ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CINAMOIL COENZIMA A REDUTASE

Alan Groff de Souza (PIBIC-AF/FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA/UEM), Vanessa Guimarâes Olher (Pós-graduação), Armando Mateus Pomini (Coorientador), Wanderley Dantas dos Santos (Orientador), e-mail: alangroff@hotmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Exatas/Maringá, PR.

Ciências Biológicas e Genética Vegetal

Palavras-chave: CCR, redutase, feruloil-CoA.

Resumo:

Para realizar o estabelecimento de um protocolo para determinação da atividade da enzima CCR (cinamoil coenzima A redutase) tentamos observá-la por sua reação inversa, ou seja, a oxidação do coniferaldeido até feruloil-CoA. Para isso, plântulas de milho foram germinadas por 72 h em papel germitest (escuro) e crescidas por 24 h em meio hidropônico. Então o extrato bruto da CCR foi produzido a partir de 2 g de raízes da plântula em tampão fosfato 100 mM, pH 7,5, contendo DTT (ditiotreitol) 3 mM, EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 1 mM e PVPP (polivinil polipirrolidona) 0,05 g. A reação foi iniciada com a adição de 0,1 mM de coniferaldeido, 0,25 mM de $NADP^+$ (Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina) e 0,35 mM de CoA (Coenzima A) e conduzida a 35 ºC por 30 min, de acordo com o protocolo de Sarni et al. 1984.
O produto foi analisado em HPLC contra padrão de Feruloil-CoA sintetizado segundo estabelecido por Stockigt and Zenk 1975, que foi caracterizado anteriormente pela técnica de RMN (Ressonância magnética nuclear) de ^1H e ^{13}C. Porem a análise cromatográfica não revelou a presença de feruloil-CoA pela reação enzimática.

Introdução

O milho é o cereal de maior volume de produção no mundo, com aproximadamente 960 milhões de toneladas. Estados Unidos, China, Brasil e Argentina são os maiores produtores, representando 70% da produção mundial. Dentro deste cenário, o Brasil, com uma área cultivada com milho de 15,12 milhões de hectares e produção de 82 milhões de toneladas, é hoje

um país estratégico, pois, é o terceiro maior produtor e o segundo maior exportador mundial de milho.

No entanto a muito a se descobrir sobre este cereal, por exemplo, a cinamoil coenzima A redutase é uma das enzimas-chave envolvidas na biossíntese dos precursores universais da lignina em plantas, sendo a lignina um dos principais componentes da parede celular. Estabelecer um protocolo para esta proteína ajudaria a entender como funciona a formação da parede celular, assim como ajudar a obter uma planta com maior disponibilidade de biomassa para produção de bioenergia.

Materiais e métodos

Síntese do Feruloil-CoA.

A síntese do feruloil-CoA consiste em duas etapas. Primeiramente, sintetizamos o ferulato de N-hidroxisuccinimida, através de uma reação de esterificação utilizando nesta reação 0,73 g de ácido ferúlico, 0,43 g de N-hidroxisuccinimida, 0,88 g de DCC (diciclohexilcarbodimida) para agir como catalizador.

Para purificar o ferulato de N-hidroxisuccinimida, o produto da reação passou por uma coluna cromatográfica de sílica gel 60, utilizando como fase móvel os solventes hexano, clorofórmio e metanol em gradiente crescente de polaridade. Ao analisarmos as frações em CCD (cromatografia de camada delgada), reveladas com anizaldeido, então as frações de 6 a 13 (solúveis em clorofórmio) passaram por outra coluna de sílica gel 60,dessa vez, utilizando como fase móvel hexano, acetato de etila e metanol em gradiente de polaridade crescente. Então as frações 49 a 61 (solúveis em acetato de etila) foram juntadas e particionadas com cloroformio, onde a parte clorofórmica foi submetida a uma lavagem com acetona e outra lavagem com uma mistura de acetona com clorofórmio (8:2) e em seguida uma ultima lavagem com uma mistura de solventes contendo clorofórmio metanol e água destilada (1:2:0,8) gerando um precipitado puro analisado em CCD e posteriormente confirmado como sendo o produto de interesse por RMN de ^{13}C e ^{1}H.

