



SELEÇÃO DE INIBIDORES QUÍMICOS ESPECÍFICOS DA ENZIMA CONIFERALDEÍDO DESIDROGENASE

Dyoni Matias de Oliveira¹, Aline Finger-Teixeira², Ana Paula Ferro², Wanderley Dantas dos Santos³, Oswaldo Ferrarese-Filho³

RESUMO: O ácido ferúlico (FA) interliga os polímeros da parede celular diminuindo a atividade de hidrolases. O FA é um importante intermediário na constituição da biomassa lignocelulósica, a qual é apontada como uma promissora matéria-prima para produção de bioetanol. O FA é produzido pela oxidação do coniferaldeído, numa reação catalisada pela coniferaldeído desidrogenase (CALDH). Este trabalho teve como objetivo testar, *in vitro*, inibidores da CALDH visando reduzir o conteúdo de FA e aumentar a acessibilidade de hidrolases aos polissacarídeos da parede. Sementes de milho (*Zea mays* L.) foram germinadas no escuro (72 h, 25°C), 25 plântulas uniformes foram mantidas em hidroponia por 24 h. Para determinação da atividade enzimática, foram macerados 2 g de raízes frescas em tampão de extração. O homogeneizado foi centrifugado (2.200 ×g, 30 min, 4°C). As proteínas foram precipitadas por saturação com sulfato de amônio a 70%. A solução foi centrifugada (15 min), e o pellet ressuspensionado com tampão de extração foi considerado o extrato enzimático. A reação foi iniciada com a adição de substrato e mantida a 40°C por 10 min. O produto da reação foi analisado a 330 nm por HPLC. Os ensaios enzimáticos foram conduzidos na presença de dissulfeto de tetraetilamônio, ácido rosmarínico e *trans*-chalcona, numa concentração similar a do substrato (30 µM). Todos estes compostos inibiram a atividade da enzima em cerca de 20% sugerindo que eles podem, possivelmente, ser usados para reduzir a recalcitrância da parede celular.

PALAVRAS-CHAVE: CALDH, *trans*-chalcona, ácido rosmarínico, dissulfeto de tetraetilamônio, ácido ferúlico.

INTRODUÇÃO

O ácido ferúlico (FA) é um importante componente da parede celular. Ele auxilia na integridade da parede celular e impede o ataque de hidrolases sobre a celulose (dos Santos *et al.*, 2008). O FA é sintetizado pela oxidação do coniferaldeído, numa reação catalisada pela coniferaldeído desidrogenase (CALDH) que atua na via dos fenilpropenoides, responsável pela produção dos precursores da lignina, os monolignóis (Nair *et al.*, 2004).

Dados preliminares sugerem uma correlação inversa entre a digestibilidade dos tecidos vegetais e o grau de interligação por fenilpropenoides. A inibição da CALDH pode reduzir a disponibilidade de FA e assim, permitir maior extração de polissacarídeos da parede celular. Tecnologias capazes de viabilizar a hidrólise da celulose e hemiceluloses em seus monossacarídeos constituintes a baixo custo tornarão possível a utilização das mais diversas fontes de biomassa lignocelulósica, para a produção de etanol, com

¹ Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, Maringá – Paraná. dyoni_matias@yahoo.com.br

² Pós-Graduandas da Universidade Estadual de Maringá, Maringá – Paraná. alifinger@hotmail.com, aninha_pfro@yahoo.com.br. MCT/CNPq/FINEP

³ Docentes da Universidade Estadual de Maringá, Maringá – Paraná. wdsantos2@uem.br, oferrarese@uem.br

consequências positivas para a economia e meio ambiente. O objetivo deste trabalho foi testar *in vitro* possíveis inibidores da CALDH analisando a redução da oxidação de coniferaldeído a ácido ferúlico.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo e tratamento das plântulas para ensaios bioquímicos

As sementes de milho cv IPR 114 foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 2%, lavadas com água deionizada e distribuídas uniformemente em papel de germinação umedecido com água deionizada. As sementes foram recobertas com outra folha de papel, enroladas delicadamente e acondicionadas em tubos apropriados para preservar a umidade e climatizados em câmaras de germinação por 72 h. As plantas viáveis foram selecionadas e acondicionadas em suportes ajustáveis e apropriados para o crescimento em hidroponia, utilizando-se solução nutritiva de Hoagland meia força.

Protocolo para determinação da atividade da CALDH

A padronização da atividade enzimática da CALDH foi adaptada a partir de Nair *et al.* (2004) para as diferentes plantas. Os tecidos vegetais (2 g de biomassa fresca) foram macerados em 3 mL de meio de extração contendo ditiotreitol 5 mM, EDTA 1 mM, 10% de glicerol e tampão Hepes 50 mM pH 8,0. A suspensão foi centrifugada a 2200xg por 30 min sob refrigeração e o sobrenadante precipitado com sulfato de amônio 70%. A proteína precipitada foi centrifugada por 15 min e o precipitado dissolvido com 1 mL de tampão de extração sendo considerado o extrato enzimático final. Para o ensaio enzimático foi acompanhada a oxidação de coniferaldeído a FA a 40°C, 10 min. O volume final do meio de reação (1 mL) continha 100 µL de extrato enzimático, DTT 5 mM, tampão Hepes/HCl 50 mM, pH8,0, NAD⁺ 1 mM e coniferaldeído 30 µM. A reação foi iniciada com a adição do substrato e encerrada após 10 min incubada a 40°C com 60 µL de HCl 3 M. A seguir as amostras foram centrifugadas por 2 min em 10000xg. A atividade enzimática foi avaliada a 330 nm por HPLC pela produção de FA min⁻¹ mg de proteína⁻¹.

