidade de retenção do fósforo (P), em formas pouco acessíveis à planta (Novais & Smith, 1999), limitando o seu crescimento e, conseqüentemente, reduzindo a produtividade. Portanto, nesse tipo de solo, com pH ácido, o alumínio está presente em formas tóxicas, prejudicando a planta como um todo (Kochian, 1995). Estudos recentes têm demonstrado que o sítio primário de indução da inibição

do crescimento das plantas causada pelo alumínio está localizado no ápice radicular. Também tem sido observado que diversos tipos de fenólicos, como os flavonóides, possuem forte capacidade para ligarem-se a íons alumínio, mesmo sob condições de acidez (Tam & Mc Coll, 1990) e que sua exsudação pelo ápice das raízes pode realmente representar parte de um mecanismo de tolerância a esse elemento (Al.). Wagatsuma *et al.* (2001) observaram uma melhora no crescimento de plantas em meio contendo Al, em pH 4,8, quando diferentes compostos fenólicos foram adicionados ao meio. Kidd *et al.* (2001), trabalhando com um genótipo de milho tolerante ao alumínio, observaram que a exsudação de catechol e flavonóides (catequina e quercetina) aumentou com a concentração externa de alumínio, demonstrando que esses compostos podem estar envolvidos no processo de tolerância ao alumínio. Os ácidos fenólicos têm sido encontrados como componentes da parede celular de várias monocotiledôneas (Harris & Harley, 1976; Shibuya, 1984) e também em algumas dicotiledôneas (Fry, 1989). Esses compostos são classificados como metabólitos secundários e estão amplamente distribuídos nas plantas (Rao, 1990). Podem ocorrer na forma livre, como ésteres (Riberan-Gayon, 1972; Krygier *et al.*, 1982; Sosulski *et al.*, 1982), ou como formas insolúveis, ligados aos carboidratos da parede celular. A acumulação de fenólicos durante a for-

mação da parede celular leva a uma diminuição da extensibilidade e ao aumento da rigidez mecânica (Kamisaka *et al.*, 1990; Tan *et al.*, 1991, 1992), podendo estar relacionado com a inibição do crescimento das plantas. Esses dados sugerem a importância de se caracterizar os ácidos fenólicos exsudados pelo ápice de raízes de milho, podendo representar num mecanismo de defesa contra a toxidez ao alumínio.

Este trabalho teve como objetivo verificar, em linhagens contrastantes quanto à tolerância ao Al, o teor de ácidos fenólicos solúveis totais e de ácidos fenólicos ligados à parede celular de raízes de milho, quando expostos à toxidez desse elemento.

#### Material e Métodos

Para a realização do experimento, foram utilizadas duas linhagens de milho provenientes do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG, previamente caracterizadas quanto à tolerância ao Al: Cateto 237 - tolerante e L53 - sensível (Alves *et al.*, 2001).

As sementes foram desinfetadas por 10 min, em hipoclorito de sódio a 0,5%, imediatamente lavadas em água destilada e colocadas para germinar em papel de germinação umedecido. Quatro dias após a germinação, as plântulas foram selecionadas e transplantadas para bandejas contendo solução nutritiva completa (Magnavaca, 1982), pH 4,2, sob aeração constante, onde permaneceram por 24 h. Após esse período, as plântulas foram expostas à mesma solução nutritiva completa, na ausência (período de 0 h) e na presença de Al ( $AlK(SO_4)_2$ ), na atividade de 39  $\mu M$  (período de 12, 24, 48 e 72 h). A experimentação foi conduzida em câmara de crescimento, com temperatura diurna de 27 °C e noturna de 20 °C, luminosidade de 540  $mmol\ m^{-2}\ s^{-1}$ , umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 12 h. Após

exposição aos tratamentos, o primeiro centímetro do ápice da raiz seminal de cada plântula foi coletado, lavado em água destilada, acondicionado em papel alumínio, imerso em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C, para posteriores análises.

