

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Departamento de Química e Bioquímica
Análises Químicas e Bioquímicas em vegetais
Eng. Agrônomo Me. Gean Charles Monteiro
Prof^a. Dr^a. Giuseppina Pace Pereira Lima

Atividade da Fenilalanina amônia-liase (PAL)

1. INTRODUÇÃO

A fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5) é fundamental na biossíntese de fenilpropanóides e participa da síntese de monômeros de lignina, ácido salicílico, fitoalexinas e flavonoides. A fenilalanina amônia-liase funciona catalisando a transformação, por desaminação, do aminoácido L-fenilalanina, em ácido trans-cinâmico, sendo este o primeiro passo para a biossíntese dos fenólicos vegetais. Os compostos formados neste metabolismo, quando atacados por enzimas oxidativas, gera escurecimento dos tecidos, aspecto muitas vezes rejeitado pelos consumidores.

2. MÉTODO

2.1. Reagentes e soluções

A) Tampão Borato de Sódio pH 8,8 a 0,1M

- Pesar 38,14 g de Borato de Sódio (Bórax P.A. - $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$);
 - Diluir em ± 700 mL de água deionizada (usar ultrassom + calor se necessário);
 - Acrescentar 50 g (5% - m/v) de Polivinil-pirrolidona (PVP);
 - Agitar até dissolver;
 - Ajustar o pH para 8,8 com ácido clorídrico (HCl) P.A.;
 - Completar o volume para 1000 mL (1 L) com água deionizada, após pode ser guardado em temperatura ambiente;
 - Acrescentar 1,2 mL de β -mercaptoetanol por último (somente na hora de usar).
- Obs: Para β -mercaptoetanol se recomenda o uso de luvas, jaleco e máscara (produto cancerígeno), fazer o procedimento em capela.

B) Tampão Borato de Sódio pH 8,8 a 0,2M

- Pesar 76,28 g de Borato de Sódio (Bórax P.A. - $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$);
- Diluir em ± 700 mL de água deionizada (usar ultrassom + calor se necessário);
- Agitar até dissolver;
- Ajustar o pH para 8,8 com ácido clorídrico (HCl) P.A.;
- Completar o volume para 1000 mL (1 L) com água deionizada, após pode ser guardado em temperatura ambiente.

C) Fenilalanina

- Pesar 1,652 g de Fenilalanina;
 - Diluir com água deionizada;
 - Colocar em balão volumétrico e completar para 100 mL;
 - Deixar na geladeira até o uso, a solução precisa estar em temperatura ambiente no momento do uso (duração 2-3 dias).
- Obs: Para dissolver a Fenilalanina esquenta-se um pouco a água ou usa-se o ultrassom.

D) Ácido Clorídrico (HCl) 6N

$$C_1 \cdot V = C_2 \cdot V_2$$

$$6N \cdot 50\text{mL} = 12,08N \cdot X$$

$$X = 24,83 \text{ mL para } 50 \text{ mL}$$

Obs: Completar com água deionizada.

2.2. Ensaio

Extração:

- Os materiais utilizados para extração e quantificação da PAL devem ser de uso exclusivo para esta enzima, pois a mesma sofre grande interferência de produtos químicos, principalmente de detergentes (sabões), por este motivo, o material utilizado deve ser lavado apenas com água deionizada;
 - Recomenda-se fazer todo processo da metodologia no escuro ou com luzes especiais, para que não aja perda de atividade enzimática.
 - Os tampões devem estar gelados (no gelo se julgar necessário);
 - Todos materiais utilizados para maceração e armazenamento e armazenamento do extrato deve ser colocados em nitrogênio líquido por alguns segundos;
 - A amostra deve permanecer gelada em todas as fases de manuseio (colocar no gelo);
 - Macerar a amostra em nitrogênio líquido (quanto menor as partículas melhor).
 - Pesar 100 mg da amostra e anotar o peso;
 - Colocar em tubo de plástico para centrifugar e adicionar 10 mL da solução Tampão Borato de Sódio pH 8,8 a 0,1M;
 - Centrifugar a 6.000 a 12.000 rpm por 20-25 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C;
- Obs: Se julgar necessário pode filtrar a amostra. O extrato pode ser armazenado congelado durante alguns meses (2 a 3 meses).

Reação:

Em tubos de ensaio pipetar da seguinte maneira:



Branco da solução	Branco da Amostra	Amostra
- 1 mL tampão borato 0,1M - 1 mL tampão borato 0,2M - 1 mL de fenilalanina	- 1 mL da amostra - 2 mL tampão borato 0,2M	- 1 mL da amostra - 1 mL tampão borato 0,2M - 1 mL de fenilalanina

- Fazer um branco para cada amostra;
- Aquecer a Fenilalanina antes do uso (± 30 °C);
- Colocar os tubos em banho-maria a 36 °C, esperar ± 5 minutos (até que a solução aqueça) e acrescentar por último 1 mL de fenilalanina (já aquecida, aproximadamente na temperatura ambiente);
- Incubar em banho-maria durante 1 hora à 36 °C (agitar os tubos nesse período se julgar necessário, evitando a criação de bolhas que atrapalha a reação da fenilalanina);

- Retirar os tubos e acrescentar 0,1 mL (100 µL) de HCl 6N, para parar a reação, após agitar.
 - Leitura a 290 nm (Espectrofotômetro).
- Obs: Leitura em cubetas de quartzo (Q), pois o quartzo deixa passar somente os comprimentos de onda na faixa UV, evitando interferências de pigmentos.

2.3. Cálculo

$$Z = \frac{A}{60} \times \frac{V}{v \cdot d \cdot \epsilon_{290}}$$

Onde:

A: variação de extinção ((Leitura amostra – Leitura do branco da amostra) – Leitura do branco da solução);

60: tempo de reação (min);

V: volume total (3 mL);

v: volume da amostra (1 mL);

d: distância ótica percorrida (cubeta) = 1 cm;

ϵ_{290} : coeficiente de extinção molar = $10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Ou seja, $Z = A/60 \times 3 \cdot 10^{-4}$

Transformação do peso da amostra:

$$\begin{array}{l} 100 \text{ mg} \rightarrow 10 \text{ mL} \\ X \quad \rightarrow 1 \text{ mL} \end{array}$$

$$X = 10 \text{ mg em 1 mL de amostra}$$

Unidade: $\text{mmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ massa fresca ou KAT g^{-1} massa fresca

Bibliografia

PEIXOTO, Paulo Henrique Pereira et al. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999.