

Análise de triptofano livre em plantas de mirtilo

Ângela Diniz Campos¹

Patrícia Vinhas²

Rerinton Joabel Pires de Oliveira³

Fabiane Grecco da Silva Porto⁴

Marta Eliane Doumer⁵

Introdução

A auxina é um importante hormônio vegetal que ocorre principalmente em órgãos em crescimento ativo, tais como regiões meristemáticas, folhas jovens, coleóptiles e sementes em desenvolvimento. O ácido indol-3-acético (AIA) é tido como a principal auxina endógena em plantas. As duas rotas de AIA melhor estudadas implicam o ácido indol-3-acético como um intermediário proveniente da descarboxilação e desaminação do triptofano. Dependendo da sequência destas etapas, produzem como intermediários na reação a triptamina ou o indolpiruvato.

O número de aminoácidos existentes na

natureza é grande, no entanto para as plantas os de maior interesse são os tipos L - alfa, em que o radical genérico R é substituído por um hidrogênio.

A biossíntese da auxina indol-3-acético (AIA) dependente de triptofano possui diversas vias. Na primeira etapa desta rota, dois aminoácidos aminotransferases catalisam a transaminação do triptofano. As duas rotas de síntese de AIA mais estudadas implicam o indol-3-acetaldeído como um intermediário que promove a descarboxilação e a desaminação do triptofano (**Figura 1**).

¹Eng. Agrôn., Dra. em Fisiologia Vegetal, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. (angela@cpact.embrapa.br)

²Bolsista do Convênio Petrobras/Embrapa/FAPEG, Pelotas, RS. (vinhash@gmail.com)

³Eng° Agrôn. Mestrando em Fisiologia Vegetal/IB/UFPEL, Pelotas, RS. (rerinton@yahoo.com.br)

⁴Bacharel em Química, Técnica de Laboratório da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. (fabiane@cpact.embrapa.br)

⁵Bacharel em Química Ambiental, Bolsista do Convênio Petrobras/Embrapa/FAPEG, Pelotas, RS.