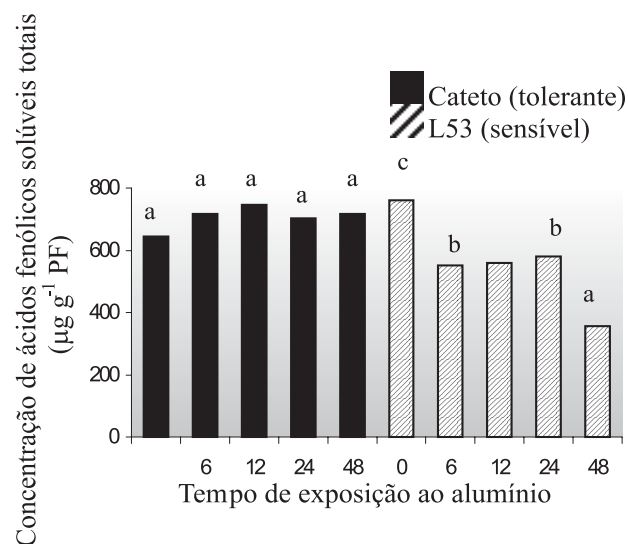
O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições, composto por duas linhagens, uma dose de Al e cinco períodos de exposição ao Al.

Para a extração e a quantificação dos ácidos fenólicos da parede celular, foram utilizados 150 mg de ápices por tratamento e por repetição, de acordo com o protocolo descrito por Souza *et al.* (2002). Toda a parede celular obtida foi utilizada no processo para liberação dos ácidos, os quais foram ressuspensos em 300  $\mu L$  de metanol (50%). A quantificação dos ácidos ferúlico, 5-5'-diferúlico e cumárico foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC), de acordo com o protocolo descrito por Prates *et al.* (2002), tendo como padrões os ácidos ferúlico e o cumárico (Sigma-Aldrich Química, St. Louie, MO, EUA), disponíveis comercialmente, e o 5-5'-diferúlico, gentilmente fornecido pelo Dr. John Ralph, do Departamento de Floresta da Universidade de Wisconsin-Madison, EUA.

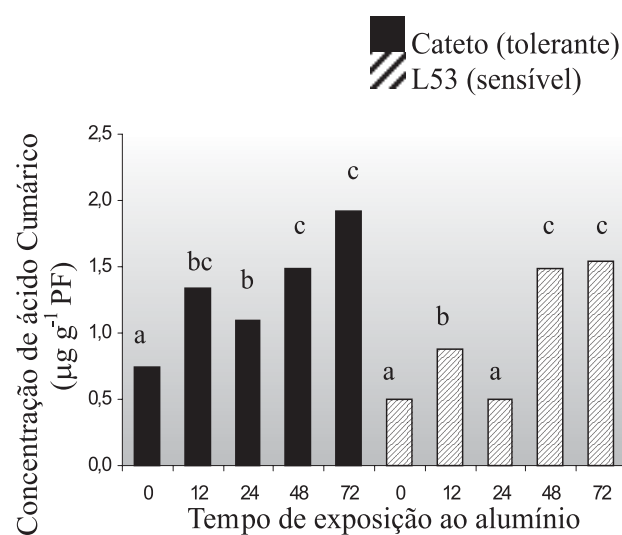
Para o estudo dos fenólicos solúveis totais, utilizou-se a metodologia empregada na determinação de tanino em grãos de sorgo, através do método Azul da Prússia, como descrito por Magalhães *et al.* (1997), com algumas modificações. Nas análises, foram utilizados 150 mg de ápices de raiz fresca por tratamento e repetição. As raízes foram maceradas em nitrogênio líquido, adicionando-se 1 mL de HCL 1% em metanol. As leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro a  $A_{720}$  nm. Para a construção da curva padrão, utilizou-se uma solução de 3 mg de ácido ferúlico comercial, dissolvido em 10 mL de HCL 1% em metanol.

