

Desenvolvimento de Metodologias para a Análise por HPLC de Derivados Fenólicos Presentes em Cultivares de Milho Resistentes à Praga de Cartucho

Décio Karam,¹ Yuri Machado,² Alexandre A. Ferreira,² Paulo A. Sette de Abril,² Paulo E.A. Ribeiro,¹ Hélio T. Prates¹ e Jacqueline A. Takahashi²

¹ Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. Rod. MG 424 km 45 - Caixa Postal 285 - CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG (karam@cnpms.embrapa.br); ² Depto de Química, ICEX, UFMG, Av. Antonio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG (jat@qui.ufmg.br)

Palavras-chave: *Spodoptera frugiperda*, milho, CLAE, produtos naturais, rotina

A produção do milho apresenta destacada importância econômica por ser uma planta com boa produtividade, alta resistência e com ampla utilização sob forma *in natura* e industrializada na alimentação humana e animal. O aumento do consumo de carnes nos últimos anos, especialmente de frango, também colabora para um aumento do mercado do milho. Esta cultura possui ainda uma forte importância social por ser predominantemente realizada em pequenas propriedades e pelo seu uso na alimentação humana, de fundamental importância em regiões de baixa renda como o semi-árido do nordeste brasileiro.

A produção mundial de milho para 2006/07 é estimada em 682 milhões de toneladas, um valor próximo ao da demanda recorde global de 720 milhões. Somente a longo prazo e com melhora da tecnologia e o aumento da área plantada a produção mundial de grãos poderá atender à demanda crescente. Uma das razões que impulsiona a demanda é o rápido crescimento da produção de etanol a partir de grãos. Preços mais altos, no entanto, serão necessários a curto e médio prazo para compensar a defasagem entre produção e demanda.

O ataque das culturas de milho por diversos insetos causa severas perdas na produtividade e tem sido alvo de estudos no Brasil, que alcança a expressiva terceira maior produção mundial. Um dos maiores problemas para esta lavoura é a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), que pode levar a perdas significativas à produção, por adaptar-se facilmente a diferentes tipos de cultivo e hospedeiros, tornando difícil seu controle. A diversidade de populações de *S. frugiperda* é alta e pode inclusive estar associada à planta hospedeira (Busato e cols., 2004). O controle de pragas por meio de inseticidas sintéticos é amplamente utilizado, mas possui inconvenientes como a indução de resistência, a toxicidade dos inseticidas e os danos ecológicos e ambientais (Neri e cols, 2005; Badji e cols., 2004). Alternativas como o uso de bioinseticidas, produtos naturais e alterações genéticas nas plantas têm surgido, no intuito de superar os inconvenientes.

A presença de plantas naturalmente resistentes à *S. frugiperda* é uma indicação de que a resistência/susceptibilidade do cultivar a esta lagarta pode ser determinada pela diferença quali- ou quantitativa dos conteúdos de metabólitos secundários presentes nestes cultivares. Neste trabalho, os metabólitos secundários de cultivares resistentes estão sendo estudados em comparação a cultivares susceptíveis na tentativa de se descobrir as substâncias responsáveis por esta resistência natural.

Extratos de cultivares de milho com genótipos resistentes à lagarta-do-cartucho foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em sistema de gradiente e detector de arranjo de diodos. Nos extratos de cultivares resistentes foi detectada a presença de uma substância com tempo de retenção 28,25 cujo espectro de absorção na

região do ultravioleta mostrou-se condizente com o espectro da rutina. A relação entre a presença desta substância neste cultivar com a resistência do mesmo à lagarta será avaliada, podendo determinar novas possibilidades para o controle desta praga.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção dos extratos foram coletadas 10g de folhas de 25 genótipos de milho, sendo 13 resistentes e 12 susceptíveis à lagarta-do-cartucho. Este material foi triturado em um gral com pistilo contendo nitrogênio líquido e, em seguida, submetido a extração com metanol à 65°C sob agitação magnética, por 20 minutos. Após filtração, a solução obtida foi evaporada em um evaporador rotatório até a eliminação completa do solvente. Os extratos obtidos foram acondicionados sob refrigeração para posterior análise por CLAE.