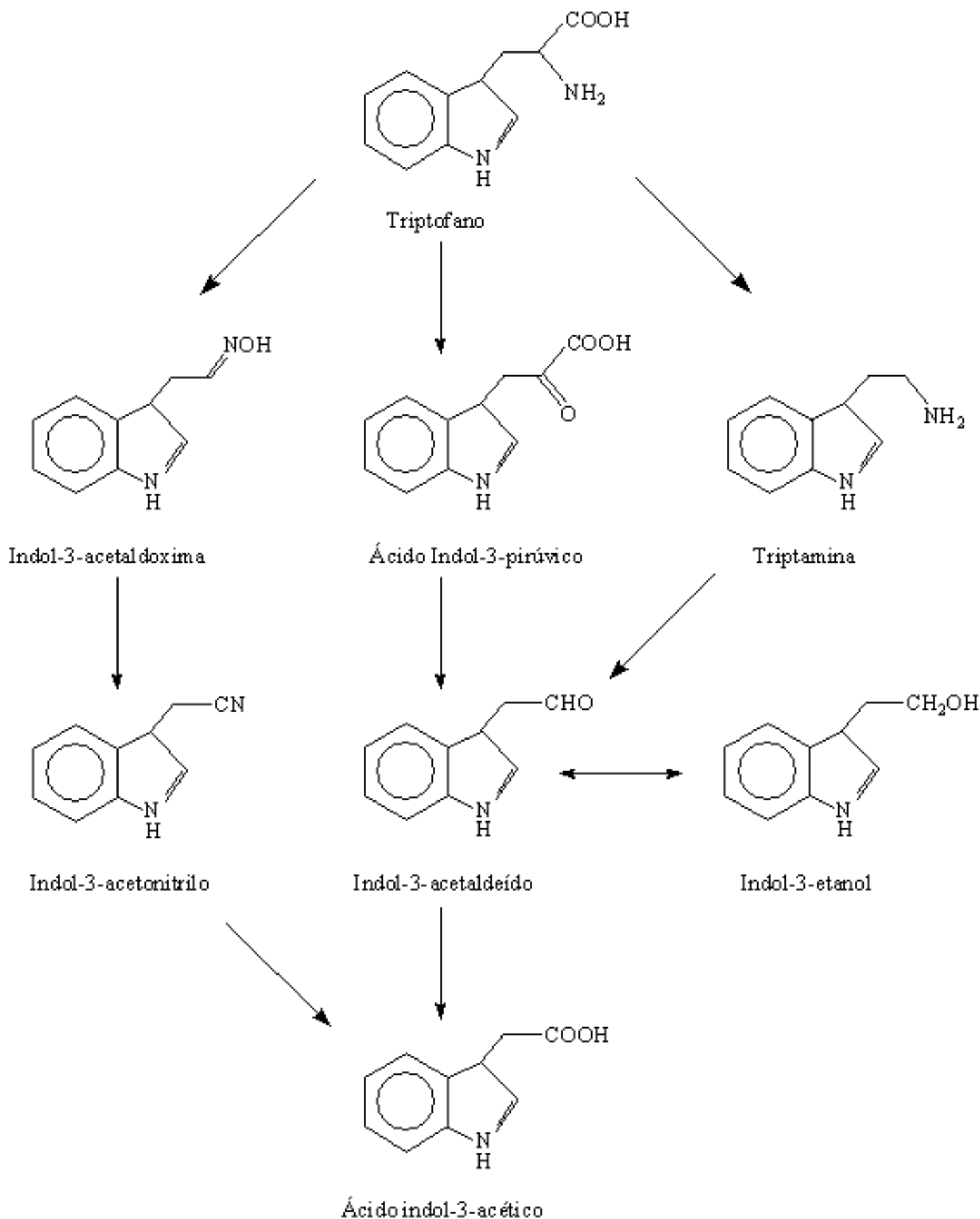


Figura 1. Rotas de sínteses do indol-3-acético (AIA) a partir do triptofano proposta para as plantas superiores (BANDURSKI, et al., 1993)

Esta metodologia para análise do triptofano livre se adapta a análises em estacas lenhosas de mirtilo onde é importante a concentração de auxina endógena para o desenvolvimento das mudas, e ocorre significativas alterações metabólicas durante os processos de enraizamento e brotação.

Os procedimentos para análise do triptofano em estacas lenhosas de plantas de mirtilo foram realizados baseados em Contreras e Lapa (1989), com as modificações e adaptações descritas a seguir:

O fundamento desta metodologia é a reação do aminoácido triptofano com a antrona em ambiente ácido, na presença de Fe^{+2} e Fe^{+3} . O complexo colorido formado é estável por várias horas. A leitura da absorvância deve ser realizada em espectrofotômetro a 545 nm. Uma grande vantagem deste método é que a determinação pode ser realizada na própria proteína, sem necessidade de hidrólise alcalina ou enzimática, apenas sendo necessária a dissolução das proteínas em NaOH.

Preparo dos Reagentes:

- Solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 62,5% (v/v) em água destilada: em 37,5ml água destilada adicionar lentamente 62,5ml de H_2SO_4 concentrado, resfriando imediatamente em água.
- Solução ferroso/férrica: diluir em 100ml de água destilada, 100mg de sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 100mg de cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).
- Solução de antrona 0,02% em ácido sulfúrico: diluir 20mg de antrona em 100ml de H_2SO_4 concentrado.
- Soluções de hidróxido de sódio (NaOH) 1,0 e 4,0N.
- Solução de ácido tricloroacético (ATC) 5% (p/v) em água.
- Solução de antrona 0,02%: H_2SO_4 62,5% na proporção 1:3 (v/v).
- Solução padrão de triptofano para determinação de Triptofano Livre: preparar padrões com concentrações de 5,0; 10,0; 20,0 e 40 μg triptofano/ml de solução em TCA 5%.

• Ácido acético glacial.

