

NOTA: MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISE DE ÁCIDO SALICÍLICO NOS FRUTOS E FOLHAS DE MORANGUEIRO (*Fragaria x Ananassa* DUCH.)

Chromatographic method for acid salicylic analysis of strawberry fruits and leaves (*Fragaria X Ananassa* Duch.)

Manuela Cristina Pessanha de Araujo Santiago^{1*}, Ronoel Luiz de Oliveira Godoy¹, Jeane Santos Rosa¹, Sidney Pacheco¹, Renata Galhardo Borguini¹, Luzimar da Silva de Mattos do Nascimento¹, Marcos José de Oliveira Fonseca¹, Rodrigo da Silveira Campos¹

¹Embrapa Agroindústria de Alimentos - Avenida das Américas, 29501, Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 23020-470, Brasil

*Autor correspondente. E-mail: manuela.santiago@embrapa.br

Palavras - chave: CLAE, morango, resistência sistêmica adquirida

Keywords: HPLC, strawberry, systemic acquired resistance

As plantas, assim como todos os outros seres vivos, sofrem estresses causados por agentes bióticos e abióticos. As infecções de tecidos vegetais por patógenos resultam em indução sistêmica de longo alcance e resistência a amplo espectro de doenças, fenômeno conhecido como resistência sistêmica adquirida (RSA).

A RSA é induzida pela infecção de folhas por patógenos, induzindo reações de hipersensibilidade (RH) a partir da sinalização de defesa para resistência gene- mediada, embora a RH não seja obrigatória para gerar o sinal de SAR a longa distância (VLOT *et al.*, 2008).

Entre os mecanismos de defesa vegetal pode ocorrer a síntese de proteínas de defesas, expressa por genes específicos, ativados através de mecanismos complexos (BUSAM *et al.*, 1997; PINHEIRO *et al.*, 1999). Tais proteínas exercem vários papéis na resistência e sobrevivência da planta, de forma direta (combatendo o agente agressor) ou indireta (mantendo a estrutura e as funções celulares) (CARVALHO *et al.*, 2007).

A aplicação exógena ou o estímulo à síntese endógena de ácidos orgânicos indutores de resistência sistêmica, como o ácido salicílico, pode agir como indutor de proteínas de tolerância aos diferentes estresses, bem como para elevar a atividade de enzimas de desintoxicação celular, especialmente as envolvidas na degradação de radicais ativos oxigenados (CARVALHO *et al.*, 2007).

O ácido salicílico é produzido no metabolismo secundário vegetal, sendo moderadamente solúvel em água e altamente solúvel em solventes polares orgânicos (RASKIN, 1992).

No caso específico do morangueiro (*Fragaria X Ananassa* Duch.), mesmo com o melhoramento genético das cultivares nos últimos anos, na busca de qualidade, produtividade e resistência, o mesmo ainda apresenta alta suscetibilidade a diversas doenças, sendo considerado um dos principais fatores limitantes ao seu cultivo (PAULUS, 1990; TANAKA & PASSOS, 2002). Este fato associado ao aumento na demanda da produção de alimentos mais saudáveis, isentos de resíduos de pesticidas, incentivam a utilização de substâncias alternativas como indutores de resistência em plantas às diversas espécies de fitopatógenos. Um exemplo de indutor é a quitosana, a qual incrementa a produção de ácido salicílico na planta (MAZARO, 2007) Alguns microrganismos também podem induzir a produção de ácido salicílico nas plantas (KUBOTA & NISHI, 1991).

A produção de ácido salicílico é importante para as plantas, uma vez que o tratamento de muitas espécies cultivadas com este ácido pode promover o decréscimo na produção e ação de etileno, ajudar na prevenção de estresses oxidativos, promover o decréscimo na taxa de respiração, entre outros benefícios (ASGHARI & AGHDAM, 2010).

Para avaliação do procedimento de indução da produção de ácido salicílico, torna-se necessário um método que utilize uma técnica segura e eficaz, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para se detectar a concentração do mesmo nos frutos e folhas de morangueiro. Os relatos encontrados na literatura quanto à determinação de ácido salicílico por CLAE, são para fármacos, como descrito por Aguiar *et al.* (2009) ou quando são para plantas referem-se a uma metodologia complexa e mais agressiva para o equipamento utilizado, uma vez que utiliza tampão, como descrito por Kubota *et al.* (2009). A separação de substâncias que se ionizam utilizando apenas CLAE de fase reversa é bastante complexa, necessitando de controle rígido de pH para que não haja equilíbrio entre as formas iônica e molecular de uma mesma substância (pH de trabalho igual ao pKa do analito) (ROSA *et al.*, 2007).