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada em um cromatógrafo da marca Shimadzu, modelo LC-10A, dotado de detector Photo Diode Array (DAD), utilizando uma coluna de fase reversa (Shim-pack CLC-ODS). Os solventes utilizados foram H_3PO_4 0,02 mol.L⁻¹ (Fase A) e acetonitrila (Fase B). Foi aplicado um gradiente de eluição conforme apresentado a seguir: 0-5 minutos, de 85% A, 15 % B para 80% A e 20% B; 5-15 minutos, de 80% A, 20% B para 70% A e 30% B; 15-25 minutos, de 70% A e 30% B para 60% A e 40% B; 25-27 minutos, de 60% A e 40% B para 10% A e 90% B; mais 10 minutos 10% A e 90% B.

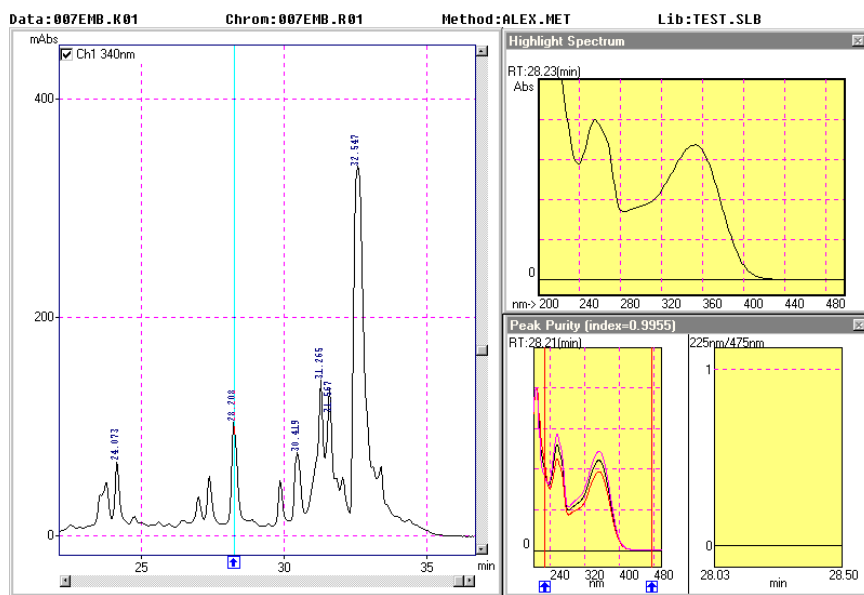
Uma alíquota de 20 µL da solução metanólica a 1,65% p/v do extrato foi injetada diretamente no aparelho. Em uma análise posterior, foi injetada rutina padrão (Merck) sob as mesmas condições de análise.

RESULTADOS

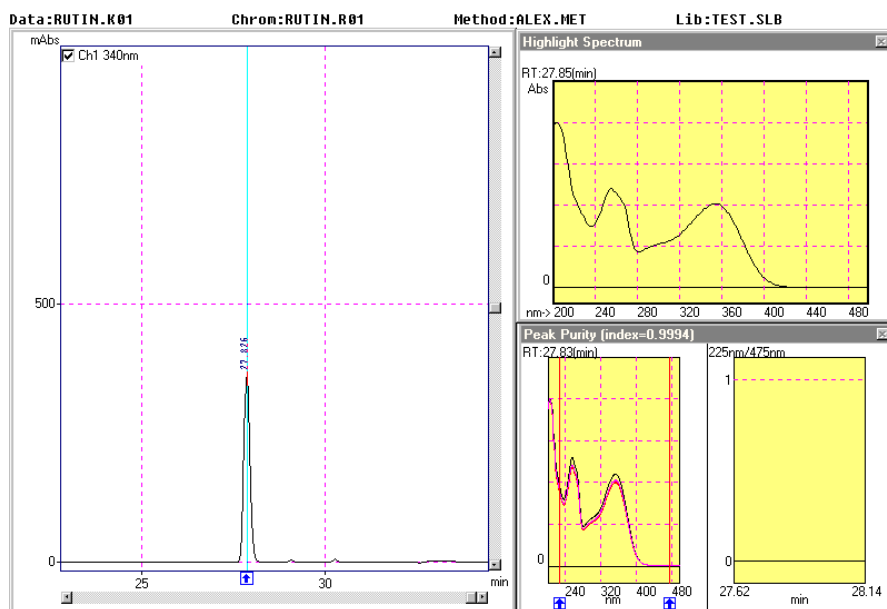
A seguir encontram-se os cromatogramas (340 nanômetros) e os respectivos espectros no ultravioleta referentes ao extrato estudado e ao flavonóide rutina, utilizado como padrão.