Procedimentos analíticos:

Pesar 2,5g da amostra de ramos secos e moída em moinho de facas tipo DeLeo, colocar em tubo de ensaio, e adicionar 15mL de água destilada. Em seguida tampar o tubo e agitar para que toda a amostra fique bem hidratada. Colocar o tubo com a amostra em banho fervente por 30 minutos. Retirar do banho e deixar esfriar, inicialmente filtrar a vácuo e fazer uma segunda filtragem em papel de filtro comum. Retirar um alíquota de 2mL, transferir para um tubo de centrifuga, adicionar 0,8mL de hidróxido de bário 3N e 0,8mL de sulfato de zinco 5%, agitar e deixar em repouso por 10 minutos, centrifugar a mistura em 2500 rpm, em temperatura ambiente por 10 minutos. Descartar o sobrenadante, ao precipitado, adicionar 15mL de ATC 5%, agitar até a completa dissolução, e deixar em repouso por 10 minutos. Em seguida promover uma filtração em papel de filtro comum, adicionar 1mL de ácido acético para cada 10mL de filtrado. Retirar uma alíquota de 1mL e adicionar lentamente pelas paredes de um tubo de ensaio que deverá estar imerso em banho de gelo contendo 4mL da solução de antrona, em seguida, adicionar 0,5mL da solução de ferroso/férrico, agitar e deixar em repouso na temperatura de 22 a 28 °C por 2 horas e 30 minutos para que a reação ocorra e a coloração se desenvolva completamente. É importante que não ocorra reação enquanto os tubos estiverem no banho de gelo, e que a agitação seja idêntica para todos os tubos. Realizar a leitura da absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 545nm. Na prova em branco, para as leituras em espectrofotômetro adicionar ATC 5% na mesma proporção utilizada no extrato. Para a curva padrão utilizar L - triptofano nas concentrações de 5 a 40 μg .

Calculo do Triptofano Livre:

$$\text{mg de Triptofano}/100\text{g} = \text{mg de Trp}/\text{ml} \times \text{vol. extr. TCA} \times 100 \div 1000 \times \text{peso da amostra TCA (g)}$$

onde:

- mg de Trp/ml = mg de Triptofano/ml,

obtido pelo cálculo da curva padrão ou de comparação direta com padrão de absorvância semelhante,

- vol. extr. TCA = volume do extrato de TCA, obtido da soma do volume de TCA + volume de água contida na amostra,

- peso da amostra TCA = Peso da amostra utilizada para fazer o extrato em TCA.

Em trabalhos realizados no laboratório de Fisiologia da Embrapa Clima Temperado, (Figura 2) Oliveira et al.,(2008) verificaram a ocorrência de significativas alterações nas concentrações de triptofano em ramos de

mirtilo provenientes de plantas dormentes, após a imersão destes em água por vinte e quatro horas.

Em outro estudo (Figura 3) Oliveira et al.,(2008 b) observaram que o teor de triptofano nas estacas lenhosas de mirtilo, variou após o plantio destas e que aos 21 dias ocorreu a maior concentração, provavelmente devido a alterações metabólicas ocorridas nesse período. Aos 54 dias após o plantio houve queda nos teores de triptofano em relação aos 21 dias, neste período as estacas apresentavam folhas e brotações e algumas com formação de calos basais.