A fase estacionária de uma coluna de troca iônica H^+ é constituída por uma resina de estireno divinilbenzeno em forma de gel e relativamente rígida devido às ligações cruzadas existentes. O mecanismo de separação nesta coluna consiste basicamente de exclusão iônica e partição por fase reversa. A força ácida do eluente (H_2SO_4 0,05M) pode ser ajustada para melhorar a resolução do analito ou excluir interferentes. Desta forma, ácidos orgânicos, em geral, podem ser eluídos em ordem crescente de pKa (ROSA *et al.*, 2007).

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um método simples, prático e que proporcionasse menor desgaste do sistema cromatográfico devido à não utilização de tampão na fase móvel, visando à detecção de ácido salicílico nos frutos e folhas de morangueiro pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna de troca iônica H^+ .

A etapa de extração do ácido salicílico consistiu na pesagem de 1g das amostras trituradas para balão volumétrico de 25mL, seguida de extração com 10mL de H_2SO_4 0,05M e 7mL de acetonitrila durante 10 minutos em ultrassom. Após a extração, os balões foram avolumados com a solução de H_2SO_4 0,05M. As amostras foram, em seguida, filtradas em papel de filtro para *vials* do injetor automático do sistema cromatográfico.

Para o preparo do padrão pesou-se cerca de 1,5mg do padrão de ácido salicílico para balão volumétrico de 25mL, sendo adicionados 7mL de acetonitrila e em seguida avolumando-se o balão com solução de H_2SO_4 0,05M.

A precisão da etapa de extração foi avaliada quanto à repetibilidade, enquanto a eficiência foi determinada pela recuperação do ácido salicílico por meio das concentrações final (posterior à adição de ácido salicílico) e inicial (anterior à adição de ácido salicílico) de uma amostra de morango com ausência deste composto.

A análise cromatográfica foi realizada utilizando-se como base o método de vitamina C descrito por Rosa *et al.* (2007), com modificações. A análise foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters® Alliance modelo 2690/5, com detector de arranjo de fotodiodos Waters® modelo 2996, software Empower®, coluna BioRad Aminex® HPX87H 3,5 μ m (7,8 x 300mm) na temperatura de 30°C, fluxo de 0,7mL/min e 40 μ L de injeção. A fase móvel utilizada foi 80% de ácido sulfúrico 0,05M e 20% de acetonitrila sendo o modo de eluição do tipo isocrático.

A quantificação da concentração de ácido salicílico nas amostras analisadas foi realizada por padronização externa, tendo sido construída uma curva analítica.

O uso da acetonitrila para o preparo da solução padrão facilitou a solubilização do ácido salicílico. Esta característica também explica o uso deste solvente orgânico no preparo das amostras.

Para o teste de recuperação foi encontrado o valor de 85%, sendo este satisfatório para a análise, uma vez que são considerados aceitáveis valores deste parâmetro entre 70 e 120% (INMETRO, 2007).

Com as condições descritas, foi possível obter a separação do pico de interesse e com isso quantificar o ácido salicílico presente nas amostras de frutos e das folhas de morangueiro, através da comparação com o padrão analítico (Figuras 1 e 2).

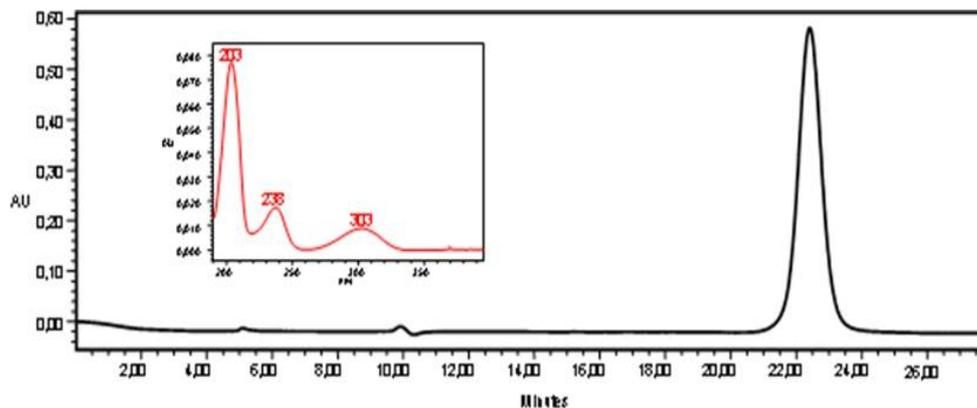


Figura 1. Cromatograma e espectro de UV do padrão de ácido salicílico.

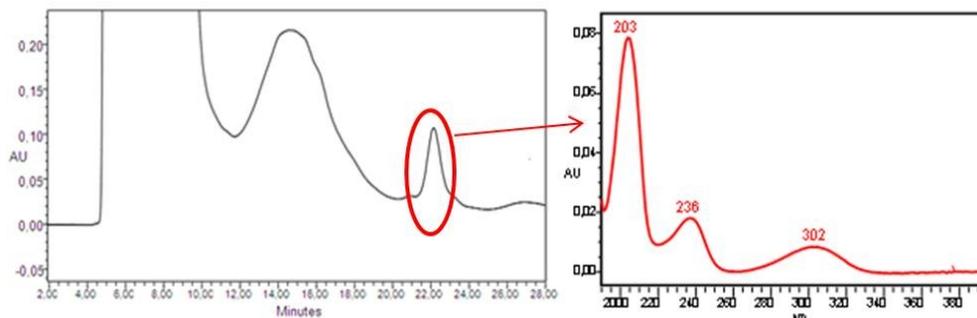


Figura 2. Cromatograma e espectro de UV da análise de ácido salicílico de amostra de folha de morangueiro.

Nas folhas analisadas foi possível detectar a presença do ácido salicílico. Na maioria das amostras de frutos analisadas não foi detectada a presença do ácido. Nas amostras de frutos em que o ácido salicílico foi detectado, o seu teor encontrado foi muito menor do que o obtido para as folhas (Tabela 1).

Tabela 1. Teor de ácido salicílico ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$) em folhas e frutos de morangueiro.

	Ácido salicílico ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$)
Folha - 1ª replicata de extração	7,88
Folha - 2ª replicata de extração	7,98
Folha - 3ª replicata de extração	7,84
Fruto - 1ª replicata de extração	0,11
Fruto - 2ª replicata de extração	0,11
Fruto - 3ª replicata de extração	0,10

A partir da Tabela 1 foi possível observar a boa repetibilidade entre as triplicatas de extração para as folhas e frutos, tendo sido obtidos resultados precisos também para outras amostragens.

De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que a metodologia analítica apresentada mostrou-se eficiente para análise do ácido salicílico em folhas e frutos de morangueiro, sendo também um método prático e simples, tanto na etapa de extração quanto na análise cromatográfica.

AGRADECIMENTOS

À FAPERJ pelo financiamento da pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, J. L.N.; LEANDRO, K.C.; ABRANTES, S.M. P.; ALBERT, A.L.M. Development of a new analytical method for determination of acetylsalicylic and salicylic acids in tablets by reversed phase liquid chromatography. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, **45**, 723-727, 2009.
- ASGHARI, M.; AGHDAM, M.S. Impact of salicylic acid in post-harvest physiology of horticultural crops. **Trends in Food Science & Technology** **21**, 502-509, 2010.
- BUSAM, G.; KASSEMAYER, H.-H.; MATTERN, U. Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators of fungal challenge. **Plant Physiology**, **115**, 1029-1038, 1997.
- CARVALHO, P.R.; MACHADO NETO, N.B.; CUSTODIO, C.C. Ácido salicílico em sementes de calêndula (*Calendula officinalis* L.) sob diferentes estresses. **Rev. Bras. Sementes**, **29**, 114-124, 2007.
- CORINA-VLOT, A.; KLESSIG, D.F.; PARK, S.W. Systemic acquired resistance: the elusive signal(s) Current Opinion. **Plant Biology**, **11**, 436-442, 2008.
- INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008**. Revisão 02 de junho de 2007.
- KUBOTA, M.; NISHI, K. Salicylic acid accumulates in the roots and hypocotyl after inoculation of cucumber leaves with *Colletotrichum lagenarium*. **J Plant Physiol.**, **97**, 1342-1347, 1991.
- MAZARO, S.M. **Indução de resistência em morangos pelo uso de elicitores**. Curitiba, PR: Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2007.
- PAULUS, A.O. Fungal diseases of strawberry. **HortScience**, **25**, 885-889, 1990.
- PINHEIRO, M.M.; SANDRONI, M.; LUMMERZHEIM, M.; OLIVEIRA, D.E. A defesa das plantas contra as doenças. **Revista Ciência Hoje**, **147**, 25-31, 1999.
- RASKIN, I. Role of salicylic acid in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, **43**, 439-463, 1992.
- ROSA, J.S.; GODOY, R.L.O.; OIANO-NETO, J.; CAMPOS, R.S.; MATTA, V.M.; FREIRE, C.A.; SILVA, A.S.; SOUZA, R.S. Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, **27**, 837-846, 2007.
- TANAKA, M.A.S.; PASSOS, F.A. Caracterização patogênica de *Colletotrichum acutatum* e *C. fragariae* associados à antracnose do morangueiro. **Fitopatologia Brasileira**, **27**, 484-488, 2002.