O pico selecionado no cromatograma 1, com tempo de retenção (tR) igual a 28,25 minutos e seu respectivo espectro de ultravioleta, apresentam-se condizentes com o tempo de retenção e o espectro da rutina (tR = 27,83 minutos). O pico apresentou pureza cromatográfica superior a 99,5%, como indicado pelo parâmetro *peak purity* do software de processamento, sugerindo que o mesmo refere-se a apenas uma substância. Outros picos do cromatograma do extrato apresentaram semelhança com o espectro no ultravioleta da rutina, indicando a possível presença de derivados desse flavonóide no extrato de milho. Além disso, o cromatograma 1 mostrou uma complexidade elevada, necessitando de um método como melhor resolução, que permitisse a análise das outras substâncias contidas no extrato.

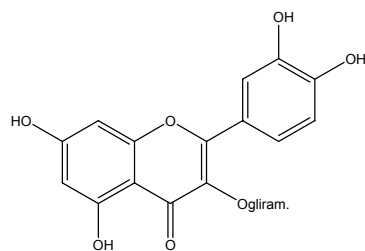
Um método otimizado está sendo desenvolvido para identificação e quantificação das demais substâncias do extrato juntamente com a rutina, na tentativa de verificar quais destas substâncias estão presentes nos genótipos resistentes e/ou susceptíveis, para a correlação substância-resistência à lagarta-do-cartucho.



Cromatograma 1 – Análise cromatográfica do extrato de milho por CLAE.



Cromatograma 2 - Análise cromatográfica da rutina padrão por CLAE.



Rutina

DISCUSSÃO

Produtos naturais, óleos vegetais e minerais, extratos de fungos têm sido avaliados para o controle de pragas em lavouras de milho. (Hazzard e cols., 2003). Por exemplo, o extrato bruto de *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia I* foi testado quanto ao seu efeito inibitório sobre larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda*, apresentando atividade tóxica sobre estas, o que resultou em uma taxa de mortalidade do inseto de até 80% (Figueroa Brito e cols., 2003). Naquele estudo, análise dos extratos ativos por cromatografia em camada delgada apontou a presença de substâncias com reação positiva ao reagente de Dragendorff, indicativo da presença de alcalóides ou outras substâncias nitrogenadas.

Substâncias fenólicas apresentam importantes funções na defesa contra microrganismos e insetos, podendo apresentar atividade antibiótica e/ou anti-alimentar. Substâncias fenólicas como a maisina e o ácido clorogênico tem apresentado atividade inseticida (Elliger e cols., 1980; Gueldner, 1996). Estes estudos revelaram que níveis de maisina superiores a >2% da massa seca do extrato geravam certa resistência da planta ao ataque da lagarta. Rutina, quercetina e genistina por sua vez parecem afetar o fisiologismo e o comportamento de larvas da lagarta da maçã [*Heliothis virescens* (Fabr.)], sendo que o evento citado ocorre em genótipos da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] que contem maiores concentrações das substâncias fenólicas. A fração isolada contendo essas substâncias, quando adicionada à dieta artificial das larvas, continua a afetá-las. A rutina e a quercetina aumentam a mortalidade de larvas da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis* Hubner), essa sendo a principal praga desfoliadora da soja. Estes estudos mostraram, também, relação concentração-atividade da quercetina, ácido clorogênico e rutina na mortalidade neonatal de larvas da lagarta militar do tabaco (*Spodoptera litura* F.)