### Resultados e Discussão

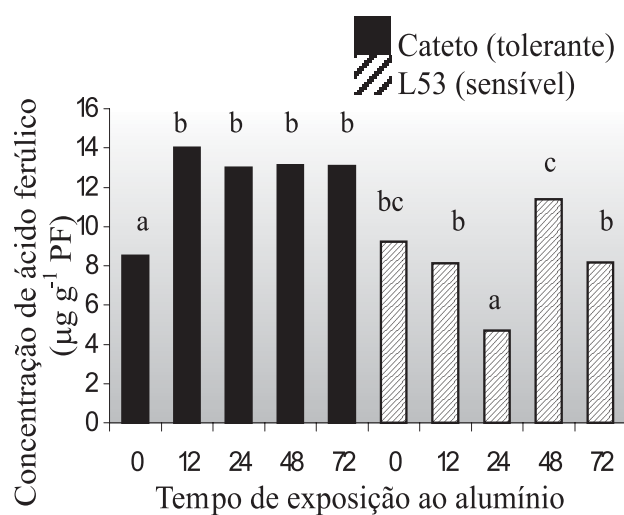
Pela análise de variância, observou-se que a interação linhagem e tempo de exposição ao alumínio foi significativa a 1% para fenólicos totais, ácidos ferúlico e 5-5' diferúlico e significativa a 5%, para o ácido cumárico. Desdobrando-se a interação significativa, tempo dentro de cada linhagem, verificou-se variações nas concentrações desses ácidos ao longo do tempo de exposição ao alumínio para Cateto 237 (tolerante) e L53 (sensível), exceção feita para a concentração de fenólicos solúveis totais nas raízes da linhagem Cateto 237, cujo nível não apresentou variações, mantendo-se aproximadamente constante nos diferentes tempos de exposição ao alumínio (Figura 1). A linhagem L53, ao contrário, apresentou decréscimo significativo na concentração de fenólicos solúveis totais com o aumento do tempo de exposição ao alumínio. Compostos fenólicos têm várias funções importantes e estão amplamente distribuídos por toda a planta. Alguns deles têm sido descritos como capazes de se ligarem a íons Al, mesmo sob condições de acidez (Tam & McColl, 1990). Wagatsuma *et al.* (2001) observaram uma melhora no crescimento de plantas em meio contendo Al em pH 4,8, quando diferentes compostos fenólicos foram adicionados ao meio. Ofei-Manu *et al.* (2001) verificaram correlação positiva e significativa entre tolerância ao Al e compostos fenólicos de raízes em algumas espécies arbóreas. Na linhagem Cateto 237, as concentrações dos ácidos cumárico, ferúlico e 5-5' diferúlico aumentaram em presença de Al, mantendo-se praticamente constantes durante o tempo de exposição (12 a 72 h) (Figuras 2, 3 e 4). No decorrer do período experimental, a linhagem L53 apresentou decréscimo na concentração do ácido 5-5' diferúlico (Figura 4), enquanto que, para os ácidos ferúlico (Figura 3) e cumárico (Figura 2), após haver redução nas concentrações



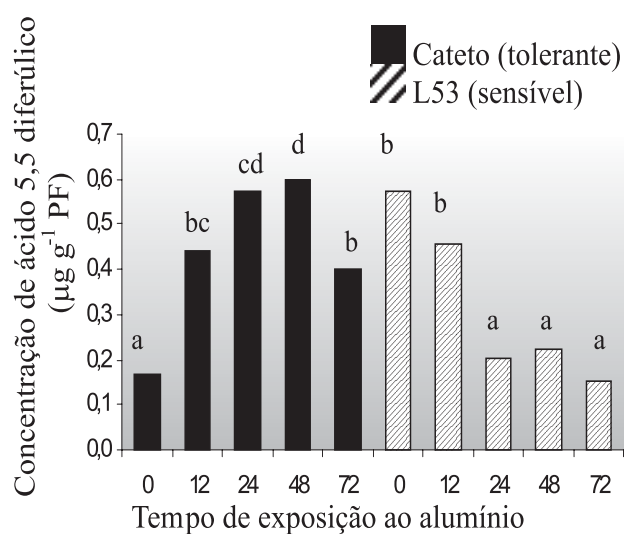
**FIGURA 1.** Concentração de fenólicos solúveis totais em raízes de linhagens de milho, Cateto 237 (tolerante) e L53 (sensível), submetidas a diferentes períodos de exposição, a 39 mM de alumínio. Para um mesmo genótipo, letras iguais acima da barra não diferem entre si, pelo teste de Student, a 5%.



**FIGURA 2.** Concentração de ácido cumárico em raízes de linhagens de milho, Cateto 237 (tolerante) e L53 (sensível), submetidas a diferentes períodos de exposição, a 39 mM de alumínio. Para um mesmo genótipo, letras iguais acima da barra não diferem entre si, pelo teste de Student, a 5%.