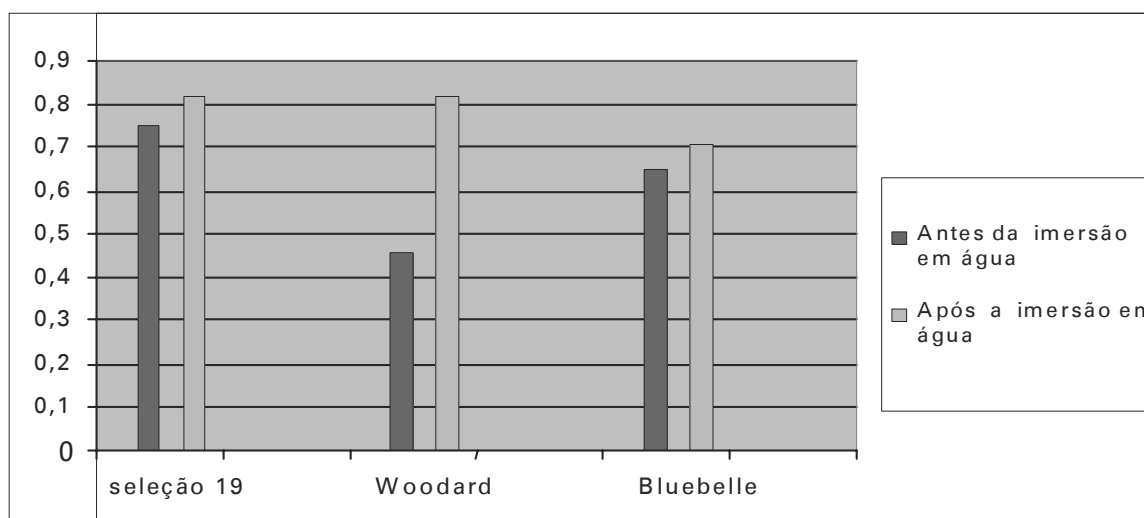


Figura 2. Teores de triptofano (mg.g^{-1}) em ramos de duas cultivares e uma seleção de mirtilo avaliados no mês agosto de 2007, antes e após a imersão dos ramos em água.

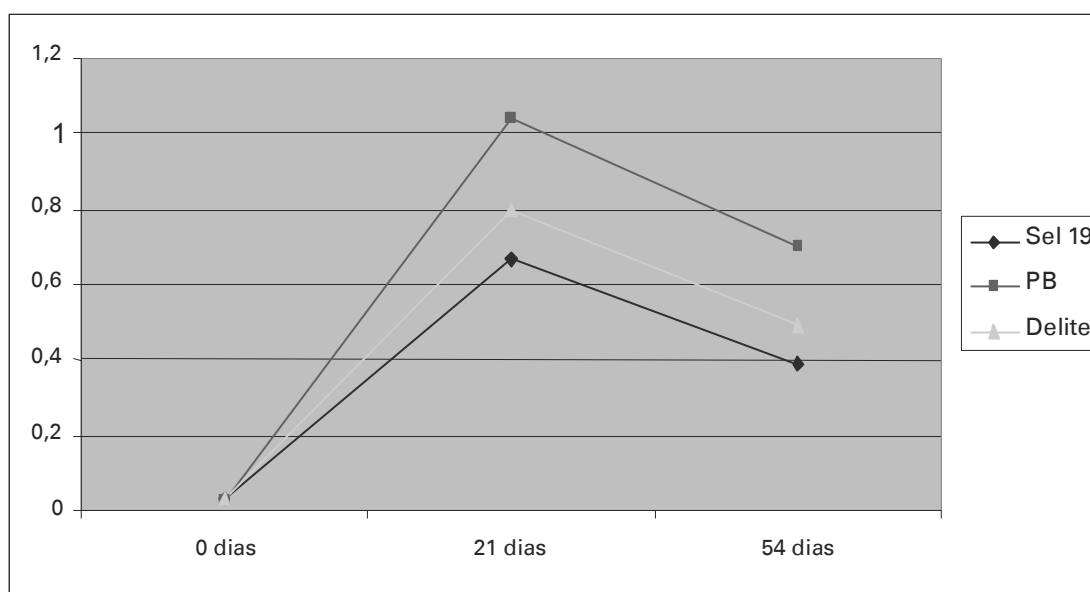


Figura 3. Evolução da concentração de triptofano (mg.g^{-1}) em estacas lenhosas das cultivares Powder blue (PB), Delite e da Seleção 19 proveniente do programa de melhoramento genético de mirtilo da Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, 2008.