A análise por CLAE de substâncias fenólicas é amplamente descrita (Snock e cols., 1989). Entretanto, a detecção e quantificação destas substâncias em extratos brutos de plantas, especialmente aqueles contendo altas concentrações de clorofila é particularmente difícil. No presente trabalho, o criterioso estudo de condições de CLAE realizado permitiu identificar a rutina como sendo uma das substâncias presentes em genótipos de milho resistentes à *S. frugiperda* e ausente nos genótipos sensíveis a esta praga, abrindo novos caminhos para a exploração de formas modernas para o controle desta praga.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BADJI, C.A.; GUEDES, R. N. C.; SILVA, A.A.; ARAUJO, R.A. (2004) Crop Protection Impact of deltamethrin on arthropods in maize under conventional and no-tillage cultivation **23**(11);1031-1039.

BRITO, R. F; HERRERA, J. M.; LAUZARDO, A. N. H.; Del VALLE, M. V (2003) Toxic and growth inhibitory effects of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* extracts on *Spodoptera frugiperda*: Revista Latinoamericana de Quimica **31**(1): 28-34.

BUSATO, G. R.; GRUETZMACHER, A D.; DE OLIVEIRA, Antonio C.; VIEIRA, E. A.; ZIMMER, P.D.; KOPP, M. M.; BANDEIRA, J. M; MAGALHAES, T. R. (2004) Analysis of the molecular structure and diversity of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)

(Lepidoptera:Noctuidae) populations associated to the corn and rice crops in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Neotropical Entomology* **33**(6): 709-716.

ELLIGER, C. A.; CHAN, B. G.; W., A. C., Jr.; LUNDIN, R. E.; HADDON, W. F. (1980) C-Glycosylflavones from *Zea mays* that inhibit insect development. *Phytochem.* **19**(2): 293-297.

GUELDNER, R. C.; SNOOK, M. E.; WIDSTROM, N. W.; WISEMAN, B.R (1992) TLC screen for maysin, chlorogenic acid, and other possible resistance factors to the fall armyworm and the corn earworm in *Zea mays*. *J. of Agricultural and Food Chemistry* **40**(7): 1211-1213.

HAZZARD, R. V.; SCHULTZ, B. B.; GRODEN, E.; NGOLLO, E. D.; SEIDLECKI, E. (2003) Evaluation of oils and microbial pathogens for control of lepidopteran pests of sweet corn in New England. *Journal of Economic Entomology* **96**(6): 1653-1661.

MALLIKARJUNA, N.; KRANTHI, K. R.; JADHAV, D. R.; KRANTHI, S.; CHANDRA, S. (2004) Influence of foliar chemical compounds on the development of *Spodoptera litura* (Fab.) in interspecific derivatives of groundnut. *Journal of Applied Entomology* **128**(5): 321-328

NERI, D. K. P.; MORAES, J. C.; GAVINO, M. A. (2005), Interaction of silicon with a growth regulating insecticide in the management of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) in corn plants. *Ciencia e Agrotecnologia* **29**(6): 1167-1174.

O ESTADO DE SÃO PAULO, Grupo Estado, disponível em <http://www.estadao.com.br/agronegocios/noticias/2006/jun/27/93.htm> acesso em 12 jun 2006

PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H.; OLIVEIRA, M. C. N. (2005) Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*? *J. Chem. Ecology* **31**(7): 1509-1525.

SNOOK, M. E.; WIDSTROM, N. W.; GUELDNER, R. C. (1989) Reversed-phase high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of maysin in corn silks. *J. Chrom.* **477**(2): 439-447.