**FIGURA 3.** Concentração de ácido ferúlico em raízes de linhagens de milho, Cateto 237 (tolerante) e L53 (sensível), submetidas a diferentes períodos de exposição, a 39 mM de alumínio. Para um mesmo genótipo, letras iguais acima da barra não diferem entre si, pelo teste de Student, a 5%.



**FIGURA 4.** Concentração de ácido 5,5-diferúlico em raízes de linhagens de milho, Cateto 237 (tolerante) e L53 (sensível), submetidas a diferentes períodos de exposição, a 39 mM de alumínio. Para um mesmo genótipo, letras iguais acima da barra não diferem entre si, pelo teste de Student, a 5%.

até 24 h de exposição ao Al, as mesmas voltaram a aumentar. Os resultados observados na linhagem L53 podem estar relacionados a um espessamento da raiz, em função da paralisação do crescimento radicular. Linhagens sensíveis de milho sob toxidez de Al (dados não mostrados) apresentaram redução no comprimento da raiz seminal, após 24 h de exposição a esse elemento. Sugere-se que, concomitantemente à paralisação do crescimento radicular na linhagem sensível, o aumento na concentração dos ácidos ferúlicos e *p*-cumárico, a partir de 48 h sob toxidez de Al, seria um efeito secundário, em que esses ácidos estariam participando da lignificação, a qual é considerada como fator responsável pela rigidez mecânica da parede celular (Fry, 1979). El-Basyouni & Towers (1964) relatam que os ácidos ferúlicos são precursores da biossíntese de lignina. Em gramíneas, ácidos ferúlico e *p*-cumárico são encontrados como componentes da hemicelulose e ligados à parte central da lignina na parede celular.

#### Conclusão

Os resultados obtidos sugerem que os fenólicos possam ter participação nos mecanismos de tolerância ao alumínio em milho, considerando-se que a linhagem tolerante Cateto 237, sob toxidez de Al, foi capaz de manter a concentração de fenólicos solúveis totais e apresentou aumento nas concentrações dos ácidos *p*-cumárico, ferúlico e 5-5'-diferúlico da parede celular.

#### Literatura citada

ALVES, V. M. C.; MAGALHÃES, J. V.; SHAFF, J. E.; PIÑEROS, M. A.; PURCINO, A. C.; PARENTONI, S. N.; PITTA, G. V. E.; PRATES, H. T.; SCHAFFERT, R. E.; KOCHIAN, L. V. Exsudação de ácidos orgânicos como mecanis-

- mo de tolerância a alumínio em milho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 8., 2001, Ilhéus. **Caderno de resumos...** Ilhéus: SBFV, 2001. p. 163.
- CONAB. **Terceiro levantamento da safra agrícola 2003/2004**. Brasília, DF, Fevereiro 2004.
- EL-BASYOUNI, S.; TOWERS, G. H. N. The phenolic acids in wheat. Changes during growth and development. **Canadian Journal of Biochemistry**, Ottawa, v. 42, p. 203-210, 1964.
- FRY, S. C. Phenolic components of the primary cell wall and their possible role in the hormonal regulation of growth. **Planta**, Berlin, v. 145, p. 343-351, 1979.
- FRY, S. C., MILLER, J. G. Toward a working model of the growing plant cell-wall: Phenolic cross-linking reactions in the primary cell-walls of dicotyledons. In: LEWIS, N. G. I; PAICE, M. G. (Ed.) **Plant cell-wall polymers: biogenesis and biodegradation**. Washington, D. C: American Chemical Society, 1989. p. 33-46.
- GAMA, E. E.; LOPES, M. A; PARENTONI, S. N. et al. O programa de melhoramento de milho do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - CNPMS-EMBRAPA In: REUNIÓN DE COORDINADORES SULAMERICANOS DE PROGRAMAS DE MAÍZ, 4., 1996, Cali. **Memórias**, México: CIMMYT, 1996. p. 33-73.
- HARRIS, P. J.; HARTLEY, R. D. Detection of bound ferulic acid in the cell walls of the Gramineae by ultraviolet fluorescence microscopy. **Nature**, London v. 259, p. 508-510, 1976.
- IBGE. Sistema IBGE de recuperação automática - SIDRA. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 12 mar. 2002.
- KAMISAKA, 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.
- KIDD, P. S.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Does root exudation of phenolics play a role in aluminum resistance in maize (*Zea mays* L.). In: HORST, W. J.; SCHENR, M. K.; BURKERT, A. et al. **Plant Nutrition: Food security and sustainability of agro-ecosystems, through basic and applied research**. Dordrecht: Kluwer, 2001. p. 504-505.
- KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminium toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 237-260, 1995.
- KRIGIER, K.; SOSULSKI, F.; HOGGE, L. Free, esterified and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 30, p. 330-334, 1982.
- LOPES, M. A.; MAGNAVACA, R.; BAHIA-FILHO, A. F. C. et al. Avaliação de populações de milho e seus cruzamentos para tolerância à toxidez de alumínio em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 22, n. 3, p. 257-263, 1987.
- MAGALHÃES, P. C.; RODRIGUES, W. A.; DURÃES, F. O. M. **Tanino no grão de sorgo: bases fisiológicas e métodos de determinação**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1997. 26 p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 27).
- MAGNAVACA, R. **Genetic variability and the inheritance of aluminum tolerance in mayze**