Seleção de inibidores enzimáticos

Os ensaios enzimáticos foram submetidos com diferentes classes de compostos para identificar possíveis inibidores. O primeiro composto testado foi o dissulfeto de tetraetiltiuram (Figura 1), composto ativo do Dissulfiram, droga utilizada no tratamento de alcoolismo, que é responsável pela inibição competitiva da enzima aldeído desidrogenase em humanos. Também foram utilizados o ácido rosmarínico (Figura 2), o éster do ácido cafeico e a *t*-chalcona (Figura 3), inibidora de algumas enzimas da via dos fenilpropenoides (Chen *et al.*, 2011). Todos os inibidores foram testados, *in vitro*, numa concentração de 30 µM, que foi a mesma concentração utilizada para o substrato.

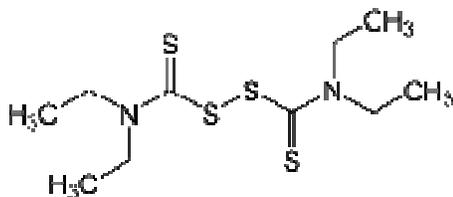


Figura 1 – Dissulfeto de tetraetiltiuram (Dissulfiram).

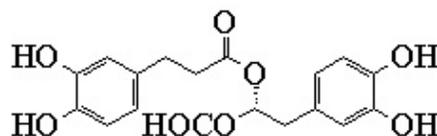


Figura 2 - Ácido rosmarínico.

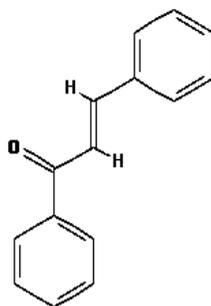


Figura 3 - *t*-chalcona.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados revelaram que os 3 compostos testados inibem a atividade da CALDH em relação ao controle (Figura 4). A porcentagem de inibição foi 21% para o dissulfeto de tetraetiltiuram, 26% para o ácido rosmarínico e 21% para a *t*-chalcona. O dissulfeto de tetraetiltiuram conhecido como inibidor da enzima aldeído desidrogenase de humanos foi o inibidor mais efetivo da CALDH de milho.

Segundo Chen *et al.* (2011) a *t*-chalcona é inibidor da atividade de enzimas relacionadas com a via dos fenilpropenoides, como a fenilalanina amônia liase (PAL) e a 4-coumarato CoA ligase (4-CL), apresentando um efeito semelhante na atividade da CALDH, *in vitro*. A inibição da atividade da CALDH e dos teores de lignina pela *t*-chalcona, podem agir sinergicamente na redução da recalcitrância da lignocelulose. O ácido rosmarínico, um composto fenólico, também inibiu significativamente a atividade da CALDH. Esses efeitos podem ocasionar a redução do conteúdo de FA na parede celular, e assim aumentar a acessibilidade das enzimas hidrolíticas sobre os polissacarídeos.

Dados preliminares sugerem que pode haver uma correlação inversa entre os níveis de açúcar nos tecidos vegetais e o grau de interligação por fenilpropenoides (como o ácido ferúlico), podendo se relacionar com a susceptibilidade da parede às hidrolases e à presença de fenilpropenoides na parede celular.

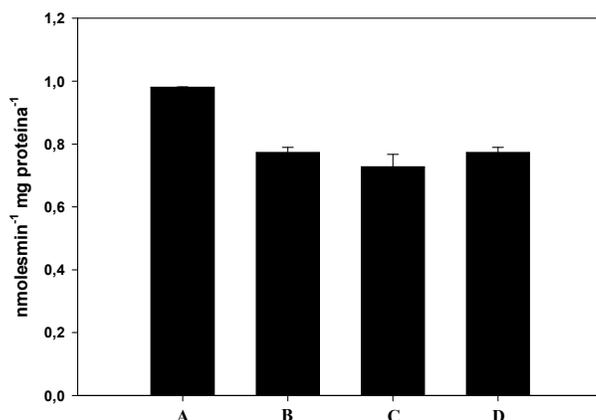


Figura 4 - Efeitos de inibidores químicos sobre a atividade da CALDH, controle (A), 30 μ M de dissulfeto de tetraetiltiuram (B), 30 μ M de ácido rosmarínico (C) e 30 μ M de *t*-chalcona (D).

CONCLUSÃO

Os compostos testados reduziram a atividade da CALDH *in vitro* sugerindo que podem ser aplicados *in vivo* para produzir plantas menos recalcitrantes. Ensaios adicionais serão realizados para determinar o efeito destes inibidores sobre rendimento de açúcares fermentáveis a partir da hidrólise da biomassa lignocelulósica.

REFERÊNCIAS

dos SANTOS, W.D.; FERRARESE, M.L.L.; NAKAMURA, C.V.; MOURÃO, K.S.M; MANGOLIN, C.A.; FERRARESE-FILHO, O. (2008). Soybean (*Glycine max*) Root Lignification Induced by Ferulic Acid. The Possible Mode of Action. **Journal of Chemical Ecology**, DOI 10.1007/s10886-008-9522-3.

CHEN, W. J., YUN, M. S., DENG, F., YOGO, Y. (2011) Chalcone suppresses lignin biosynthesis in illuminated soybean cells, **Weed Biology and Management** 11,49–56.

NAIR, R. B., BASTRESS, K. L., RUEGGER, M.O., DENAULT, J. W., CHAPPLE, C. (2004). The *Arabidopsis thaliana* reduced epidermal fluorescence1 gene encodes an aldehyde dehydrogenase involved in ferúlico acid and sinapic acid biosynthesis. **The Plant Cell** 16: 544-554.