Referências

- ASCON-BIETO, J. e TALON, M. **Fisiologia y bioquímica vegetal**, Madrid, Interamericana, 1993, 581p.
- BANDURSKI, R.; SLOVIN, J.; COHEN, J.D. Auxinas. In: ASCON-BIETO, J. e TALON, M. **Fisiologia y bioquímica vegetal**, Madrid, Interamericana, 1993, p. 285-326.
- Bio Amin fort. **Aminoácidos biológicamente activos den estado libre**. Disponível em: http://www.mayamagic.com/docs/711_presentacion_detalle-tec-aminoacidos-y-bioaminforte.html. Acesso em: 02 mar. 2009.
- CONTRERAS, G. E.; LAPA, J. G. Determinação rápida de triptofano por reação com antrona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 12., 1989. Rio de Janeiro. **Livro de Resumos** Rio de Janeiro: SBCTA, 1989., p. 152.
- COOL, J.B.; RODRIGO, G.N.; GARCIA, B.S.; TAMÉS, R.S. **Fisiologia Vegetal**. Madrid, 1990. 824p, Disponível em Scielo, acesso em 02.03.09.
- DUTRA, L. F.; KERSTEN, E.; FACHINELLO, J. C.. Época de coleta, ácido indolbutírico e triptofano no enraizamento de estacas de pessegueiro. **Sci. agric**, Piracicaba,, v. 59, n. 2 , p. 327-333, 2002.
- GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. (Ed.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v. 2, p. 117-31.
- HAGGQUIST, M.L.; STRID, K.O.; WIDEL, L.; LILJENBERG, C. Identification of tryptophan in leachate of oat hulls (*Avena sativa*) as mediator of root growth regulation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 72, p. 423-427, 1988.
- LUDWIG-MULLER, J.; HILGENBERG, W. A plasma membrane-bound enzyme oxidizes L-tryptophan to indole - 3 - acetaldoxime. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, n.74, p.240-250, 1988.
- MÜLLER, A.; WEILER, E.W. IAA-synthase, an enzyme complex from *Arabidopsis thaliana* catalyzing the formation of indole-3-acetic acid from (S)-tryptophan. **Biology and Chemistry**, Berlim, 381: 679-686, 2000a.
- MÜLLER, A.; WEILER, E.W. Indolic constituents and indole-3-acetic acid biosynthesis in the wild-type and a tryptophan auxotroph mutant of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, Berlim, 211: 855-863, 2000.
- Oliveira, R. J. P. de; Vinhas, P.; Mattos, G. S. de; Doumer M.; Campos, Â. D.; Antunes, L. E. C. **Investigação da Presença de Triptofano em Ramos Lenhosos de Mirtilo**. Anais do XX Congresso Brasileiro de Fruticultura e 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture – Vitória, ES, 2008. CD-Room
- Oliveira, R. J. P. de; Vinhas, P.; Mattos, G. S. de; Aires, R. F.; Campos, Â. D.; Antunes, L. E. C. **Avaliação do Teor de Triptofano em Ramos Lenhosos de Mirtilo, Durante o Período de Dormência da Cultura** - Anais do XVII CIC/X ENPÓS/UFPel – Pelotas, RS, 2008. CD-Room
- Oliveira, R. J. P. de; Vinhas, P.; Mattos, G. S. de; Aires, R. F.; Campos, Â. D.; Antunes, L. E. C. **Evolução do Teor de Triptofano em Estacas Lenhosas de Mirtilo Submetidas ao Enraizamento** - Anais do XVII CIC/X ENPÓS/UFPel – Pelotas, RS, 2008. CD-Room
- SLOVIN, J.P., BANDURSKI, R.S., COHEN, J.D., **Auxins**. In: Hooykaas, P.J.J., Hall, M.A., Libbenga, K.R. (Ed.), **Biochemistry and molecular biology of plant Hormones**. Elsevier; Amsterdam, 1999. P. 115-140.
- SOTO-URZÚA, L.; XOCHINUA-CORONA, Y. G.; FLORES-ENCARNACIÓN, M. and BACA, B. E. **Purification and properties of aromatic amino acid aminotransferases from *Azospirillum brasilense* UAP 14 strain**. **Canadian journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 294-298, 1996.
- TAIZ, L ; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 720 p.

Comunicado Técnico, 206 Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado

Endereço: Caixa Postal 403

Fone/fax: (53) 3275-8199

E-mail: sac@cpact.embrapa.br



1ª edição

1ª impressão 2008: 50 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: Walkyria Bueno Scivittaro

Secretário-Executivo: Joseane M. Lopes Garcia

Membros: Cláudio Alberto Souza da Silva, Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro, Isabel Helena Verneti Azambuja, Luís Antônio Suita de Castro. **Suplentes:** Daniela Lopes Leite e Luís Eduardo Corrêa Antunes

Expediente

Revisão de texto: Sadi Sapper

Normalização bibliográfica: Regina das Graças Vasconcelos dos Santos

Editoração eletrônica: Oscar Castro

Composição e Impressão: Embrapa Clima Temperado