- (*Zea mays* L.). 1982. 135 f. Thesis (PhD) – University of Nebraska, Lincoln.
- NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: UFV: DPS, 1999. 399 p.
- OFEI-MANU, P.; WAGATSUMA, T.; ISHIKAWA, S.; TAWARAYA, K. The plasma membrane strength of the root-tip cells and root phenolic compounds are correlated with Al tolerance in several common woody plants. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 47, p. 359-375, 2001.
- PRATES, H. T.; SOUZA, I. R. P.; PIRES, N. M.; LOPES, M. J. C.; NAVES, F. O.; TEIXEIRA, C. Quantificação dos ácidos ferúlico e 5-5' diferúlico de parede celular de milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 24., 2002, Florianópolis. **Meio ambiente e a nova agenda para o agronegócio de milho e sorgo**: resumos. Sete Lagoas: ABMS: Embrapa Milho e Sorgo: Epagri, 2002. p. 61.
- RAO, A. S. Root flavonoids. **Botanical Review**, Bronx, v. 56, p. 1-84, 1990.
- RIBERCAN-GAYON, P. **Plant phenolics**. Edinburgh: Oliver and Boyd, 1972. 254 p. (University Reviews of Botany, 3)
- SHIBUYA, N. Phenolic acids and their carbohydrate esters in rice endosperm cell walls. **Phytochemistry**, Elmsford, v. 23, p. 2333-2237, 1984.
- SOSULSKI, F.; KRIGIER, K.; HOGGE, L. Free, esterified and insoluble bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flour. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 30, p. 337-340, 1982.
- SOUZA, I. R. P.; PRATES, H. T.; LOPES, M. J. C.; PIRES, N. M.; NAVES, F. O.; TEIXEIRA, C. Ajuste de metodologia de extração de parede celular e de liberação de ácidos fenólicos para quantificação por HPLC. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 24., 2002, Florianópolis. **Meio ambiente e a nova agenda para o agronegócio de milho e sorgo**: [resumos expandidos]. Sete Lagoas: ABMS: Embrapa Milho e Sorgo: Epagri, 2002. CD-ROM. Seção trabalhos.
- TAM, S. C.; McColl, J. G. Aluminum and calcium-binding affinities of some organic ligands in acidic conditions. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 19, p. 514-520, 1990.
- TAN, K. S.; HOSON, T.; MASUDA, Y.; KAMISAKA, S. Correlation between cell wall extensibility and the amount of diferulic acid and ferulic acid in cell wall of *Oryza sativa* coleoptiles grown under air. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 83, p. 397-403, 1991.
- TAN, K. S.; HOSON, T.; MASUDA, Y.; KAMISAKA, S. Effect of ferulic and P-coumaric acids on *Oryza* coleoptile growth and the mechanical properties of cells walls. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 140, p. 460-465, 1992.
- WAGATSUMA, T., ISHIKAWA, S., AKIMOTO, T., TAWARAYA, K., and OFEI-MANU, P. Mechanisms of higher tolerance of Al stress in phosphorus-deficient maize seedling; the significance of phenolics in Al resistance. In: HORST, W. J.; SCHENR, M. K.; BURKERT, A. et al. **Plant Nutrition: Food security and sustainability of agro-ecosystems, through basic and applied research**. Dordrecht: Kluwer, 2001. p. 454-455.