Na segunda etapa da síntese do feruloil-CoA foi feita através de uma reação de tiotransesterificação. Para o preparo foi utilizado 50 mg de ferulato de N-hidroxisuccinimida, 25 mg de Coenzima A (CoA), 25,2 mg de bicarbonato de sódio e 6 mL de água destilada foram adicionados a um balão de síntese de 25 mL. A mistura reacional permaneceu com agitação constante e em atmosfera neutra, por 24 h a 4 ºC.

Após o término da reação o conteúdo do balão foi colocado em um funil de separação onde foi feita uma partição com acetato de etila. A fase orgânica

foi separada e purificada por cromatografia de coluna de sílica gel 60, utilizando como fase móvel hexano, clorofórmio e metanol em gradiente de polaridade. O produto puro foi posteriormente confirmado como feruloil-CoA por RMN de ^{13}C e ^{1}H.

Atividade Cinamoil Coenzima A redutase.

Para este processo primeiramente germinamos Sementes de milho por 24 h. Após a germinação, os ápices radiculares (2 g) foram macerados com pistilo e grau em meio de extração contendo 0,05 g de PVPP, 3,0 mL de tampão fosfato 100 mM, pH 7,5 contendo DTT 3,0 mM e EDTA 1 mM a 4 °C. O extrato foi centrifugado reservando-se o sobrenadante que foi considerado como extrato enzimático bruto.
A reação com a enzima foi realizada incubando-se 200 uL do extrato enzimático em um meio de reação contendo 400 uL de tampão fosfato pH 7,5, 125 µL de $NADP^+$ 2 mM e 175 µL de CoA 2,0 mM. A reação foi iniciada com a adição de 50 µL do substrato da enzima coniferaldeído 2 mM. A reação foi incubada por 30 min a 35 °C e cessada com a adição de 20 uL de ácido acético.
A produção de feruloil-CoA foi monitorada por cromatografia líquida de alto desempenho utilizando o feruloil-CoA sintetizado como padrão. A análise foi realizada em um HPLC SCL-10A (Shimadzu, Tokyo) equipado com um detector de arranjo de diodos. O feruloil-CoA foi separado em uma coluna C18 150 x 4,6 mm, 5 µm (Shimpack CLC-ODS (M) Shimadzu), utilizando acetonitrila 40% e ácido acético 0,1% (90:10 v/v) como fase móvel em fluxo de 1,0 mL min-1 em corrida isocrática.

Resultados e Discussão

A síntese do feruloil-CoA foi obtida com sucesso porem com baixo rendimento e obtendo um produto com baixa estabilidade.
A análise cromatográfica não revelou a presença de feruloil-CoA pela reação enzimática da CCR. Ao invés disso, observamos a formação de ácido ferúlico livre. Este resultado sugere que a variação de energia livre da reação catalisada pela CCR pode ter limitado a velocidade da reação revertida. Outras enzimas provenientes do extrato enzimático bruto parecem ter agido mais rapidamente sobre o coniferaldeído catalisando sua oxidação a ácido ferúlico. De fato, a coniferaldeído desidrogenase, enzima com atividade especialmente elevada em gramíneas converte o coniferaldeído em ácido ferúlico utilizando NAD ou $NADP^+$ como aceptor de elétrons.
A partir destes resultados, iniciamos a síntese de FA-CoA novamente a fim de utilizá-lo agora como substrato e não apenas como padrão.

Conclusões

Não foi possível estabelecer um protocolo determinação da atividade da enzima cinamoil coenzima A redutase (CCR) por sua reação inversa, porem ficou estabelecido o protocolo de síntese do feruloil-CoA que possibilita a opção de tentar estabelecer a atividade da CCR de forma direta.

Agradecimentos

Fundação Araucária

Referências

SARNI, F.; GRAND, C. and BOUDET, M. Purification and properties of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol dehydrogenase from poplar stems (Populus X euramericana). **Eur. J. Biochem**. v.139, p. 259-265,1984.

Stockigt, J. and Zenk, M. H. Chemical Syntheses and Properties of Hydroxycinnammoyl-CoA A Derivatives. **Z. Naturforsch**. v. 30 , p. 352-358 1975.

XXIV EAIC
IV EAIC JR
23 a 25 de setembro
de 2015
24º Encontro Anual de Iniciação Científica
4º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior

XXIV EAIC
IV EAIC JR
23 a 25 de setembro
de 2015
24º Encontro Anual de Iniciação Científica
4º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior