

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“ESTUDOS METABÓLICOS, ENZIMÁTICOS E GENÉTICOS  
DO FUNGO ENDOFÍTICO *Penicillium brasilianum*”**

**Taícia Pacheco Fill\***

Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de  
concentração: QUÍMICA ORGÂNICA

**Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho**

**\* bolsista FAPESP**

**São Carlos - SP  
2014**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

F484em      Fill, Taícia Pacheco.  
Estudos metabólicos, enzimáticos e genéticos do fungo  
endofítico *Penicillium brasilianum* / Taícia Pacheco Fill. --  
São Carlos : UFSCar, 2014.  
202 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
2014.

1. Biossíntese. 2. Produtos naturais. 3. Brasilamidas. 4.  
Fenilalanina amônia-liase. 5. *Penicillium brasilianum*. 6.  
Fungos endofíticos. I. Título.


CDD: 574.1929 (20<sup>a</sup>)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Departamento de Química  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
Curso de Doutorado

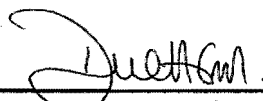
---

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado da candidata Taicia Pacheco Fill, realizada em 31 de março de 2014:*




---

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



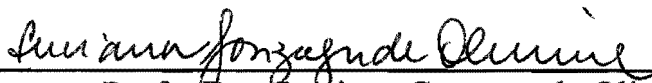
---

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza



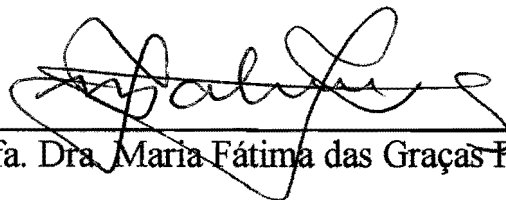
---

Profa. Dra. Maysa Furlan



---

Profa. Dra. Luciana Gonzaga de Oliveira



---

Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva

Aos meus pais, Carlos Peter Fill, Iucema Collado Pacheco,  
e meu irmão Guilherme Fill  
pelo amor, respeito, compreensão e suporte em mais esta jornada.  
Meus agradecimentos especiais, aos meus avós Hans, Enedina, Ana  
e Geraldo (*in memoriam*), meu fã incondicional.

## **Agradecimentos especiais**

Ao Professor Dr. Edson Rodrigues Filho pela orientação, respeito e principalmente pela amizade e ótimos 10 anos de convivência.

Ao meu marido Henrique por estar sempre ao meu lado, pela dedicação e amor.

A banca examinadora, Profas. Dras. Dulce Helena Ferreira de Souza, Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, Luciana Gonzaga de Oliveira e Maysa Furlan e ao Prof. Dr. Humberto Milagre pelo aceite e pelas valiosas sugestões.

Aos professores e secretárias da PPG-Química da UFSCar pela ajuda em minha formação.

Ao pessoal do grupo LaBioMMi pelo companheirismo, amizade e valiosas sugestões (Gezimar, Marília, Rodrigo, Diego, Gabriel, Enzo, Carol, Carol roxa, Tati, Gabi, Douglas, Diana, Zeh, Alef, Felipe, Zia, Monize, Helo 1, Helo 2, Jessica, Renata, Yaíma e tantos outros alunos que passaram pelo grupo).

Ao Professor Dr. Peter Ledlay pela orientação durante o estágio sanduiche na Universidade de Cambridge, UK e todo seu grupo de pesquisa.

A Prof. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza e as meninas de seu grupo de pesquisa pela grande ajuda na execução do trabalho

A Prof. Dra. Maysa Furlan e o Prof. Dr. Fernando pela grande ajuda na execução do trabalho.

Ao programa de Pós-graduação em Química da UFSCar.

À Fapesp pela bolsa concedida.

A todos meus amigos São Carlos, em especial às amigas Luciana, Stella, Livia e Kenia que me ajudaram sempre durante estes 10 anos.

## Lista de Tabelas

TABELA 3.1 - Reagentes .....	25
TABELA 3.2 - (Continuação).....	26
TABELA 3.3 - Tampões .....	26
TABELA 3.4 - Kits .....	27
TABELA 3.5 - Meios de cultura.....	27
TABELA 3.6 - Equipamentos e Materiais.....	28
TABELA 3.7 - Outros materiais.....	29
TABELA 3.8 - Vetores .....	29
TABELA 3.9 - Cultivo do fungo em diferentes meios de cultura.....	32
TABELA 3.10 - Condições do espectrômetro de massas para (ESI+).....	34
TABELA 3.11 - Condições de SRM para a substância brasilamida A .....	34
TABELA 3.12 - Condições do espectrômetro de massas para o ácido cinâmico (ESI-).....	38
TABELA 3.13 - Códigos utilizados nos ensaios enzimáticos .....	41
TABELA 3.14 - Precipitação com sulfato de amônio – quantidade de sal a ser adicionado a 0 °C.....	42
TABELA 3.15 - Composição dos meios de cultura utilizados no experimento.....	44
TABELA 3.16 - Condições do espectrômetro de massas para (ESI+).....	50
TABELA 3.17 - Programa do termociclador nas reações de PCR do gene <i>PAL</i> . .....	53
TABELA 3.18 - Programa do termociclador nas reações de PCR do gene <i>PAL</i> . .....	56
TABELA 4.1 - Valores de concentração estimados para a produção de brasilamida A em diferentes meios de cultura.....	74
TABELA 4.2 - Valores de halos de crescimento para o fungo <i>P. brasilianum</i> na presença de ácido cinâmico.....	77
TABELA 4.3 - Valores de halos de crescimento para o fungo <i>P. brasilianum</i> na presença de cinamatos .....	81
TABELA 4.4 - Valores de absorbância e concentração dos extratos proteicos.....	86
TABELA 4.5 - Códigos utilizados nos ensaios enzimáticos .....	86
TABELA 4.6 - Áreas encontradas para o cultivo do fungo na ausência e presença de Phe .....	93
TABELA 4.7 - Áreas obtidas para o ácido cinâmico a partir das reações enzimáticas com a PAL obtida quando o fungo foi cultivado em diferentes meios de cultivo.....	94

TABELA 4.8 - Valores de áreas encontradas para o ácido cinâmico quando a reação enzimática foi submetida a variações na temperatura e pH. ....	96
TABELA 4.9 - Purificação da enzima PAL produzida pelos fungos <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Rhodotorula glutinis</i> (MACDONALD & D’CUNHA, 2007) .....	100
TABELA 4.10 - Especificidade da enzima PAL produzida por <i>Rhizoctonia solani</i> (KALGATGI & SUBBARAO, 1975).....	115
TABELA 4.11 - Atribuição dos sinais de RMN <sup>1</sup> H a molécula 4-bromo-fenillalanina <i>N</i> -acetilada, <i>J</i> (Hz).....	128
TABELA 4.12 - Atribuições dos sinais de RMN <sup>1</sup> H para a molécula apresentada <i>J</i> (Hz).....	129
TABELA 4.13 - Porcentagem de inibição encontrada para cada um dos compostos testados .....	134
TABELA 4.14 - Valores e médias de A260/A280, A260/A230 e concentrações das amostras de RNAtotal. ....	144
TABELA 4.15: Processo de Purificação da PAL .....	161
TABELA 4.16 - Valores de áreas encontradas para o ácido cinâmico quando a reação enzimática foi submetida a variações na temperatura e pH. ....	163

## Lista de figuras

FIGURA 1.1 - Unidade básica C <sub>6</sub> C <sub>3</sub> dos fenilpropanóides e alguns exemplos destes produzidos por plantas.....	4
FIGURA 1.2 - Rota biossintética para a formação de fenilpropanóides. Enzimas relacionadas: PAL, fenilalanina amônia-liase; TAL, tirosina amônia-liase; C4H, cinamato 4-hidroxilase; 4CL, ácido p-cumárico- Coa ligase; COMT, ácido cafeico/ ácido 5-hidroxiferúlico O-metil-transferase; C3H, p-coumaroil chiquimato/quinato 3-hidroxilase; CCoAOMT, cafeoil CoA O-metil-transferase; F5H, ferulato 5-hidroxilase; CHS, chalcona sintase; STS, etilbeno sintase. (Adaptado de EMILIANI et al., 2009) .....	5
FIGURA 1.3 - Modelos biossintéticos para a formação de Csyrona B1 e ácido 3,5-Dihidroxibenzóico formados via enzimas CsyB e CsyA respectivamente (Adaptado de SESHIME et al., 2010).....	10
FIGURA 1.4 - Estrutura molecular dilactona do ácido diidrocafeico. ....	12
FIGURA 1.5 - Estrutura molecular da 2,5-difenilbenzoquinona, um pigmento fúngico.....	12
FIGURA 1.6 - Estruturas químicas das brasilamidas A a F. ....	21
FIGURA 3.1 - Protocolo 1 para obtenção de extrato enzimático. ....	39
FIGURA 4.1 - Aminoação redutiva e isomerização da fenilalanina levando a produção dos precursores 1-aril-3-amino-2-propanona. Os carbonos enriquecidos são assinalados no esquema (Extraído de FILL et al., 2010).....	69
FIGURA 4.2 - Acoplamento de duas unidades 1-aril-3-amino-2-propanonas (Extraído de FILL et al., 2010). ....	69
FIGURA 4.3 - Curva de calibração para a substância brasilamida A. ....	71
FIGURA 4.4 - Cromatograma de íons totais referentes aos experimentos de SRM da substância brasilamida A (A) menor concentração estudada (B) maior concentração testada para construção da curva.....	71
FIGURA 4.5 - Ensaio de inibição do crescimento do fungo <i>P. brasilianum</i> frente ao ácido cinâmico na concentração de 500 µg.mL <sup>-1</sup> . O experimento controle é visualizado acima. ....	76
FIGURA 4.6 - Ensaio de inibição do crescimento do fungo <i>P. brasilianum</i> frente ao ácido cinâmico na concentração de 250 µg.mL <sup>-1</sup> . O experimento controle é visualizado acima. ....	76
FIGURA 4.7 - Ensaio de inibição do crescimento do fungo <i>P. brasilianum</i> frente ao ácido cinâmico (100 µg.mL <sup>-1</sup> ). O experimento controle é visualizado acima. ....	77

FIGURA 4.8 - Ensaio de inibição do ácido 4-metoxicinâmico frente ao fungo <i>P. brasilianum</i> na concentração de 500 µg.mL <sup>-1</sup> . O experimento controle é visualizado acima. ....	79
FIGURA 4.9 - Ensaio de inibição do ácido 4-metoxicinâmico frente ao fungo <i>P. brasilianum</i> na concentração de 250 µg.mL <sup>-1</sup> . O experimento controle é visualizado acima. ....	80
FIGURA 4.10 - Ensaio de inibição do ácido 4-metoxicinâmico frente ao fungo <i>P. brasilianum</i> na concentração de 100 µg.mL <sup>-1</sup> . O experimento controle é visualizado acima. ....	80
FIGURA 4.11 - Ensaio de inibição do ácido 3,4-metoxipiperonilcinâmico frente ao fungo <i>P. brasilianum</i> na concentração de 500 µg.mL <sup>-1</sup> . O controle é comparado acima.....	80
FIGURA 4.12 - Ensaio de inibição do ácido 3,4-metoxipiperonilcinâmico frente ao fungo <i>P. brasilianum</i> na concentração de 500 µg.mL <sup>-1</sup> . O controle é comparado acima.....	80
FIGURA 4.13 - Espectro de íons produtos obtido no modo negativo de ionização para o ácido cinâmico padrão. ....	83
FIGURA 4.14 - Espectro de ions produtos de <i>m/z</i> 147 referente ao protocolo 3 nos 30 min de reação.....	84
FIGURA 4.15 - Cromatogramas referentes aos experimentos 1 e 2 descritos na tabela 4.5. ....	87
FIGURA 4.16 - Cromatogramas referentes aos experimentos 3 e 4 descritos na tabela 4.5. ....	87
FIGURA 4.17 - Cromatogramas referentes aos experimentos 5 e 6 descritos na tabela 4.5. ....	87
FIGURA 4.18 - Cromatogramas referentes aos experimentos 7 e 8 descritos na tabela 4.5. ....	88
FIGURA 4.19 - Cromatogramas referentes aos experimentos 9 e 10 descritos na tabela 4.5. ....	88
FIGURA 4.20 - Cromatogramas referentes aos experimentos 11 e 12 descritos na tabela 4.8.....	88
FIGURA 4.21 - Gel de poliacrilamida SDS monodimensional dos extratos enzimáticos.....	89
FIGURA 4.22 - Cromatograma referente à reação enzimática com o precipitado 1 (25% saturação).....	91
FIGURA 4.23 - Cromatograma referente à reação enzimática com o precipitado 2 (55% saturação).....	91

FIGURA 4.24 - Cromatograma referente a reação enzimática com o precipitado 3 (85% saturação).....	91
FIGURA 4.25 - Cromatogramas obtidos para as reações enzimáticas com os extratos brutos obtidos do cultivo do fungo na ausência (A) e presença de Phe (B) respectivamente.....	93
FIGURA 4.26 - Gráfico tridimensional onde se visualiza as condições ótimas de temperatura e pH para a reação enzimática com a enzima PAL.....	97
FIGURA 4.27 - Gráfico tridimensional onde se visualiza as condições ótimas de temperatura e pH para a reação enzimática com a enzima PAL, agora visto de cima. Em preto observam-se os parâmetros ótimos avaliados no experimento.	98
FIGURA 4.28 - Gráfico indicando o tempo de incubação ótimo da reação enzimática com o extrato bruto proteico de <i>P. brasilianum</i> . .....	99
FIGURA 4.29 - Cromatograma obtido para a cromatografia de troca iônica realizada para o extrato das células de <i>P. brasilianum</i> . No eixo x o tempo de corrida e no eixo y a absorvância medida. Em vermelho, as frações ativas com relação à enzima PAL.....	101
FIGURA 4.30 - Cromatograma referente a etapa de cromatografia de interação hidrofóbica realizada para o extrato das células de <i>P. brasilianum</i> . No eixo x o tempo de corrida e no eixo y a absorvância medida. Em vermelho, as frações ativas com relação à enzima PAL. ....	102
FIGURA 4.31 - Gel de poliacrilamida SDS-PAGE das etapas do protocolo de purificação 1.....	103
FIGURA 4.32 - Cromatograma obtido na etapa de cromatografia por exclusão molecular. No eixo x o tempo de corrida e no eixo y a absorvância medida. Em vermelho, as frações ativas com relação à enzima PAL. ....	104
FIGURA 4.33 - Cromatograma obtido na etapa de cromatografia por troca iônica. No eixo x o tempo de corrida e no eixo y a absorvância medida. Em vermelho, as frações ativas com relação à enzima PAL.....	105
FIGURA 4.34 - Gel de poliacrilamida SDS-PAGE das etapas do protocolo de purificação 2.....	105
FIGURA 4.35 - Busca por similaridade na base de dados NCBI.....	107
FIGURA 4.36 - Similaridade entre as enzimas glutamato desidrogenase produzidas por <i>P. marneffe</i> (preto) e <i>P. brasilianum</i> (vermelho).....	107
FIGURA 4.37 - Espectro de massas do produto obtido a partir da reação enzimática da PAL com o 4-bromo-fenilalanina como substrato.....	109
FIGURA 4.38 - Espectro de MS/MS do produto formado a partir da reação enzimática da PAL com o 4-bromo-fenilalanina como substrato.....	110



FIGURA 4.39 - Reação enzimática da enzima PAL com os substratos halogenados testados no experimento proposto.....	110
FIGURA 4.40 - Espectro de massas do produto obtido a partir da reação enzimática da PAL com o 4-cloro-fenilalanina como substrato.....	111
FIGURA 4.41 - Espectro de MS/MS do produto formado a partir da reação enzimática da PAL com o 4-cloro-fenilalanina como substrato.....	112
FIGURA 4.42 - Formação do ácido p-cumárico por duas vias metabólicas diferentes, pela ação das enzimas PAL e da TAL.....	113
FIGURA 4.43 - Cromatograma de íons selecionados de $m/z$ 163, correspondente a formação do ácido p-cumárico, assinalado em verde e espectro de MS/MS do ácido p-cumárico, respectivamente.....	114
FIGURA 4.44 -Cromatogramas referentes ao controle (A) e cromatograma referente ao cultivo com adição de 4-bromo-fenilalanina (B); com a adição de 4-cloro-fenilalanina (C). .....	117
FIGURA 4.45 - Espectro de massas obtido para a banda em 16 minutos (A); Espectro de massas obtido para a banda em 14 minutos (B).....	118
FIGURA 4.46 - Espectro de íons produtos para o produto de biotransformação do 4-bromo-fenilalanina.....	119
FIGURA 4.47 - Espectro de íons produtos para o composto N-acetilado produzido a partir do padrão 4-cloro-fenilalanina. ....	120
FIGURA 4.48 - Estrutura molecular proposta para os produtos formados. ....	120
FIGURA 4.49 - Mecanismo de fragmentação proposto para as molécula acetiladas formadas. ....	121
FIGURA 4.50 - Espectro de massas obtido para o produto do fungo (A) e espectro gerado no software do equipamento para a fórmula molecular $C_{11}H_{11}NO_3Br$ (B).....	123
FIGURA 4.51 - Espectro de massas do produto N-acetilado produzido (A) e espectro gerado no software do equipamento para $C_{11}H_{11}NO_3Cl$ (B). ....	123
FIGURA 4.52 - Cromatograma obtido para as análises em HPLC preparativo referente ao cultivo do fungo <i>P. brasilianum</i> com a adição de 4-bromo-fenilalanina. ....	124
FIGURA 4.53 - Cromatograma obtido para as análises em HPLC preparativo referente ao cultivo do fungo <i>P. brasilianum</i> com a adição de 4-cloro-fenilalanina. ....	125
FIGURA 4.54 - Confôrmeros rotacionais da brasiliamida B. ....	126
FIGURA 4.55 - Rotâmeros encontrados em solução para a substância 4-bromo-fenilalanina N-acetilada.....	126

FIGURA 4.56 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H do produto 4-bromo-fenilalanina- <i>N</i> -acetilado (CDCl <sub>3</sub> -400 MHz).....	127
FIGURA 4.57 - Confôrmeros rotacionais para a molécula de 4-cloro-fenilalanina- <i>N</i> -acetilada. ....	128
FIGURA 4.58 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H do produto 4-cloro-fenilalanina- <i>N</i> -acetilado (CDCl <sub>3</sub> 400 MHz). ....	129
FIGURA 4.59 - Cultivo do fungo <i>P. brasilianum</i> em meio líquido suplementado com 4-fluor-fenilalanina.....	130
FIGURA 4.60 - Cromatograma obtido para o extrato referente ao cultivo do fungo com a adição de 4-fluor-fenilalanina. ....	131
FIGURA 4.61 - Espectro de íons produtos para a substância 4-fluor-fenilalanina- <i>N</i> -acetilada. ....	132
FIGURA 4.62 - Estruturas moleculares das brasiliamidas A-F. Em vermelho as <i>N</i> -acetilações apresentadas pelas moléculas. ....	133
FIGURA 4.63 - Cromatograma de íons extraídos de <i>m/z</i> 439 obtido a partir das análises do controle (A) e do fungo cultivado na presença de CuCl <sub>2</sub> (B).....	136
FIGURA 4.64 - Alinhamento das sequências de proteínas putativas PAL de organismos similares à <i>P. brasilianum</i> . As duas primeiras sequencias são homólogas de PAL do fungo <i>P.marneffeii</i> , a terceira sequencia é referente a proteína PAL de <i>P. chrysogenum</i> .....	139
FIGURA 4.65 - Combinações de oligonucleotideos degenerados utilizados nas reações de PCR, assim como resultados obtidos a partir das reações 4,5 e 6 respectivamente.....	140
FIGURA 4.66 - Resultado do <i>blast</i> do fragmento de PCR obtido no estudo mostrando a amplificação de parte do gene que codifica a PAL. ....	141
FIGURA 4.67 - Resultado das análises no site de <i>blast</i> interno contendo o genoma de <i>P. brasilianum</i> em comparação ao amplicom obtido anteriormente (fragmento do gene PAL). Abaixo, a sequencia de aminoácidos da enzima PAL de <i>P. brasilianum</i> . ....	143
FIGURA 4.68 - Eletroferograma do RNA total extraído de <i>P. brasilianum</i> ....	145
FIGURA 4.69 - Gel de agarose 1% das reações de RT-PCR em comparação à reação de PCR com o DNA genômico. Marcador 1Kb plus (Fermentas).....	146
FIGURA 4.70 - Gel de SDS-PAGE do processo de purificação dos extratos da expressão nas cepas C41 e BL21(DE3) de <i>E.coli</i> respectivamente. Os números indicam: 1- Total; 2-Eluato; 3-Eluato 1; 4-40 mM; 5- 80 mM; 6-100 mM; 7-150 mM; 8-200 mM; 9- 250 mM; 10- 500 mM; 11-precipitado. ....	148
FIGURA 4.71 - Gel de SDS-PAGE do processo de purificação dos extratos da expressão na cepas BL21(DE3) de <i>E.coli</i> a 15°C. Os números indicam: 1- Total;	

2-Eluato; 3-Eluato 1; 4-40 mM; 5- 80 mM; 6-100 mM; 7-150 mM; 8-200 mM; 9- 250 mM; 10- 500 mM; 11-precipitado. ....	149
FIGURA 4.72 - Gel de SDS-PAGE do processo de purificação do extrato da expressão na cepa BL21(DE3) de <i>E.coli</i> a 15°C. Os números indicam: 1- Total; 2-Eluato; 3-Eluato 1; 4-40 mM; 5- 80 mM; 6-100 mM; 7-150 mM; 8-200 mM; 9- 250 mM; 10- 500 mM; 11-precipitado. ....	150
FIGURA 4.73 - Cromatograma e espectro obtido por deconvolução da proteína PAL recombinante isolada, respectivamente. ....	151
FIGURA 4.74 - Cromatograma obtido a partir de análises da proteína PAL recombinante por filtração em gel.....	153
FIGURA - 4.75- Mapa do vetor pET24(+). ....	154
FIGURA 4.76 - Análises por LC-MS das reações enzimáticas obtidas a partir da expressão das diferentes construções obtidas (A) Reação enzimática utilizando o extrato bruto obtido a partir da expressão da construção com SUMO e poli-his N-terminal da enzima PAL recombinante, (B) Reação enzimática utilizando o extrato bruto obtido a partir da expressão da construção com poli-his C-terminal da enzima PAL recombinante, (C) Reação enzimática utilizando o extrato bruto obtido a partir da expressão da construção com a enzima PAL recombinante sem fusão, (D) Reação enzimática utilizando o extrato bruto proteico obtido a partir das células de <i>P. brasilianum</i> , (E) Ácido cinâmico padrão e (F) Reação controle. ....	156
FIGURA 4.77 - Mecanismo de ação da enzima PAL (Extraído de POPPE & RETEY, 2005).....	158
FIGURA 4.78 - Gel de SDS-PAGE obtido a partir da purificação da enzima PAL recombinante com gradiente de pH. ....	161
FIGURA 4.79 - Gráfico do pH e tempo de incubação ótimos da enzima PAL recombinante. ....	163
FIGURA 4.80 - Gráfico da temperatura ótima da enzima PAL recombinante. ....	164
FIGURA 4.81 - Curva de calibração obtida para o ácido cinâmico. ....	165
FIGURA 4.82 - Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima. ....	166
FIGURA 4.83 - Equação de Michaelis-Menten.....	167
FIGURA 4.84 - Gráfico dos duplos recíprocos ou Lineweaver-Burke para a enzima PAL recombinante. ....	167
FIGURA 4.85 - Distribuição dos <i>hits</i> gerados através de análises de <i>tblastn</i> da enzima cinamato 4-hidroxilase de <i>Arabidopsis thaliana</i> contra o genoma de <i>Penicillium brasilianum</i> . ....	168

FIGURA 4.86 - Distribuição dos hits gerados através de análises de <i>tblastn</i> da enzima ácido p-cumárico-CoA ligase (4CL) de <i>Aspergillus oryzae</i> contra o genoma de <i>Penicillium brasilianum</i> .....	169
FIGURA 4.87 - TIC obtido para o ácido cinâmico após otimização das condições cromatográficas. ....	170
FIGURA 4.88 - TIC obtido para a análise do extrato da reação enzimática com as células do fungo <i>P. brasilianum</i> acima e abaixo visualiza-se o cromatograma referente ao controle. ....	171
FIGURA 4.89 - TIC obtidos para as análises dos extratos das reações enzimáticas com as células do fungo <i>Xyllaria sp.</i> e <i>P. citrinum</i> , respectivamente. ....	171
FIGURA 4.90 - TIC obtidos para as análises dos extratos das reações enzimáticas com as células do fungo <i>P. herquei.</i> e <i>P. simplissimum</i> respectivamente. ....	172
FIGURA 4.91 - TIC obtidos para as análises dos extratos das reações enzimáticas com as células do fungo <i>P.chrysogenum.</i> e <i>Penicillium sp.</i> (LaBioMMi 222), respectivamente. ....	172
FIGURA 4.92 - TIC obtidos para as análises dos extratos das reações enzimáticas com as células do fungo <i>Penicillium sp.</i> (LaBioMMi 223) e <i>A. flavus</i> , respectivamente. ....	172
FIGURA 4.93 - TIC obtido para a análise do extrato da reação enzimática com as células do fungo <i>A. aculeatus.</i> ....	173
FIGURA 4.94 - Formação dos precursores das brasiliamidas.....	174
FIGURA 4.95 - Cromatograma de íons extraídos dos intermediários biossintéticos (A) ácido cinâmico, (B) ácido p-cumárico, (C) ácido cafeico, (D) ácido ferúlico e (E) ácido sináptico.....	176
FIGURA 4.96 - Espectro de íons produtos do íon com relação <i>m/z</i> 163.....	177
FIGURA 4.97 - Espectro de íons produtos do íon com relação <i>m/z</i> 179.....	177
FIGURA 4.98 - Espectro de íons produtos do íon com relação <i>m/z</i> 193.....	178
FIGURA 4.99 - Espectro de íons produtos do íon com relação <i>m/z</i> 222.....	178
FIGURA 4.100 - Espectro de massas do ácido cinâmico padrão e ácido cinâmico formado a partir da reação das células de <i>P. brasilianum</i> com [2- <sup>13</sup> C]-Phe em tampão, respectivamente. ....	179
FIGURA 4.101 - Espectro de massas do ácido p-cumárico produzido no experimento controle (células+ Phe) e ácido p-cumárico formado a partir da reação das células de <i>P. brasilianum</i> com [2- <sup>13</sup> C]-Phe em tampão, respectivamente.....	179

FIGURA 4.102 - Espectro de massas do ácido sináptico produzido no experimento controle (células+ Phe) e ácido p-cumárico formado a partir da reação das células de <i>P. brasilianum</i> com [2- <sup>13</sup> C]-Phe em tampão, respectivamente.....	180
FIGURA 4.103 - Cromatogramas referentes ao padrão de ácido cinâmico e a reação enzimática com o extrato enzimático obtido das folhas de <i>Melia azedarach</i> . .....	181
FIGURA 4.104 - Exemplo de fenilpropanóides produzidos pela planta como defesa dos estresses bióticos e abióticos mencionados (Adaptado de DIXON & PAIVA, 1995). .....	182
FIGURA 4.105 - Gráfico que indica a produção da substância brasiliamida A (área da banda cromatográfica/ halo de crescimento) quando o fungo foi submetido a fatores de estresse. ....	184
FIGURA 4.106 - Grafico indicando a distribuição dos resultados de <i>blastp</i> . ..	187
FIGURA 4.107- Gráfico indica o comprimento médio das sequencias com similaridade nas análises de <i>blastp</i> .....	187
FIGURA 4.108 - Distribuição de similaridade nas sequencias nas análises de <i>blastp</i> . .....	188
FIGURA 4.109 - Distribuição das espécies nos hits encontrados nas análises de <i>blastp</i> . .....	188
FIGURA 4.110 - Distribuição dos dados obtidos nas análises de <i>blastp</i> e anotação do genoma. ....	189
FIGURA 4.111 - Gráfico de distribuição das funções moleculares encontradas nas análises. ....	189
FIGURA 4.112 - Cluster biossintético putativo de alcalóides do tipo ergot dado pelo software antismash. ....	191
FIGURA 4.113 - Cluster biossintético putativo de viridicatumtoxina dado pelo software antismash. ....	192
FIGURA 4.114 - Estruturas químicas dos compostos espirohexalina e viridicatumtoxina (Extraído de INOKOSHI et. al, 2013).....	193
FIGURA 4.115 - Espectro de massas HRMS obtido para a substância viridicatumtoxina produzida pelo fungo <i>P. brasilianum</i> estudado no trabalho.	194

## Resumo

O projeto "Estudos metabólicos, enzimáticos e genéticos do fungo endofítico *P. brasilianum*" tratou de investigações biossintéticas das amidas bis-fenilpropanoídicas, as brasiliamidas, confirmando a origem fenilpropanoídica destas substâncias, muito incomum em fungos. A atividade da enzima Fenilalanina amônia-liase, primeira da rota biossintética, foi avaliada pela primeira vez no fungo em estudo, e as condições da produção de PAL por *P. brasilianum* foram otimizadas (meio de cultivo e indução ao adicionar fenilalanina ao cultivo), assim como as condições de incubação da reação enzimática. A especificidade da enzima foi determinada a qual se apresentou altamente promíscua em todos os substratos testados, inclusive atuando como TAL (tirosina amônia-liase). *In vivo*, a adição de diferentes precursores ao meio de cultivo levou a N-acetilação destes confirmado por dados espectroscópicos. O genoma do fungo *P. brasilianum* foi sequenciado, e através de extensos estudos de bioinformática pode-se determinar o gene que codifica a enzima PAL. A partir de estudos de biologia molecular foi possível clonar e expressar a enzima PAL recombinante fusionada a uma proteína SUMO e uma cauda poli-his no N-terminal da proteína em vetor pETSUMO expresso em *E. coli* BL21(DE3) obtendo-se, dessa maneira, as melhores condições para superexpressão enzimática na forma solúvel. O processo de purificação da enzima recombinante foi estudado a partir de um único passo de purificação (coluna de afinidade) por gradiente de pH, obtendo alto grau de pureza comprovado através de eletroforese monodimensional. A enzima PAL recombinante pura obtida foi caracterizada por MS e bioquimicamente obtendo-se valores de  $K_m$  de 4,8 mM. Estudos parecem deixar claro que exista uma relação entre a produção de brasiliamida A quando o fungo é submetido a situações de estresse, seguindo mesmo comportamento relatado em plantas e, portanto, a enzima PAL parece estar envolvida em mecanismos de defesa neste fungo.

## Abstract

The project "Metabolic, enzymatic and genetic studies of the endophytic fungus *P. brasilianum*" resulted in biosynthetic studies of bis-phenylpropanoid amides, the brasilimides, confirming the origin of these substances via phenylpropanoid biosynthesis pathway, very unusual in fungi. PAL activity, the first enzyme involved in this biosynthetic route was successfully evaluated and the conditions of PAL production by *P. brasilianum* were optimized (culture medium and induction of PAL adding Phe to the culture), and the incubation conditions of the enzymatic reaction. The specificity of the PAL enzyme was studied, and the enzyme showed activity toward all substrates tested, including acting as TAL (tyrosine ammonia lyase). In vivo studies through the addition of different substrates lead to N-acetylation confirmed by spectroscopy data. The genome of the fungus *P. brasilianum* was sequenced, and extensive studies through bioinformatics lead to the gene encoding PAL enzyme. From molecular biology studies, the enzyme was cloned and expressed as recombinant PAL fused to a SUMO protein and a his-tag at the N- terminus of the protein in pETSUMO vector expressed in *E. coli* BL21 (DE3) to obtain the best conditions for enzyme overexpression in its soluble form. The purification process of the recombinant enzyme was studied from a single purification step (affinity chromatography) by pH gradient elution, obtaining a high degree of purity confirmed by one-dimensional electrophoresis. The pure recombinant PAL enzyme obtained was characterized by MS and biochemically yielding Km values of 4,8 mM. Recent studies seem to point out that there is a relationship between the production of brasiliamides when the fungus is subjected to stress conditions. The PAL enzyme appears to be involved in defense mechanisms in this fungus, as has been described for plants.

## Sumário

1	- Introdução .....	1
1.1	- Micro-organismos endofíticos e seu potencial metabólico.....	1
1.2	- Biossíntese de fenilpropanóides em fungos .....	4
1.3	- A enzima PAL .....	13
1.4	- As amidas bis-fenilpropanoídicas e sua potencialidade como fármacos 19	
2	- Objetivos .....	23
3	- Materiais e Métodos .....	25
3.1	- Materiais .....	25
3.2	- Oligonucleotídeos.....	29
3.3	- Materiais Cromatográficos .....	30
3.4	- Parte experimental.....	30
3.4.1	- Cultivo do fungo <i>P. brasilianum</i> isolado de <i>Melia azedarach</i> .....	30
3.4.2	- Cultivo do micro-organismo <i>P. brasilianum</i> em meio líquido suplementado com L-fenilalanina.....	31
3.4.3	- Estimativa da produção de brasiliamidas pelo fungo <i>P. brasilianum</i> cultivado em diferentes meios de cultura .....	32
3.4.4	- Análises por HPLC/UV-MS e HPLC/UV-MS/MS dos experimentos relacionados à biossíntese das Brasiliamidas .....	33
3.4.5	- Cultivo do fungo <i>P. brasilianum</i> em meio líquido suplementado com ácido cinâmico .....	35
3.4.6	- Cultivo do fungo <i>P. brasilianum</i> em meio líquido enriquecido com d <sub>7</sub> -ácido cinâmico.....	35
3.4.7	- Ensaio de inibição do fungo <i>P. brasilianum</i> frente ao ácido cinâmico .....	35
3.4.8	- Ensaio de inibição de crescimento do fungo <i>P. brasilianum</i> frente a diferentes cinamatos.....	36
3.4.9	- Avaliação da atividade da enzima Fenilalanina amônia-liase (PAL) produzida pelo fungo <i>P. brasilianum</i> .....	36
3.4.10	- Protocolo para obtenção do extrato enzimático de <i>P. brasilianum</i>	38



3.4.11 - Ensaio enzimático para detecção da atividade da enzima PAL .	40
3.4.12 - Protocolo para fracionamento do extrato enzimático de <i>P. brasilianum</i> através de precipitação fracionada com (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	42
3.4.13 - Ensaio enzimático quantitativo com a enzima Fenilalanina amônia-liase .....	43
3.4.14 - Cultivo do fungo <i>P. brasilianum</i> em diferentes meios de cultivo visando a otimização da produção da enzima PAL .....	44
3.4.15 - Otimização das condições de incubação da reação enzimática de PAL	45
3.4.16 - Purificação da enzima PAL produzida pelo fungo <i>P. brasilianum</i>	45
3.4.17 - Digestão da enzima purificada com tripsina e identificação por espectrometria de massas .....	47
3.4.18 - Avaliação da especificidade da enzima PAL frente à administração de diferentes substratos .....	48
3.4.19 - Cultivo do fungo <i>P. brasilianum</i> em meio líquido suplementado com aminoácidos halogenados .....	48
3.4.20 - Análises por HPLC/UV-MS dos extratos referentes ao cultivo do fungo <i>P. brasilianum</i> em meio líquido suplementado com aminoácidos halogenados.....	49
3.4.21 - Avaliação de sais inorgânicos na busca de inibidores enzimáticos da atividade da enzima PAL .....	50
3.4.22 - Estudo da adição de inibidores enzimáticos <i>in vivo</i> .....	51
3.4.23 - Extração de DNA genômico de hifas de <i>P. brasilianum</i> .....	51
3.4.24 - Amplificação de parte do gene PAL utilizando <i>primers</i> degenerados.....	52
3.4.25 - Sequenciamento dos amplicons .....	53
3.4.26 - Sequenciamento do genoma do fungo <i>P. brasilianum</i> .....	54
3.4.27 - Extração de RNA totais.....	54
3.4.28 - Estimativa da quantidade e qualidade dos RNAs totais .....	55
3.4.29 - Construção do cDNA.....	55
3.4.30 - Ligação do gene da PAL nos vetores de expressão pET28a(+); pET24 e pETSUMO.....	57

3.4.31	- Expressão e purificação da PAL em <i>E. coli</i> utilizando células da linhagem BL21 (DE3) e C41 .....	58
3.4.32	- Cromatografia por exclusão molecular .....	60
3.4.33	- Purificação alternativa da enzima PAL sem imidazol .....	60
3.4.34	- Otimização das condições de incubação da reação enzimática .....	61
3.4.35	- Estudos de cinética enzimática .....	61
3.4.36	- Avaliação da atividade da enzima PAL produzida por diferentes espécies de fungos .....	62
3.4.37	- Adição de [2- <sup>13</sup> C] L-fenilalanina as células de <i>P. brasilianum</i> visando o estudo dos intermediários biossintéticos das brasiliamidas .....	63
3.4.38	- Análises por HRMS dos experimentos relacionados à biossíntese das brasiliamidas .....	64
3.4.39	- Avaliação da produção de brasiliamidas quando o fungo <i>P. brasilianum</i> é submetido à fatores de estresse .....	64
3.4.40	- Avaliação da enzima Fenilalanina amônia-liase nas folhas de <i>Melia azedarach</i> .....	65
4	- Resultados e Discussão .....	67
4.1	- Estudo da incorporação de precursores biossintéticos no metabolismo das brasiliamidas .....	67
4.2	- Estudos da enzima Fenilalanina amônia-liase (PAL) produzida pelo fungo <i>P. brasilianum</i> .....	82
4.3	Obtenção do enzima PAL recombinante .....	136
4.4	- Avaliação da atividade da enzima PAL produzida por diferentes espécies de fungos .....	169
4.5	- Estudo dos precursores da biossíntese das brasiliamidas .....	173
4.6	- Estudo da produção de brasiliamidas sob a influência de fatores de estresse .....	182
4.7	- Análises do genoma do fungo <i>P. brasilianum</i> .....	185
5	- Conclusões .....	195

# 1 - Introdução

## 1.1 - Micro-organismos endofíticos e seu potencial metabólico

Atualmente, o estudo de micro-organismos endofíticos tem atraído à atenção de muitos pesquisadores, e vem aumentando expressivamente nos últimos anos, principalmente, visando o entendimento das relações e associações biológicas a qual estes desenvolvem com seus hospedeiros (STROBEL, 2002). O termo endofítico, segundo definição recente (STONE et al., 2000), inclui todos os micro-organismos que durante um período variável do seu ciclo de vida, colonizam os tecidos internos de seus hospedeiros assintomaticamente (ZHANG et al., 2006). Os micro-organismos endofíticos são isolados dos tecidos internos do hospedeiro após esterilização da superfície dos mesmos, seguido de incubação sobre uma variedade de meios para estimular o crescimento destes micro-organismos (PETRINI et al., 1992).

Micro-organismos endofíticos representam um significativo reservatório de diversidade genética e uma fonte importante para a descoberta de novos metabólitos secundários bioativos. Inúmeros e importantes metabólitos descritos na literatura são produzidos por estes organismos. Entre estes, destacam-se agentes anticancerígenos, imunossupressivos, antiparasitários, antibióticos, entre outros (GUNATILAKA, 2006). O interesse crescente nos produtos naturais produzidos por fungos endofíticos é evidente através do número de artigos e revisões na literatura recente (ZHANG et al., 2006; GUO et al., 2008).

Até recentemente, a busca por novos metabólitos de origem fúngica se concentrava principalmente na triagem aleatória dos micro-organismos isolados. Entretanto, atualmente, consideram-se relevantes as interações metabólicas entre o fungo e o meio ambiente. É relatado que as interações entre fungos e seus hospedeiros resultam no aumento da produção dos metabólitos

secundários sintetizados por estes micro-organismos. Dessa maneira, os fungos endofíticos são uma fonte importante para a descoberta de novos metabólitos secundários bioativos, uma vez que crescem nos tecidos internos de plantas e seu crescimento envolve contínua interação metabólica entre os organismos. Este é um exemplo de triagem inteligente e uma estratégia para a exploração do potencial de produção de metabólitos secundários bioativos que um fungo pode oferecer (SCHULZ et al., 2002).

Entre as características dos fungos filamentosos, a biossíntese dos produtos naturais tem despertado grande interesse na comunidade científica. Devido às propriedades bioativas destes compostos, pesquisadores estão unindo esforços para identificar os genes biossintéticos e os mecanismos regulatórios envolvidos em suas vias metabólicas. A contínua evolução nas técnicas de sequenciamento de DNA assim como o avanço nos estudos relacionados a bioinformática e o crescimento das bases de dados tem proporcionado o maior entendimento da genômica dos micro-organismos e oferecendo alternativas promissoras para descoberta e engenharia de novos compostos bioativos (HERTWECK & SCHERLACH, 2009; LEADLAY & WEISSMAN, 2005).

O crescimento exponencial nas últimas duas décadas relacionado aos estudos de clonagem, expressão gênica e caracterização da maquinaria biossintética de determinados produtos naturais microbianos, tem revelado conhecimentos moleculares sem precedentes na biossíntese de produtos naturais, incluindo a observação de que os genes para a biossíntese da maioria dos produtos naturais estão agrupados no genoma microbiano na forma de cluster de genes (HERTWECK & SCHERLACH, 2009). Tal descoberta vem facilitando o estudo biossintético de metabólitos de interesse, assim como sua manipulação, e mudou fundamentalmente a pesquisa de produtos naturais, permitindo o estudo de clusters biossintéticos de estruturas conhecidas e reportadas de metabólitos secundários, a previsão de novos compostos ainda-a-serem isolados com base em seqüências de genes, e a geração sistemática de produtos naturais "não

naturais" por manipular os genes que regulam suas biossínteses (também conhecido como biossíntese combinatória) (LEADLAY & WEISSMAN, 2005). Os avanços na síntese de DNA e biologia sintética também vão possibilitar a reconstrução de rotas metabólicas envolvidas na biossíntese de produtos naturais, assim como a engenharia e expressão de compostos de interesse em organismos modelos para superprodução em escala industrial. Os avanços nas tecnologias para o isolamento, métodos analíticos, e gerenciamento de banco de dados também vão facilitar muito a descoberta e a construção de bibliotecas de produtos naturais de interesse (HERTWECK & SCHERLACH, 2009). Finalmente, as preocupações ambientais irão favorecer ainda mais os produtos naturais microbianos a partir do desenvolvimento de processos de base biológica, ou seja, a fermentação, engenharia metabólica e recursos renováveis.

Estudos recentes do genoma de micro-organismos revelaram que o potencial biossintético destes organismos é muito inexplorado. De fato, o número de genes que codificam a produção de enzimas responsáveis pela biossíntese de metabólitos secundários é muito maior do que a produção destes metabólitos pelos micro-organismos estudados. Uma razão para esta observação é que apenas alguns genes responsáveis pela biossíntese de produtos naturais sejam expressos sob as condições de cultivo laboratoriais. Dessa maneira, apenas um pequeno potencial de estruturas químicas é produzido. Neste sentido, para obter acesso a este reservatório de metabólitos secundários potencialmente bioativos, a biossíntese precisa ser induzida e, portanto, deve-se realizar uma investigação sistemática do metaboloma do micro-organismo em estudo (HERTWECK & SCHERLACH, 2009).

Enfim, os fungos filamentosos são utilizados como fontes de importantes metabólitos secundários que encontram amplo uso na agricultura, indústria, medicina e nutrição. Entretanto, pouco se sabe sobre a genética, arquitetura e papel fisiológico destes metabólitos, apesar do fato de que alguns fungos têm sido explorados industrialmente ao longo de várias décadas. Entre as

vias metabólicas de metabólitos secundários caracterizadas e bem-estabelecidas em fungos está a rota biossintética da aflatoxina em *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, e inclui ativadores da transcrição e genes codificando enzimas PKS do tipo I que estão arranjadas no genoma em forma de cluster de genes (YU et al., 2004).

## 1.2 - Biossíntese de fenilpropanóides em fungos

Os aminoácidos L-fenilalanina e L-tirosina como blocos construtores  $C_6C_3$  são precursores de grande número de produtos naturais, com importantes atividades biológicas associadas. Entre estes podemos citar ácidos cinâmicos e derivados, cumarinas, lignanas e flavonóides. O esqueleto básico dos fenilpropanóides, assim como alguns exemplos de estruturas de metabólitos fenilpropanoídicos e sua ocorrência em plantas são apresentados na figura 1.1 abaixo.

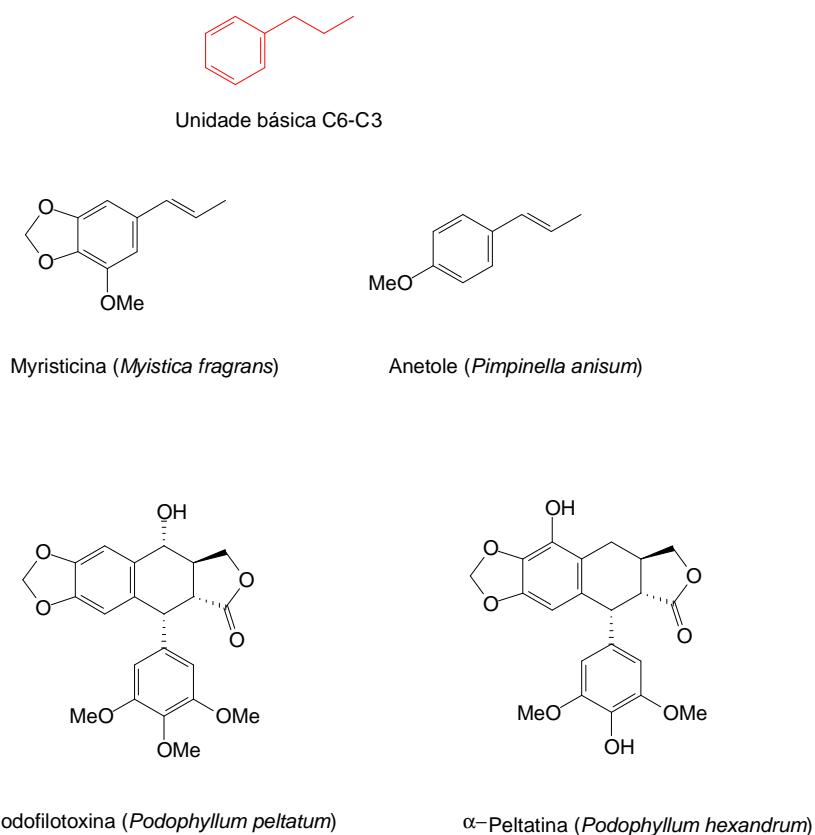


FIGURA 1.1 - Unidade básica  $C_6C_3$  dos fenilpropanóides e alguns exemplos destes produzidos por plantas.

Três etapas constituintes da rota biossintética geral para a formação dos fenilpropanóides fornecem os principais precursores para a produção de flavonóides e ligninas (Figura 1.2). No primeiro passo, a enzima Fenilalanina amônia-liase (PAL) é responsável pela transformação do aminoácido L-fenilalanina em ácido cinâmico, seguida da formação do ácido p-cumárico pela ação da enzima cinamato 4-hidroxilase (C4H), que é, então, transformado em p-coumaroil-CoA pela enzima ácido p-cumárico - CoA ligase (4CL), (Figura 1.2). Ambos os compostos ácido p-cumárico e p-coumaroil-CoA podem atuar na formação de ligninas, enquanto que o p-coumaroil-CoA é o precursor da via metabólica dos flavonóides (Figura 1.2).

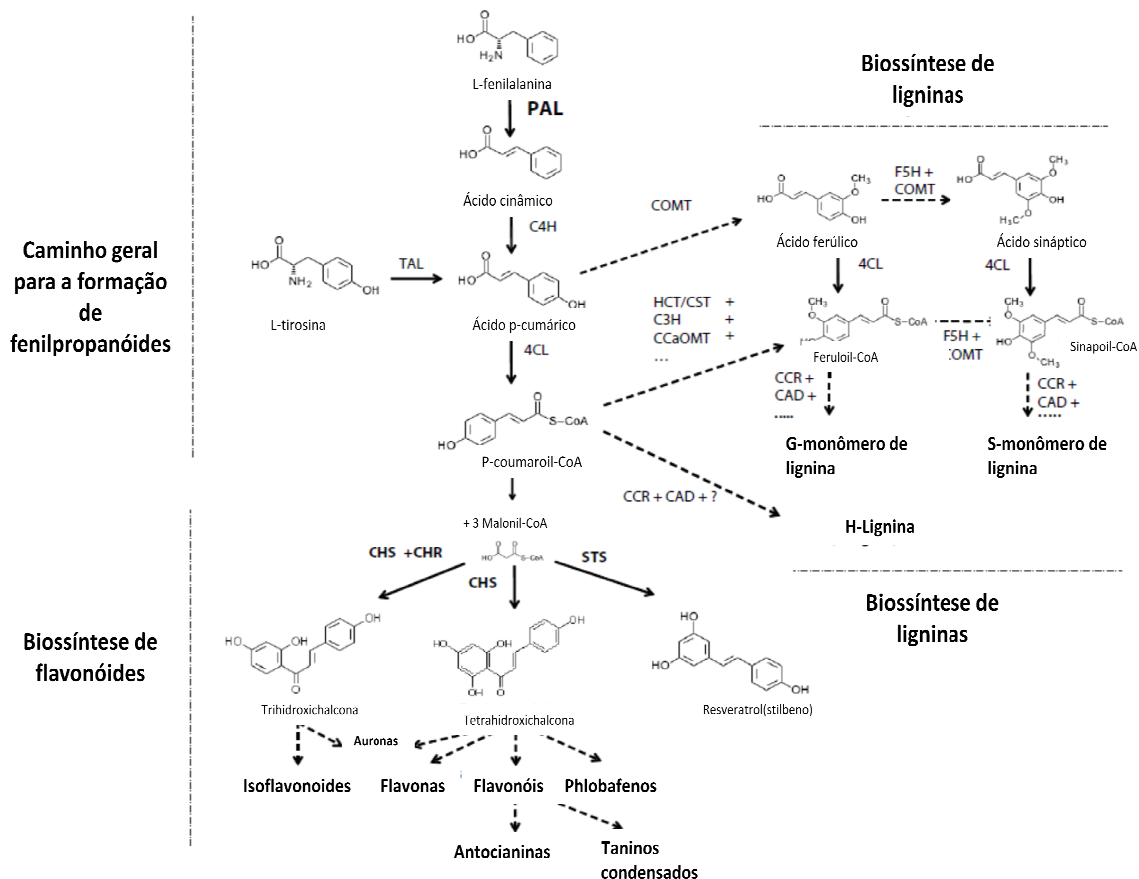


FIGURA 1.2 - Rota biossintética para a formação de fenilpropanóides. Enzimas relatadas: PAL, fenilalanina amônia-liase; TAL, tirosina amônia-liase; C4H, cinamato 4-hidroxilase; 4CL, ácido p-cumárico- Coa ligase; COMT, ácido cafeico/ ácido 5-hidroxiferúlico O-metil-transferase; C3H, p-coumaroil chiquimato/quinato 3-hidroxilase; CCoAOMT, cafeoil CoA O-metil-transferase; F5H, ferulato 5-hidroxilase; CHS, chalcona sintase; STS, etilbeno sintase. (Adaptado de EMILIANI et al., 2009) .

Fenilpropanóides, incluindo os flavonóides, eram muitas vezes considerados metabólitos secundários quase exclusivamente produzidos por plantas até a recente descoberta de genes da enzima chalcona sintase (CHS) na espécie de fungo *Aspergillus oryzae* e outras espécies de fungos (SESHIME et al., 2005). A presença de chalcona-flavanona isomerase (CHI), uma enzima responsável pela ciclização da chalcona em flavanona também foi identificada na espécie *Neurospora crassa* e em algumas leveduras (SESHIME et al., 2005). A partir das evidências descritas, SESHIME et al., (2005) sugere a existência da rota metabólica para a produção de flavonóides em alguns fungos, assim como verificado em plantas superiores. Entretanto, são raros os trabalhos na literatura envolvendo a produção de fenilpropanóides por micro-organismos.

Estas enzimas têm recebido atenção significativa em plantas e bactérias, em virtude de seus produtos metabólicos com elevado valor agrícola e farmacêutico. CHSs de plantas são conhecidas por catalizar um importante passo biossintético para a formação de flavonóides, isoflavonóides e antocianinas através da condensação do composto p-coumaroil-CoA e três moléculas de malonil-CoA. Essencialmente, CHSs são enzimas que fazem parte da rota biossintética de flavonóides posteriormente à ação de enzimas como fenilalanina amônia-liase (PAL), cinamato 4-hidroxilase (C4H), e ácido p-cumárico-CoA ligase (4CL) (JORGENSEN et al., 2005). A atividade destas respectivas enzimas facilita a conversão do aminoácido precursor, L-fenilalanina, via a formação de ácido cinâmico, ácido p-cumárico e o intermediário chave, o p-coumaroil-CoA, o qual é canalizado em diversas vias que conduzem à síntese de uma ampla variedade de metabólitos através da atividade de enzimas CHSs, e outras enzimas como chalcona redutase (CHR) e chalcona-flavanona isomerase (CHI) (Figura 1.2).

Enzimas putativas PKS do tipo III, como a enzima CHS, foram identificadas em alguns fungos com genomas descritos, entre eles, *N. crassa*, *Magnaporthe grisea*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Fusarium graminearum* e



*Podospora anserina*. Entretanto, em contraste ao fungo *A. oryzae* que apresenta 4 enzimas putativas PKS tipo III, os fungos *N. crassa* e *F. graminearum* apresentam apenas um homólogo da enzima em seus genomas, enquanto que os fungos, *M. grisea* e *P. anserina* apresentam 2 homólogos. Apenas o fungo *P. chrysosporium* apresentou 3 homólogos da enzima relatada no seu genoma. Por outro lado, algumas espécies de fungos do gênero *Aspergillus* (*A. nidulans* e *A. fumigatus*) não apresentaram genes que codificam a enzima CHS em seus genomas. Considerando a grande homologia das enzimas CHS fúngicas e das mesmas enzimas descritas em plantas, os pesquisadores, SESHIME et al. (2005), propõe que um razoável mecanismo de transferência horizontal de genes conduziu a alguns destes fungos adquirir a CHS de plantas durante a evolução.

Os pesquisadores, ainda buscaram no genoma do fungo *A. oryzae* outras enzimas envolvidas na rota biossintética de fenilpropanóides (SESHIME et al., 2005). Análises do genoma do micro-organismo indicaram 4 genes codificando a enzima PAL em paralelo a planta, *Arabidopsis thaliana*. Enquanto os fungos *A. nidulans* e *A. fumigatus* apresentaram 2 e 1 genes codificando a enzima PAL respectivamente. O gene PAL foi também anteriormente descrito no fungo fitopatógeno *Ustilago maydis*, entretanto, sua função continua desconhecida (KIM et al., 2001).

Considerando o papel da enzima PAL em catalisar a conversão de fenilalanina em ácido cinâmico conforme relatado em plantas, é possível que vias semelhantes possam operar em fungos, levando a conversão de ácido cinâmico para ácido p-cumárico pela actividade de C4H e posteriormente à p-coumaroil-CoA pela actividade de 4CL, que subseqüentemente conduz a formação de benzaldeído, álcool benzílico e ácido benzóico conforme relatado em *A. oryzae* e outros fungos. Os pesquisadores SESHIME et al. (2005) também investigaram a presença do gene que codifica a enzima C4H no genoma de *A. oryzae* e verificaram um único gene responsável pela conversão de ácido cinâmico em ácido p-cumárico no fungo estudado.

A enzima 4CL desempenha um papel chave na canalização de carbono para diversas vias do metabolismo dos fenilpropanóides, que proporciona precursores para a biossíntese de uma ampla variedade de produtos naturais, catalisando a formação de diferentes hidroxicinamatos. Um total de 11 genes que codificam enzimas 4CL putativas com homologia com enzimas 4CLs de bactérias e plantas foram identificadas no genoma de *A. oryzae* segundo SESHIME et al. (2005) a partir de análises de similaridade. Enquanto que nos genomas de *A. nidulans* e *A. fumigatus* apenas 8 e 2 enzimas putativas 4CL foram observadas, respectivamente. Outra característica interessante no genoma de *A. oryzae* foi a constatação da presença de grande número de genes que codificam enzimas da superfamília de enzimas citocromo P450 em comparação à outros fungos do gênero *Aspergillus* (*A. nidulans* e *A. fumigatus*) (MACHIDA et al., 2005). Em plantas, sabe-se que mais de 15 enzimas da família citocromo P-450 mediam reações de oxidações envolvidas na rota biossintética de fenilpropanóides, fitoalexinas, terpenos e alcalóides que participam em mecanismos de defesa contra patógenos e exposição à radiação UV (WERCK-EICHHART, 1995). Dessa maneira, os pesquisadores acreditam que algumas enzimas citocromo P450 putativas encontradas no genoma do micro-organismo *A. oryzae* estejam potencialmente relacionadas a via metabólica de fenilpropanóides.

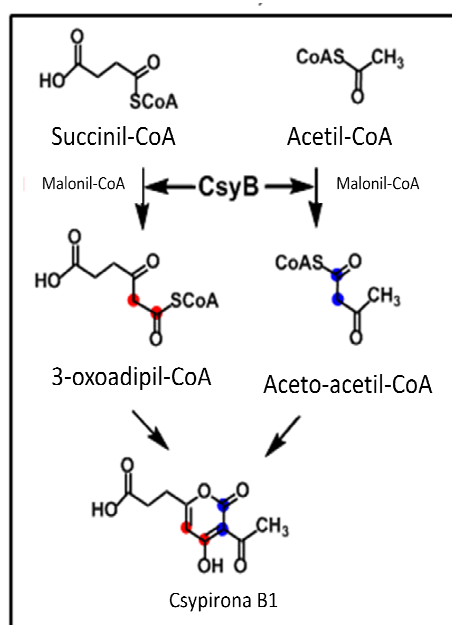
A presença de grande numero de genes que codificam enzimas da rota biossintética dos fenilpropanóides em fungos, têm gerado muitas discussões entre os pesquisadores no intuito de identificar e caracterizar a função destes genes e ainda, determinar a função de possíveis fenilpropanóides fúngicos produzidos. Uma vez que fenilpropanóides sintetizados por plantas contribuem na resistência a patógenos e barreiras físicas (luz UV, baixas temperaturas, etc.), fenilpropanóides fúngicos também poderiam de alguma forma atuar na defesa destes organismos e ainda refletir um processo evolutivo (SESHIME et al., 2005). Alguns exemplos que acordam com esta hipótese derivam do fato de que

algumas cepas industriais de *A. oryzae* (RIB128, RIB177, RIB609 e RIB647) exibem tolerância elevada a luz UV e tratamentos de congelamento e descongelamento (ISHI et al., 2005), estas características, segundo os pesquisadores, poderiam refletir a produção de alguns pigmentos estruturalmente similares a flavonóides por este fungo que estariam auxiliando o micro-organismo em seu processo de defesa aos fatores de estresse impostos ao crescimento do mesmo (SESHIME et al., 2005).

Os genes referentes a superfamília PKS tipo III, *csyA*, *csyB*, *csyC*, e *csyD* encontrados no genoma de *A. oryzae* foram submetidos à análises funcionais através da expressão heteróloga. A superexpressão do gene *csyB* em *A. oryzae* levou a identificação do composto cypirona B1 (Figura 1.3), identificado como um produto biossintetizado por enzimas do tipo PKS tipo III (SESHIME et al., 2010). O gene *csyA* (No. acesso AB206758) codifica uma proteína de 402 aminoácidos com uma massa molecular de 43,5 kDa, que foi expressa sob o controle do promotor  $\alpha$ -amylase e utilizando o fungo *A. oryzae* como vetor de expressão. Os pesquisadores identificaram o composto ácido 3,5-dihidroxibenzóico (DHBA) (Figura 1.3) como o produto majoritário da expressão deste gene em *A. oryzae*. Experimentos com precursores isotopicamente marcados, neste caso, [2-<sup>13</sup>C]-acetato confirmaram o padrão de incorporação das unidades de acetato no DHBA. Os experimentos de marcação isotópica indicaram os carbonos enriquecidos com <sup>13</sup>C, C-2, -4, -6, e -7 indicando que o composto DHBA foi formado pela condensação de quatro unidades de acetato, excluindo o envolvimento da rota biossintética via chiquimato, o que é coincidente com a biossíntese descrita para a formação do composto orcinol derivado do ácido orselínico. A posterior oxidação do grupo metila do orcinol pelo fungo levou a produção de DHBA. Análises de modelagem molecular de *CsyA* em comparação à estrutura da enzima ácido 20-oxoalquilresorcílico sintase de *Neurospora crassa* indicaram que o tamanho da cavidade de *CsyA* apenas aceita substratos com a cadeia acila pequena e,

consequente formação de tetracetídeos (SESHIME et al., 2010). Dessa forma, *CsyA* não parece estar envolvida na biossíntese de fenilpropanóides via a ação da enzima PAL a partir do aminoácido L-fenilalanina. O gene *csyD* também foi estudado e os pesquisadores descrevem que a proteína de interesse não apresentou a tríade catalítica conservada CHS (Cys-His-Asn), a qual é necessária para a extensão da cadeia policetídica e portanto excluiu-se qualquer envolvimento dos genes estudados na formação de flavonóides via rota biossintética dos fenilpropanóides (Figura 1.3).

Modelo proposto por SESHIME (2010) para a formação de Csyrona B1



Modelo proposto por SESHIME (2010) para a formação de ácido 3,5-Dihidroxibenzóico

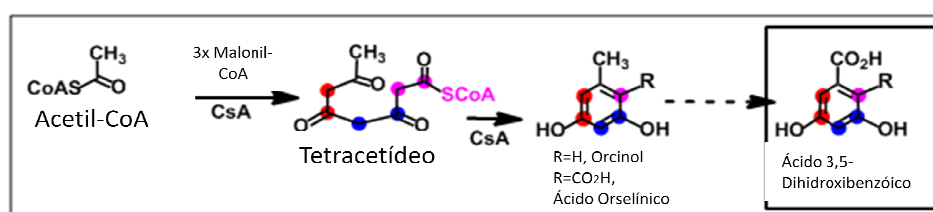


FIGURA 1.3 - Modelos biossintéticos para a formação de Csyrona B1 e ácido 3,5-Dihidroxibenzóico formados via enzimas *CsyB* e *CsyA* respectivamente (Adaptado de SESHIME et al., 2010).

Embora o metabolismo da fenilalanina em plantas vasculares e animais seja bem documentado, muito menos se conhece sobre a degradação fúngica deste aminoácido. Algumas das vias conhecidas do metabolismo animal e vegetal de fenilalanina são descritas também em micro-organismos. Em alguns micro-organismos a fenilalanina é convertida em ácido homogentísico através da formação dos intermediários ácido fenilpiruvico e ácido p-hidroxifenilpirúvico através da transaminação e hidroxilação, como no caso do metabolismo em animais. Por outro lado, a descoberta de fungos expressando a enzima PAL e a detecção de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $^{14}\text{C}$ -fenilalanina, na produção de ácido cinâmico e ácido benzóico demonstraram que certos fungos tem a habilidade de degradar fenilalanina por uma via envolvendo a desaminação inicial da fenilalanina para produzir ácido cinâmico, como acontece em plantas (HYUN et al., 2011). Uma via metabólica para o metabolismo de fenilalanina por meio de ácido cinâmico, ácido benzóico, p-hidroxibenzoico foi reportada em diferentes basidiomicetos, incluindo *Rhodotorula*, *Ustilago hordei*, *Schizophyllum commune*, *Sporobolomyces roseus*, *Alternaria*, *R. solani*, e *Penicillium brevicompactum*. (HYUN et al., 2011). Por outro lado, foi relatado que o fungo *Lentinus lepideus*, tem a habilidade de biossintetizar cinamatos como ácido p-cumárico, ácido isoferulico, ácido p-metoxicinamico via ácido cinâmico derivado de fenilalanina. Os autores descrevem que estes cinamatos são acumulados no meio de cultura na forma de seus respectivos ésteres, entretanto, a significância fisiológica destes metabólitos ainda é desconhecida (HYUN et al., 2011). Estes relatos do acúmulo de cinamatos em fungos filamentosos, despertam interesse, porém, sua origem, se produzidos pelo micro-organismo ou se são frutos do metabolismo de constituintes do substrato, parece ser dúbia.

Um dos primeiros bisfenilpropanóides documentados em fungos, se assemelhando estruturalmente às lignanas, foi a dilactona do ácido diidrocafeico, isolado de *Inonotus sp.* (Figura 1.4). Flavonóides foram obtidos

de extratos de espécies de *Aspergillus* (TURNER & ALDRIDGE, 1983). No entanto, nesse caso, esses compostos podem ser originados do metabolismo de constituintes da soja, usada como substrato para cultivo dos micro-organismos. A forma mais comum usada por fungos filamentosos para acumular unidades  $C_6C_3$ , oriundas dos aminoácidos fenilalanina e/ou tirosina, na forma dimérica, é a produção de difenilbenzoquinonas (Figura 1.5). Mas nesses casos, aparentemente não há envolvimento de enzimas similares à PAL. Unidades desses aminoácidos também podem ser incorporadas em outros metabólitos secundários fúngicos se adicionando a fragmentos terpenoídicos ou policetídicos (TURNER & ALDRIDGE, 1983).

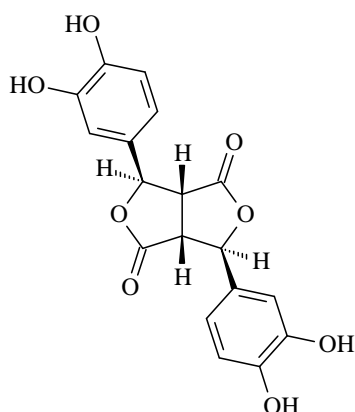
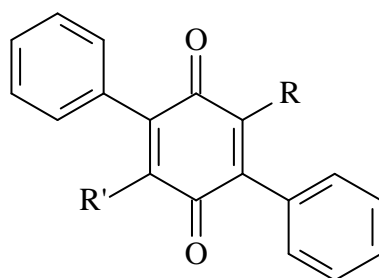


FIGURA 1.4 - Estrutura molecular dilactona do ácido diidrocafeico.



R e R' = H → 2,5-difenilbenzoquinona

FIGURA 1.5 - Estrutura molecular da 2,5-difenilbenzoquinona, um pigmento fúngico.

Recentemente, EL ELIMAT et al., (*in press*) ao estudar a planta *Silybum marianum* (Asteraceae) utilizada no tratamento de distúrbios do fígado como hepatite, identificaram sete compostos majoritários da classe das flavolignanas silibina A, silibina B, isosilibina A, isosilibina B, silicristina, isosilicristina e silidianina. Estudos químicos indicaram que o fungo endofítico *Aspergillus iizukae* isolado desta planta é hábil na produção das flavolignanas silibina A e silibina B. As flavolignanas foram identificadas utilizando UPLC-PDA-HRMS-MS/MS por comparação com os tempos de retenção, assim como comparação com os espectros de HRMS, e MS/MS dos compostos padrão. Os pesquisadores descrevem a atenuação da produção destes metabólitos secundários pelo micro-organismo após sucessivas subculturas do micro-organismo em BDA e relatam que a habilidade deste fungo em produzir os compostos 1 e 2 é regenerada ao cultivar o fungo na presença de folhas de *Silybum marianum*. Entretanto, diante da possibilidade de contaminação da cultura com as flavolignanas produzidas na planta e devido a falta de dados espectroscópicos nos materiais suplementares não é possível assegurar a produção de flavolignanas fúngicas.

### **1.3 - A enzima PAL**

Fenilalanina amônia-liase é a primeira enzima chave no metabolismo dos fenilpropanóides, responsável pela catálise da biotransformação do aminoácido L-fenilalanina em trans-ácido cinâmico e amônia, descrita inicialmente em 1961 pelos pesquisadores KOUKOL & CONN, (1961). A rota biossintética envolvendo a produção destes metabólitos secundários é ativa em plantas superiores e está envolvida principalmente em mecanismos de defesa. Em micro-organismos, sabe-se que esta enzima apresenta funções catabólicas, permitindo o uso de L-fenilalanina como fonte de carbono e nitrogênio no metabolismo secundário. (MACDONALD & D’CUNHA, 2007).

A enzima PAL catalisa a desaminação espontânea e não-oxidativa de L-fenilalanina em ácido cinâmico e amônia. Estudos com o aminoácido L-fenilalanina enriquecidos estereoespecificamente com Deutério (D) no C-3 foram utilizados para a determinação da estereoquímica da reação. Pesquisadores verificaram que o grupo amino no C-2 e o hidrogênio pro-S no C-3 da L-fenilalanina são eliminados de maneira antiperiplanar para gerar o trans-ácido cinâmico (MACDONALD & D’CUNHA, 2007).

A enzima PAL foi isolada e caracterizada a partir de um grande número de espécies de plantas, algumas espécies de fungos e algumas poucas fontes bacterianas. A maioria das enzimas PALs nativas relatadas apresentam uma massa molecular na faixa de 300-340 kDa. Algumas exceções de massas relatadas são 152 kDa em *Ocimum basilicum*, 226 kDa na bactéria *Streptomyces*, 250 kDa em *Helianthus annuus*, 266 kDa em *Fragaria ananassa*, e 560 kDa em *Alternaria* (HYUN et al., 2011). A enzima PAL é geralmente um tetrâmero constituído de subunidades idênticas. Algumas enzimas heterotetrâmeros foram descritas em *H. annuus* ( $2 \times 58$  kDa e  $2 \times 68$  kDa) e *Rhizoctonia solani* ( $2 \times 70$  kDa e  $2 \times 90$  kDa). PAL de *Rhodosporidium toruloides* foi relatada como um dímero composto de duas subunidades idênticas com massa molecular de 80 kDa (HYUN et al., 2011).

A maioria das PALs são consideradas proteínas hidrofóbicas, propriedade muito abordada pelos pesquisadores, em purificações da enzima através de cromatografia de hidrofobicidade. A estrutura tridimensional da enzima PAL de *R. toruloides* foi descrita a partir de dados de cristalografia utilizando a técnica de Raio-X. A proteína homotetramérica apresenta 716 resíduos por subunidade com uma massa molecular de 76 kDa. A enzima PAL é específica para o aminoácido L-fenilalanina, e alguns casos, L-tirosina, formando o ácido p-cumárico e neste caso a enzima atua como tirosina amônia-liase (TAL). Outros L-aminoácidos não são desaminados pela enzima. (MACDONALD & D’CUNHA, 2007). Na maioria das enzimas PAL descritas,



a atividade TAL é muito baixa. A razão entre a atividade PAL/TAL das enzimas descritas variam entre 1.35~5 no fungo *Sporobolomyces pararoseus*, entre 4~20 em milho e 0.6~1.3 em PAL encontrada em feijão (HYUN et al., 2011). Nenhuma enzima TAL que não apresentasse atividade de PAL foi descrita até o momento. Diferentes enzimas PALs isoladas revelaram uma cinética normal de saturação de substrato de acordo com Michaelis-Menten. O pH ótimo para as enzimas descritas esta na faixa de 8.2~9.0 e a temperatura ótima relatada varia entre os organismos. PAL isolada de tabaco apresenta temperatura ótima em 35°C, 55 °C em girasol, e 44~46 °C em *Rhizoctonia* (HYUN et al., 2011). Em contraste, PAL fúngicas são relativamente mais estáveis a altas temperaturas. PAL de *Rhodotorula* é descrita como sendo estável por 6 meses à 60 °C (HYUN et al., 2011). Foi verificado que a enzima PAL não requer cofatores exógenos. Na tabela 1.1 abaixo, visualizam-se as diferentes fontes, das quais a enzima PAL pode ser purificada, assim como a massa molecular e o número de subunidades da enzima (MACDONALD & D’CUNHA, 2007).

TABELA 1.1 - Características da enzima PAL produzida por diferentes organismos.

Fonte	pH ótimo	MM (kDa)	Subunidades
<i>Streptomyces verticillatus</i>	9,1	226	4
Batata	8,7	330	4
<i>Rhodotorula glutinis</i>	8,5	330	4
<i>Sporobolomyces pararoseus</i>	8,5	275	4
<i>Rhizoctonia solani</i>	8,8	330	4
<i>Zea mays</i>	9,0	330	4

Com relação ao gene que codifica a enzima PAL, a presença de introns foi reportada ambos nos genes de plantas e fungos. PAL de plantas geralmente apresentam um intron, enquanto fungos apresentam geralmente cinco ou seis introns nos genes PAL descritos na literatura. A análise da sequencia de 45 genes que codificam a enzima PAL, listadas na tabela 1.1, mostram que o número de introns varia de acordo com a espécie. O número de

introns encontrados nos genes PAL também variam em organismos do mesmo gênero, como os fungos *A. flavus* e *A.oryzae*. A posição do sítio ativo varia pouco entre as espécies de fungos conforme visualizado na tabela 1.2, geralmente entre os aminoácidos 123 e 244, com exceção das sequencias de *Neurospora* e *Neosartorya* onde a posição do sítio ativo encontra-se perto do C-terminal e N-terminal respectivamente (HYUN et al., 2011).

TABELA 1.2 - Propriedades do gene PAL descrito em diferentes fungos (Extraída de HYUN et al., 2011)

Espécie de fungo	Nome do gene	Sítio ativo da PAL	Posição do sítio ativo	Tamanho da proteína	Número de introns
<b>Ascomycota</b>					
<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	ACLA_080920	GSISASGDLIPLSYIAA	123-139	664	1
<i>A. flavus</i> NRRL 3357	AFL2G_05505	GSISASGDLIPLSYIAG	189-205	721	2
<i>A. flavus</i> NRRL 3357	AFL2G_00533	GSISASGDLTPLAYIAG	202-218	714	1
<i>A. flavus</i> NRRL 3357	AFL2G_06214	GSISASGDLSPAIYISG	155-171	671	3
<i>A. fumigatus</i> Af293	Aftu2g09110	GSISASGDLMPLSYIAG	181-197	728	2
<i>A. nidulans</i> FGSC A4	ANID_03897	GSISASGDLTPLAYIAG	182-198	687	1
<i>A. nidulans</i> FGSC A4	ANID_06075	GSISASGDLMPLSYIAG	187-203	702	2
<i>A. niger</i> ATCC 1015	e_gw1_15.39	GSISASGDLTPLAYIAG	194-210	719	1
<i>A. niger</i> ATCC 1015	e_gw1_3.237	GSISASGDLSPLSYIAG	181-197	720	2
<i>A. niger</i> ATCC 1015	fge1_pm_C_13000016	GTISASGDLMPLAYVVG	184-200	704	2
<i>A. oryzae</i> RIB 40	AO090005000532	GSISASGDLTPLAYIAG	202-218	714	1
<i>A. oryzae</i> RIB 40	AO090011000788	GSISASGDLIPLSYIAG	189-205	721	2
<i>A. oryzae</i> RIB 40	AO090026000586	GTISASGDLMPLAYVTG	183-199	696	2
<i>A. oryzae</i> RIB 40	AO090701000601	GSISASGDLSPAIYISG	228-244	744	4
<i>A. terreus</i> NIH 2624	ATEG_09127	GSISASGDLTPLAYIAG	177-193	695	0
<i>A. terreus</i> NIH 2624	ATEG_10006.1	GSISASGDLMPLSYIAG	181-197	698	2
<i>Botrytis cinerea</i> B05.10	BC1G_05296.1	GSISASGDLSPLSYIAG	240-256	1131	6
<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51	CHGG_02399.1	GSISASGDLSTLSYIAG	190-206	707	3
<i>Fusarium graminearum</i> NRRL 31084	FGSG_09311	GTISASGDLMPMSYIAG	180-196	721	0
<i>F. oxysporium</i> f. sp. <i>lycopersici</i> 4287	FOXG_05927	GTISASGDLMPLSYIAG	180-196	750	0
<i>F. verticillioides</i> 7600	FVEG_03798	GTISASGDLMPLSYIAG	180-196	724	0
<i>F. verticillioides</i> 7600	FVEG_10552	GSISASGDLIPLSYIAG	196-212	706	1
<i>Gaeumannomyces graminis</i> R3-111a-1	GGTG_00837.1	GSISASGDLSPLSYIAG	204-220	743	2
<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15 (MG8)	MGG_10036.7	GSISASGDL SALAWIAA	207-223	627	0
<i>M. poae</i> ATCC 64411	MAPG_07598.1	GSISASGDLSPLSYIAG	198-214	730	2
<i>Neurospora crassa</i> OR74A (NC10)	NCU09391.5	GSISASGDLSTLSYIAG	610-623	763	1
<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	NFIA_084640	GSISASGDLMPLSYIAG	48-64	595	0
<i>Stagonospora nodorum</i> SN15	SNOG_08528.1	GSISASGDLSPLSYIAG	190-206	700	4
<i>S. nodorum</i> SN15	SNOG_09914.1	GSISASGDL SALAWIGA	179-195	610	0
<i>S. nodorum</i> SN15	SNOG_16362.1	GSISASGDLSPLSYVGG	191-207	772	2
<i>Uncinocarpus reesii</i> 1704	UREG_04219.1	GTISASGDLMPLAYTVG	185-201	710	2
<i>Verticillium albo-atrum</i> VaMs.102	VDBG_08166.1	GTISASGDLMPLSYIAG	181-197	676	1
<i>V. dahliae</i> VdLs.17	VDAG_100581.1	GTISASGDLMPLSYIAG	181-197	696	0
<i>V. dahliae</i> VdLs.17	VDAG_05831.1	GSISASGDL SALAWICA	218-234	645	0
<b>Basidiomycota</b>					
<i>Coprinus cinerea</i> okayama7#130	CC1G_06838.3	TSISASGDLSPLSYIAG	212-228	734	9
<i>C. cinerea</i> okayama7#130	CC1G_14161.3	GSISASGDLSPLSYIAG	252-268	770	6
<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	LACBIDRAFT_291120	GTISASGDLAPLSYIAG	163-179	688	5
<i>L. bicolor</i> S238N-H82	LACBIDRAFT_184628	GSISASGDLSPLSYIAG	201-217	731	11
<i>Puccinia triticina</i> 1-1 BBBB Race 1	PTTG_02413.1	GSISASGDLMPLSYVAA	175-191	653	13
<i>P. graminis tritici</i> CRL 75-36-700-3	PGTG_12283.2	GSISASGDLMPLSYVAA	190-206	691	13
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	AAA33883	GTISASGDLSPLSYIAA	207-213	693	6
<i>R. toruloides</i> CBS 14	P11544	GTISASGDLSPLSYIAA	184-200	716	6
<i>Rhodotorula graminis</i> WP1	CAD23828	GSISASGDLSPLSYIAG	213-229	713	1
<i>R. mucilaginosa</i> NRRLY-15597	CAA31486	GTISASGDLSPLSYIAA	213-229	720	5
<i>Ustilago maydis</i> 521	UM00078	SSISASGDLSPLSYVAG	201-217	724	0

PAL, phenylalanine ammonia-lyase; NRRL, Northern Regional Research Laboratory; FGSC, Fungal Genetics Stock Center; ATCC, American Type Culture Collection; RIB, Research Institute of Brewing; NIH, National Institutes of Health; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Quatro diferentes métodos de purificação da enzima PAL são descritos na literatura para o micro-organismo *Rhodotorula glutinis*. O número de passos e os rendimentos descritos são resumidos na tabela 1.3 a seguir.

TABELA 1.3 - Protocolos de purificação da enzima PAL a partir de diferentes linhagens de *Rhodotorula glutinis* (MACDONALD & D’CUNHA, 2007).

<b>Linhagem do Organismo</b>	<b>Nº de etapas</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Referência</b>
<i>Rhodotorula glutinis</i> (ATCC15385)	8	17	Hodgins 1971
<i>Rhodotorula glutinis</i> (IFO 0559)	8	23	Fritz 1976
<i>Rhodotorula glutinis</i> (IFO 0559)	6	32	Adachi 1990
<i>Rhodotorula glutinis</i> (NCYC 61)	4	33	D’cunha 1996

A enzima PAL representa uma das poucas enzimas não-hidrolíticas que possuem muitas aplicações comerciais, apresentando aplicação industrial na produção de L-fenilalanina (precursor do aspartame) e seu éster metílico através de reação fisiológica reversa a partir de ácido cinâmico e altas concentrações de amônia. Foi verificado em experimentos com ratos *in vivo* que a enzima PAL pode ser utilizada para converter excessos venenosos de L-fenilalanina no sangue em compostos menos nocivos, no caso o ácido cinâmico e amônia, que são excretados pela urina (MACDONALD & D’CUNHA, 2007).

Além do importante papel no desenvolvimento, a enzima PAL é responsável pela resposta a estresses nas plantas. Sua biossíntese é estimulada por ataques de patógenos, tecidos danificados, irradiação UV, baixas temperaturas ou baixos níveis de nitrogênio, fosfato ou ferro. A enzima PAL por estar extensamente presente em plantas e ausente em animais, apresenta-se um alvo promissor para o desenvolvimento de herbicidas e alguns inibidores de crescimento vegetal já vêm sendo desenvolvidos (RITTER & SCHULZ, 2004). Muitos fenilpropanóides induzidos são classificados como fitoalexinas,

compostos antimicrobiais sintetizados em resposta ao ataque de um determinado patógeno. Entre as fitoalexinas são descritos pterocarpanas, isoflavanos, isoflavonóides prenilados, estilbenos, cumarinas, 3-deoxiantocianidinas, flavonols, e auronas (DIXON & PAIVA, 1995). Os níveis de concentração destes compostos aumentam em torno do local de infecção, e apresentam concentrações tóxicas aos patógenos conforme bioensaios realizados *in vitro* (DIXON & PAIVA, 1995).

O fungo patogênico *Colletotrichum trifolii*, quando presente nas folhas da alfafa, causa a doença Antraquinose, que tem por sintomas a redução das folhagens e baixo crescimento da planta. Quando infectada, a planta se defende pela rápida produção de enzimas da rota biossintética dos fenilpropanóides (PAL, CAH) e conseqüente acúmulo dos isoflavonóides, medicarpina e sativan, exemplos de fitoalexinas produzidas pela planta a partir do ataque do patógeno (SAUNDERS & O'NEILL, 2004).

O ácido cinâmico é precursor de inúmeros fenilpropanóides, compostos que possuem esqueleto carbônico  $C_6C_3$  o qual, junto aos seus derivados apresentam importantes aplicações industriais. No caso, o produto da reação catalisada pela enzima PAL é um composto utilizado como agente flavorizante em alimentos, além de aumentar a atividade de fármacos como isoniazida ou rifampina contra *Mycobacterium tuberculosis* (VANELLI et al., 2007). O composto *o*-metil-cinamamida inibe a invasão e metástase de melanoma humano maligno. Já o composto cinamaldeído é antimutagênico em células de mamíferos. Industrialmente, o ácido cinâmico e seus derivados são produzidos por síntese química. Este processo envolve uma quantidade grande de solventes e devido a isto, existe um crescente interesse no desenvolvimento de alternativas que não sejam nocivas ao meio ambiente como a reconstrução de vias metabólicas em organismos recombinantes (CHALABAEV et al., 2008).

A enzima PAL é reguladora chave da rota biossintética dos fenilpropanóides e qualquer inibição de PAL, inibiria todo o percurso de

formação destes metabólitos secundários. Provavelmente devido à sua essencialidade, as plantas abrigam várias cópias da enzima PAL no genoma e nenhum mutante nulo é descrito na literatura (HYUN et al., 2011).

#### **1.4 - As amidas bis-fenilpropanoídicas e sua potencialidade como fármacos**

As amidas bisfenilpropanoídicas brasiliamida A e brasiliamida B (Figura 1.6), foram descritas anteriormente, como sendo produzidas pelo fungo *Penicillium brasilianum*, isolado de amostras de solo no Japão, quando cultivado em okara (resíduo não solúvel do grão de soja) (FUJITA et al., 2002).

A substância brasiliamida A (**1**) teve sua estrutura elucidada baseada em dados espectrais e evidências químicas, sendo encontrada uma fórmula molecular  $C_{24}H_{26}N_2O_6$ . Foram realizados, para este composto, bioensaios contra o bicho-da-seda (*Bombyx mori*) estando este no terceiro estágio larval. Foi observado que essa substância produz convulsão nestes animais. A atividade para esta substância foi avaliada encontrando-se valores de  $ED_{50}$  próximos a  $300 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (FUJITA et al., 2002). Para a substância brasiliamida B (**2**) foi sugerida uma fórmula molecular  $C_{24}H_{26}N_2O_5$  baseada também em dados espectrais e evidências químicas. O espectro de RMN  $^1\text{H}$ , apresentou sinais conturbados, sendo alguns duplicados em  $\text{CDCl}_3$  a  $20^\circ\text{C}$ . Esse fenômeno foi observado também em diferentes solventes deuterados, como acetona e metanol deuterados. Essas observações levaram os pesquisadores a sugerir que isômeros conformacionais de (**2**) estavam presentes em solução. A substância brasiliamida B também se mostrou ativa contra as larvas de *Bombyx mori* provocando convulsão nestas. Encontraram-se valores de  $ED_{50}$  próximos a  $50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . (FUJITA et al., 2002). FUJITA et al. (2002) testaram ainda a desidrobrasiliamida B ( $C_{24}H_{28}N_2O_5$ ) contra as larvas de *Bombyx mori*, substância produzida a partir da hidrogenação da substância (**2**). Encontraram-se valores de  $ED_{50}$  próximos a  $400 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Era esperado que o grupo funcional responsável pela atividade das brasiliamidas fosse o 3-metóxi-4,5-metilenodioxibenzil, conhecido como grupo piperonila, assim como é relatado para as substâncias miristicina e dilapiole, (substâncias inseticidas) por LICHTENSTEIN & CASIDA (1963). Entretanto, a atividade da desidrobrasiliamida B foi  $400 \mu\text{g.g}^{-1}$ , mais fraca que (2), sugerindo que a ligação dupla no anel tetraidropirazino seja essencial nessas estruturas (FUJITA et al., 2002). FUJITA et al. (2002) sugerem ainda que as brasiliamidas devam ser classificadas como um novo grupo tremorgênico, uma vez que, não possuem grupos funcionais similares às substâncias conhecidas que tenham atividade parecida contra bicho-da-seda como fumitremorginas, e verruculogenina.

FUJITA et al. (2005) isolaram três novos compostos, brasiliamida C (3), brasiliamida D (4) e brasiliamida E (5), do fungo *Penicillium brasilianum* quando cultivado em okara, também a  $25^{\circ}\text{C}$  por duas semanas. Suas estruturas foram elucidadas com base em dados espectroscópicos e evidências químicas. O espectro de RMN dessas substâncias exibiu uma mistura de dois ou quatro isômeros conformacionais de acordo com a rotação restrita das ligações do grupo amida em solução. Os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram analisados para o isômero em maior quantidade na temperatura adequada.

A atividade contra *Bombyx mori* foi analisada para as brasiliamidas C, D e E, que apresentaram valores de  $\text{ED}_{50}$  de  $400 \mu\text{g.g}^{-1}$ ,  $400 \mu\text{g.g}^{-1}$  e  $500 \mu\text{g.g}^{-1}$  respectivamente. A atividade da brasiliamida D e seu isômero geométrico desidrobrasiliamida B se mostraram menores do que a atividade para a substância brasiliamida B, sugerindo novamente que a ligação dupla no anel piperazino é mais significativa que o grupo 3- metóxi-4,5-metilenodioxibenzila. FUJITA & HAYASHI (2005) sugerem também, que a atividade convulsiva das brasiliamidas não é afetada pela conformação do anel piperazino ou pela configuração dos substituintes no anel.

Recentemente, foi reportada na literatura a brasiliamida F (Figura 1.6), até então inédita (FILL et al., 2009). O cultivo do micro-organismo e a purificação deste metabólito foram realizados em estudos anteriores no grupo LaBioMMi durante o estudo químico do fungo *P. brasilianum*. A estrutura molecular desta nova molécula pode ser visualizada na figura 1.6 abaixo. A substância brasiliamida F é um composto monoacetilado contendo em sua estrutura um grupo metoxipiperonil e benzil. A caracterização da brasiliamida F foi baseada em dados de RMN 1D e 2D (FILL et al., 2009).

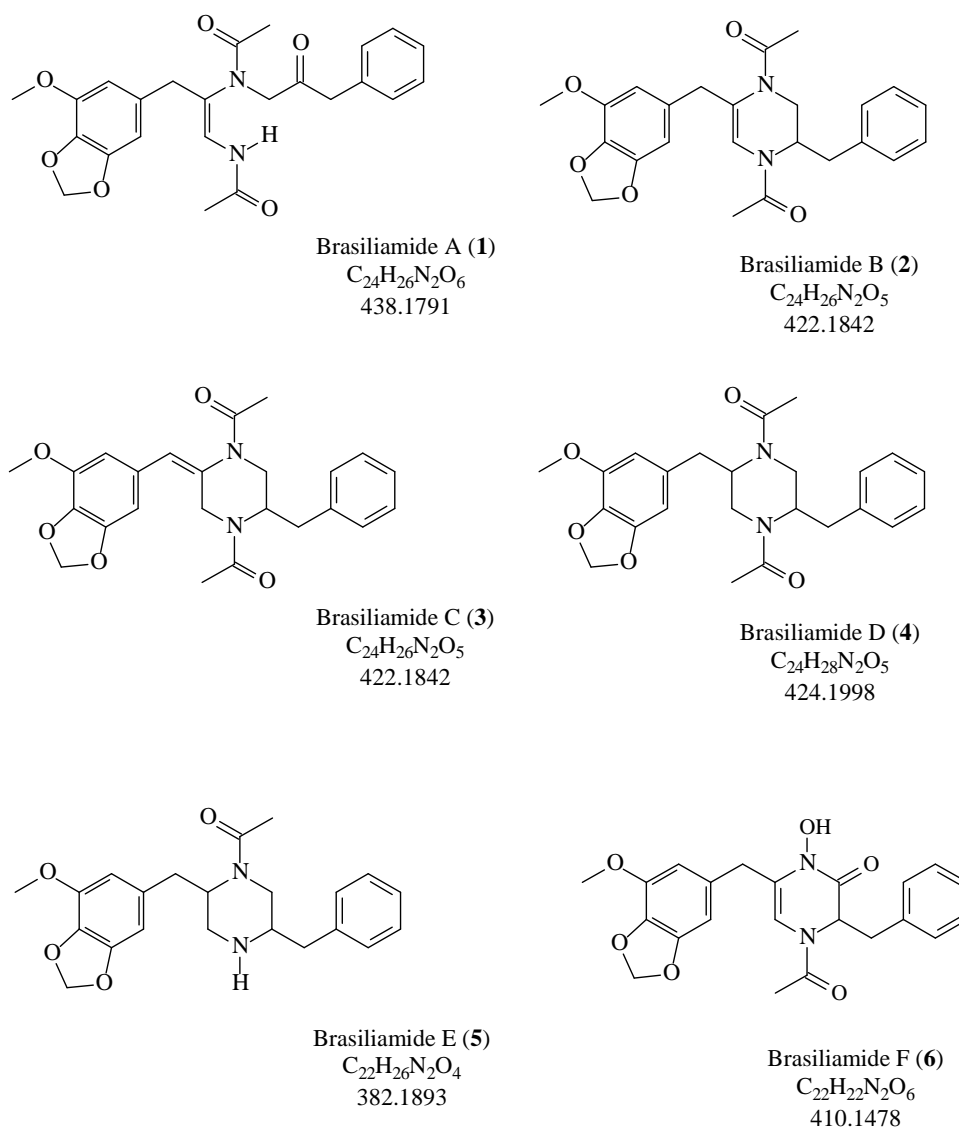


FIGURA 1.6 - Estruturas químicas das brasiliamidas A a F.

Outra característica estrutural bastante interessante das brasiliamidas é a presença do grupo 3-metoxi-4,5-metilenedioxibenzila (metoxipiperonila). A classe de produtos naturais que apresenta este grupo em suas estruturas químicas são as lignanas, neolignanas e alguns flavonóides, sendo estes típicos fenilpropanóides produzidos por plantas. Buscas na literatura revelaram que os únicos metabólitos secundários fúngicos que apresentam o grupo metoxipiperonila em suas estruturas químicas são as brasiliamidas e os compostos PF118 produzidos pelo fungo *Chrysosporium*, que se caracterizam por serem amidas com forte atividade antitumoral. CODEN: JKXXAF JP 2001139577 A 20010522. Dessa maneira, as brasiliamidas possuem inúmeras similaridades com fenilpropanóides biossintetizados por plantas.

Uma interessante teoria foi recentemente desenvolvida e apresentada na literatura, indicando que plantas terrestres poderiam ter adquirido a habilidade de produzir compostos da classe dos fenilpropanóides a partir de micro-organismos via transferência genética horizontal através da decodificação da enzima PAL. Durante a evolução, muitos micro-organismos parecem ter mantido esta habilidade metabólica no intuito de defesa e para facilitar a associação com plantas, controlando as respostas químicas da planta durante a colonização (EMILIANI et al., 2009).



## 2 - Objetivos

O objetivo fundamental deste trabalho é o estudo e melhor entendimento da biossíntese das amidas bis-fenilpropanoídicas produzidas pelo fungo *Penicillium brasilianum*. Neste sentido, para elucidação completa da biossíntese de brasiliamidas, a primeira enzima da rota biossintética dos fenilpropanóides, fenilalanina amônia-liase (PAL) será estudada na sua forma nativa. Assim como, a clonagem, expressão e purificação da enzima PAL recombinante fazem parte dos objetivos deste trabalho. Visou-se o estudo da adição de precursores biossintéticos ao meio de cultura, e análises via HPLC-MS/MS das respostas visualizadas no metaboloma do micro-organismo e detecção de intermediários biossintéticos. Finalmente, o trabalho proposto visou o maior entendimento da função das brasiliamidas, possíveis fenilpropanóides fúngicos, produzidas pelo fungo *P. brasilianum* através do estudo da produção destes metabólitos secundários quando o fungo foi submetido a situações de estresse, visando relatar alguma similaridade entre a produção de fenilpropanóides em plantas e fungos como forma de defesa a fatores bióticos e abióticos.



### 3 - Materiais e Métodos

#### 3.1 - Materiais

Os principais materiais utilizados no presente trabalho são descritos nas tabelas a seguir:

TABELA 3.1 - Reagentes

Nome	Marca
Ácido cinâmico	Padrão sintetizado
d <sup>7</sup> -Ácido cinâmico	Sinth <sup>®</sup>
Ácido 4-metoxicinâmico	Padrão sintetizado
Ácido 3,4-metoxipiperonilcinâmico	Padrão sintetizado
Agarose	Sigma <sup>®</sup>
Água ultrapura	-
Álcool Isopropílico	Quemis
Brometo de Etídio	Promega
BSA	Sigma <sup>®</sup>
Carbenicilina	Melford
Clorofórmio	J T Baker <sup>®</sup>
CDCl <sub>3</sub>	MERCK <sup>®</sup>
DEPC	Sigma <sup>®</sup>
EDTA	Mallinckrodt
Etanol	Quemis
Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico 25:24:1	Sigma <sup>®</sup>

TABELA 3.2 - (Continuação)

<b>Nome</b>	<b>Marca</b>
IPTG	Melford
L-fenilalanina	Sigma <sup>®</sup>
L-tirosina	Sigma <sup>®</sup>
Metanol	JT Baker
SDS	Sigma <sup>®</sup>
Sulfato de Amônio	Sigma <sup>®</sup>
Sulfato de Magnésio	Sigma <sup>®</sup>

TABELA 3.3 - Tampões

<b>Nome</b>	<b>Descrição</b>	<b>Marca</b>
TAE	Tris Base	Sigma <sup>®</sup>
	Ácido acético	Synth
	EDTA	Mallinckrodt
TE	Tris-HCl 10mM pH 8.0	Sigma <sup>®</sup>
	EDTA	Mallinckrodt
Tampão extração DNA	Tris-HCl 200mM pH 8,5	Sigma <sup>®</sup>
	NaCl 250mM	Sigma <sup>®</sup>
	EDTA 25mM	Mallinckrodt
	SDS 0.5%	Sigma <sup>®</sup>

TABELA 3.4 - Kits

<b>Nome</b>	<b>Marca</b>
Plasmid MiniKit	Omega Bio-Tek
Kit PCR purification: MinElute	Qiagen <sup>®</sup>
RNeasy <sup>®</sup> Plant Mini Kit	Qiagen <sup>®</sup>
cDNA Synthesis System	Roche Applied Science

TABELA 3.5 - Meios de cultura

<b>Nome</b>	<b>Descrição</b>	<b>Marca</b>
Meio LB	Peptona de caseína 10 mg.L <sup>-1</sup> Extrato de Levedura 5 mg.L <sup>-1</sup> Cloreto de Sódio 10 mg.L <sup>-1</sup>	USB <sup>®</sup>
Meio LB sólido	Anterior suplementado com Ágar 15 mg.L <sup>-1</sup>	USB <sup>®</sup>
Meio líquido Czapeck	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,0 mg.L <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> 0,5 mg.L <sup>-1</sup> KCl 0,5 mg.L <sup>-1</sup> FeSO <sub>4</sub> 0,01 mg.L <sup>-1</sup> Glicose 30 g.L <sup>-1</sup>	Sigma <sup>®</sup>
Meio sólido Czapeck	Anterior suplementado com Ágar 15 mg.L <sup>-1</sup>	Sigma <sup>®</sup>

TABELA 3.6 - Equipamentos e Materiais

<b>Nome</b>	<b>Marca</b>
Espectrômetro de RMN	BRUKER DPX 400
Espectrômetro de Massas	QuattroLC –MICROMASS, triplo-quadupolo, ESI/ APCI; Thermo Finnigan LTQ, íon trap, ESI Bruker micrOTOF-Q II, ESI Thermo Finnigan LTQ orbitrap Velos
Cromatógrafo Líquido	Waters- Alliance 2695  Bomba LC10AD e LC-8A, SPD-6A UV-Vis;Auto Injector SIL-10ADVp; CBM-10A Communication Module.
Cromatógrafo de baixa pressão (FPLC)	GE Healthcare
Rotoevaporador rotativo	Tecnal (TE 120)
Câmara de Fluxo Laminar	Veco VL FS-12M
Autoclave Vertical	Phoenix AV 70
pHmetro	Tecnal Tec-3MP
Mesa Incubadora Rotativa	Tecnal TE 140
Centrífuga	SORVALL MACH GR
Sonicador	Branson 1510
Balança analítica	Tecnal
Pipetas automáticas	GILSON Pipetman de 20; 200 e 1000 µL
Cuba de eletroforese vertical	Mini-protean tetra system, Bio-Rad
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Transiluminador UV	Spectroline
Cuba de eletroforese horizontal	Flowgen
Espectrofotômetro ND-1000	Nanodrop®

TABELA 3.7 - Outros materiais

Nome	Marca
GeneRuler™ 1kb DNA ladder	Fermentas
Dual color plus protein Standards	Bio Rad
Enzimas de restrição <i>Bam</i> HI e <i>Hind</i> III	New England Biolab

TABELA 3.8 - Vetores

Vetor	Descrição	Aplicação	Fonte
pET28(a)	Kan <sup>R</sup> , P <sub>T7</sub> , ori <sub>pBR322</sub> , lacI, N-Term His <sub>6</sub> -tag	Expressão em <i>E. coli</i>	Novagen
pET24(+)	Kan <sup>R</sup> , P <sub>T7</sub> , ori <sub>pBR322</sub> , lacI, C-Term His <sub>6</sub> -tag	Expressão em <i>E. coli</i>	Novagen
pETSUMO	CB <sup>R</sup> , P <sub>T7</sub> , ori <sub>pBR322</sub> , lacI, N-Term His <sub>6</sub> -tag, N-Term Sumo	Expressão em <i>E. coli</i>	Invitrogen

### 3.2 - Oligonucleotídeos

PAL\_Fw1 sense 5' - GGB TTY GGW GGV AGY GCC GA - 3'

PAL\_Fw2 sense 5' - GCW TCK GGW GAY YTB ATG CC - 3'

PAL\_Rev1 anti-sense 5' – YTG RTT ATG CAT YTC DGC HG – 3'

PAL\_Rev2 anti-sense 5' – CAT RTA HGC HGM CAT RTT GA - 3'

PAL\_Rev3 anti-sense 5' – GGB CCA ATC CAY TGV GGV G - 3'

PAL\_Fw\_pet28Ntag sense 5'-AGC TGA GGA TCC tta gtg cga tgc aac tct -3'

PAL\_pet28Ntag anti-sense 5'-AGC TGA AAG CTT cta cca gca act gag caa-3'

PAL\_pet24C-tag sense 5'- AGC TGA GGA TCC atg tta gtg cga tgc aac -3'

PAL\_pet24Ctag anti-sense 5'- AGC TGA AAG CTT cca gca act gag caa agt-3'

### 3.3 - Materiais Cromatográficos

#### ❖ Suportes para Cromatografia

Sílica gel 70-230 Mesh

Sílica gel 230-400 Mesh

Sílica gel 60 PF 254.

- ❖ Coluna para HPLC PHENOMENEX LUNA Phenyl-hexyl (fase reversa) 250 x 4,6 mm (5 $\mu$ );
- ❖ Coluna para HPLC analítico PHENOMENEX Synergi 4u Fusion 250 x 4.6mm (5 $\mu$  de diâmetro de poro);
- ❖ Coluna para HPLC analítico WATERS Spherisorb ODS 150 x 4.6mm (3,5 $\mu$  de diâmetro de poro) ;
- ❖ Coluna para cromatografia de exclusão molecular SUPERDEX S-200 preparativa, 120mL (GE healthcare life sciences);
- ❖ Coluna para cromatografia de troca ionica Hi trap DEAE Sepharose Fast Flow 1mL (GE healthcare life sciences);
- ❖ Coluna para cromatografia de hidrofobidade (HIC) Phenyl Sepharose Fast Flow (*low sub*), 1mL (GE healthcare life sciences).

### 3.4 - Parte experimental

#### 3.4.1 - Cultivo do fungo *P. brasilianum* isolado de *Melia azedarach*

O fungo endofítico *Penicillium brasilianum* (LaBioMMi 024) foi isolado anteriormente do córtex das raízes de *Melia azedarach* no laboratório



LaBioMMi do Departamento de Química da UFSCar, por SANTOS (2003) e conservado na micoteca LaBioMMi.

A cepa de *Penicillium brasilianum* foi retirada da micoteca, e sua ativação se deu através da inoculação de recortes (0,5 x 0,5cm) do fungo em placas contendo o meio BDA (batata-dextrose-ágar). Após o crescimento dos mesmos nas placas de Petri (aproximadamente uma semana), pode-se preparar a suspensão de esporos com concentração  $10^7$  verificada em câmara de Neubauer, para os posteriores experimentos com este micro-organismo.

### **3.4.2 - Cultivo do micro-organismo *P. brasilianum* em meio líquido suplementado com L-fenilalanina**

A estimativa da incorporação do aminoácido L-fenilalanina (Phe) na rota biossintética das brasiliamidas foi estudada através do cultivo do micro-organismo em meio líquido Czapeck (composição descrita na Tabela 3.4 anterior), suplementado com 25mg de L-fenilalanina em Erlenmeyers de 250 mL. O experimento foi realizado em quadruplicata e quatro Erlenmeyers foram mantidos como controle sem a adição do aminoácido para posterior comparação quantitativa e estimativa da produção de brasiliamida A com e sem a suplementação do aminoácido no meio de cultivo.

O meio de cultura referente aos experimentos foi esterilizado em autoclave vertical durante 15 minutos à temperatura de 121°C e 1atm de pressão. Em seguida, os Erlenmeyers contendo meio de cultura foram inoculados com 100 µL da suspensão de esporos preparada no item 3.4.1 anterior. O crescimento do fungo se deu durante 20 dias e após este período, realizou-se filtração à vácuo e ao filtrado adicionou-se acetato de etila (AcOEt) (2x 30 mL) para realização de partição líquida em funil de separação. Ao micélio foram adicionados 50 mL de etanol (EtOH) e após um período de 12 h, o material foi separado por filtração a vácuo, obtendo-se o extrato do micélio de *P. brasilianum*.

Uma vez obtidos, os extratos referentes ao experimento foram analisados através das técnicas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, e as condições de análise são descritas no item 3.4.4.

### **3.4.3 - Estimativa da produção de brasiliamidas pelo fungo *P. brasilianum* cultivado em diferentes meios de cultura**

Com o objetivo de estimar a produção da substância brasiliamida A em diferentes meios de cultivo, no sentido de otimização desta produção, o fungo foi cultivado em meios líquidos e sólidos e posteriormente comparados de maneira quantitativa. A tabela 3.9 resume o procedimento para a preparação de cada um dos meios utilizados no experimento.

TABELA 3.9 - Cultivo do fungo em diferentes meios de cultura

<b>Meio de cultura utilizado</b>	<b>Protocolo utilizado</b>
Arroz (meio sólido)	70 g em 60 mL de água destilada, autoclavados 2x 40min.
Arroz suplementado com Phe	70 g e 25 mg de Phe em 60 mL de água destilada, autoclavados 2x 40min.
Canjica (meio sólido)	70 g em 60 mL de água destilada, autoclavados 2x 40min.
Czapeck (meio líquido)	50 mL de meio (tabela 3.5) autoclavado 1x por 15 minutos
Czapeck suplementado com Phe (meio líquido)	50 mL de meio + 25 mg de Phe (tabela 3.5) autoclavado 1x por 15 minutos

O micro-organismo foi cultivado em meio sólido durante 28 dias, tempo de crescimento otimizado em estudos anteriores (FILL, 2009) através do estabelecimento de curvas de produção neste substrato. Após este período, foram adicionados 30 mL de AcOEt e 70 mL de metanol (MeOH) e após 12 h

de extração em repouso, o fungo foi filtrado à vácuo. Realizou-se ainda partição líquido-líquido com AcOEt (2x 30mL) e posteriormente concentrou-se o extrato obtido em rotaevaporador rotativo.

O tempo de cultivo em meio líquido Czapeck também foi otimizado em estudos anteriores através da construção de curvas de produção neste meio de cultura e estabeleceu-se a máxima produção das brasiliamidas em 18 dias de crescimento (FILL, 2009), sendo este o período de cultivo ótimo do fungo *P. brasilianum* em meio líquido Czapeck para estudo destes metabólitos secundários. Após este período, o fungo foi filtrado à vácuo. Ao filtrado adicionaram-se 30 mL de AcOEt para realização da partição líquido-líquido e ao micélio adicionou-se EtOH e extraiu-se durante 12 h, em seguida, o extrato foi concentrado em rotaevaporador.

As estimativas da produção de brasiliamidas em diferentes meios de cultura foram realizadas através de experimentos por HPLC/UV-MS que são descritos no item 3.4.4 abaixo.

#### **3.4.4 - Análises por HPLC/UV-MS e HPLC/UV-MS/MS dos experimentos relacionados à biossíntese das Brasiliamidas**

Para as análises dos extratos obtidos nos itens 3.4.2 e 3.4.3 via HPLC/UV-MS, foi utilizada uma coluna de fase reversa, PHENOMENEX Synergi 4u Fusion 250 x 4.6 mm (5 $\mu$  de diâmetro de poro) e como fase móvel um gradiente entre água e MeOH ambos suplementados com 0,1% de TFA (ácido trifluoracético). O método testado teve uma variação do gradiente da seguinte forma:

Método: 0-15 min 30-70% MeOH; 15-30 min 70-90% MeOH; 30-31 min 90-100% MeOH

A fase móvel foi filtrada e degaseificada por 20 minutos em banho de ultra-som antes de ser utilizada. A vazão foi de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>, o volume

injetado foi de 10 µL no método utilizado e o solvente utilizado para dissolução dos extratos foi metanol. As condições de ionização por ESI no modo positivo de ionização para as amidas estão descritas na Tabela 3.10.

TABELA 3.10 - Condições do espectrômetro de massas para (ESI+)

Temperatura da fonte (°C)	30
Temperatura do probe (°C)	300
Capilar (kV)	3.81
Cone (V)	17
Extrator (V)	6
Lentes RF (V)	0.59

Estudou-se a fragmentação das amidas por *electrospray* (ESI) e decomposição induzida por colisão (CID) e a partir desses dados, pode-se estabelecer os melhores experimentos para a detecção seletiva dessas substâncias nos meios de cultura. Pôde-se, a partir dos fragmentos observados nos espectros de íons produtos, determinar os canais de SRM (*Selected Reaction Monitoring*) para a substância brasiliamida A, com o objetivo de estimar a produção deste compostos nos diferentes experimentos propostos nos itens 3.4.2 e 3.4.3. As condições utilizadas nas análises no modo SRM de aquisição estão resumidas na tabela 3.11 abaixo.

TABELA 3.11 - Condições de SRM para a substância brasiliamida A

<i>Parent ion</i> ( <i>m/z</i> )	<i>Daughter ion</i> ( <i>m/z</i> )	<i>Inter channel- delay</i> (s)	<i>Dwell</i> (s)	<b>Energia de colisão (eV)</b>
439	380	0,03	0,5	10
439	338	0,03	0,5	10

### **3.4.5 - Cultivo do fungo *P. brasilianum* em meio líquido suplementado com ácido cinâmico**

No intuito de verificar a incorporação do ácido cinâmico, produto direto da L-fenilalanina através da reação enzimática proporcionada pela enzima Fenilalanina amônia-liase na rota biossintética das brasiliamidas, o fungo *P. brasilianum* foi cultivado em meio líquido Czapeck enriquecido com 2% de extrato de levedura, assim como descrito na tabela 3.4 anterior e foram adicionados 25mg do ácido cinâmico em três Erlenmeyers de 250mL contendo 50mL de meio de cultura cada um. Três Erlenmeyers foram mantidos como controle para posterior comparação qualitativa. O procedimento de esterilização e inoculação do micro-organismo foi o mesmo verificado no item 3.4.2 anterior.

### **3.4.6 - Cultivo do fungo *P. brasilianum* em meio líquido enriquecido com d<sub>7</sub>-ácido cinâmico.**

O micro-organismo *P. brasilianum* foi cultivado em meio líquido suplementado com d<sub>7</sub>-ácido cinâmico, para a determinação e comprovação da rota biossintética das brasiliamidas. Para este estudo, o fungo foi cultivado segundo as mesmas condições descritas no item 3.4.2 anterior, onde três Erlenmeyers foram suplementados com d<sub>7</sub>-ácido cinâmico e três frascos foram mantidos como controle. Os procedimentos de esterilização e inoculação também seguiram as mesmas condições descritas no item 3.4.2 anterior.

### **3.4.7 - Ensaio de inibição do fungo *P. brasilianum* frente ao ácido cinâmico**

A atividade antifúngica de *P. brasilianum* frente ao ácido cinâmico foi investigada através de ensaios de inibição de crescimento do fungo em placas de Petri, contendo meio BDA e a atividade foi avaliada através da medição dos halos de crescimento do micro-organismo.

Neste sentido, foi preparado inicialmente meio sólido BDA, cuja composição é especificada: 6,0 g de dextrose; 30,0 g de batata; 2,5 g de ágar e 150 mL de água destilada. Após o preparo do meio BDA, adicionou-se ácido cinâmico ao meio numa concentração final de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivamente. O experimento foi realizado em quadruplicatas. Outras quatro placas de Petri foram mantidas como controle apenas com meio BDA, sem a adição de ácido cinâmico, para posteriormente realizar a medição e comparação dos halos de crescimento do fungo *P. brasilianum*, relacionando-os à atividade antifúngica do ácido cinâmico.

Depois de devida esterilização em autoclave durante 15 minutos a 121 °C e 1 atm de pressão, o fungo *P. brasilianum* foi inoculado de maneira homogênea em todas as placas de Petri contendo meio sólido BDA, com o auxílio de um furador de diâmetro igual a 3 mm. Os halos de crescimento das quadruplicatas foram medidos após cinco dias de cultivo.

#### **3.4.8 - Ensaio de inibição de crescimento do fungo *P. brasilianum* frente a diferentes cinamatos.**

Outros substratos testados com relação a atividade antifúngica de *P. brasilianum* foram os compostos: ácido 4-metoxicinâmico e ácido 3,4-metilenodioxicinâmico, ambos sintetizados em estudos anteriores no grupo LaBioMMi. O procedimento para a realização dos ensaios antifúngicos foi semelhante ao descrito no item 3.4.7 anterior. As concentrações testadas foram 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivamente em quadruplicata cada uma delas.

#### **3.4.9 - Avaliação da atividade da enzima Fenilalanina amônia-liase (PAL) produzida pelo fungo *P. brasilianum***

Com o conhecimento de que as amidas bis-fenilpropanoídicas parecem ser biossintetizadas via o caminho dos fenilpropanóides, a primeira

enzima da rota biossintética destes metabólitos secundários, a fenilalanina amônia-liase teve sua atividade avaliada.

Inicialmente, cinco frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura líquido Czapeck suplementado com 2% de extrato de levedura (tabela 3.4), foram inoculados, depois de devida esterilização, com esporos do micro-organismo *P. brasilianum*.

O fungo cresceu durante cinco dias sob agitação de 120 rpm a 25 °C e após este período, filtrado à vácuo e transferido à 30mL de tampão tris-HCl (25 mM) pH 8.8. Em seguida, no intuito de verificar a produção da enzima PAL, foram realizados ensaios enzimáticos através da adição de L-fenilalanina 2,5 mM. Após 30 minutos, a reação enzimática realizada com as células ressuspensas em tampão foi terminada com a adição de HCl 0,5 M. Dois frascos foram mantidos como controle sem a adição de L-fenilalanina.

Após o término da reação, o produto da reação enzimática, o ácido cinâmico foi extraído com partição com AcOEt (2x 30 mL). A formação de ácido cinâmico a partir da L-fenilalanina pode ser monitorada a partir de análises por MS.

Nas análises por espectrometria de massas, no intuito de visualizar o produto da reação enzimática, realizaram-se experimentos de inserção direta no modo de ionização negativo, utilizando-se ESI/MS, num espectrômetro triplo quadrupolo-WATERS.

A vazão utilizada nas análises foi de 0.3mL.min<sup>-1</sup> (ACN) e o solvente utilizado para dissolução dos extratos foi MeOH, e as condições para o ácido cinâmico estão descritas na Tabela 3.12:

TABELA 3.12 - Condições do espectrômetro de massas para o ácido cinâmico (ESI-)

Temperatura da fonte (°C)	50
Temperatura do probe (°C)	330
Capilar (kV)	3.22
Cone (V)	41
Extrator (V)	6
Lentes RF (V)	0.71

### **3.4.10 - Protocolo para obtenção do extrato enzimático de *P. brasilianum***

Uma vez que não existem relatos da extração da enzima PAL a partir do micro-organismo em estudo, dois diferentes protocolos foram testados e avaliados a partir de eletroforese em gel denaturante de poliacrilamida 15% (LAEMMLI, 1970). A preparação do extrato enzimático (protocolo 1) foi realizada no laboratório de Biossíntese da Unesp-Araraquara sob a supervisão da Prof. Dra. Maysa Furlan e do Prof. Dr. Fernando Continguiba.

O tampão utilizado na extração enzimática das células de *P. brasilianum* continha 100 mL de tampão Tris 25 mM, pH=8.8; EDTA 1 mM; sacarose 250 mM; DTT 15 mM e ascorbato de sódio 40 mM. Após a solubilização dos reagentes (sob agitação), foi adicionado 10% de glicerol (10 mL; v/v) e PVPP, na proporção de 20% em relação à massa de material fúngico (a cada 20 g de micélio, 4 g de PVPP foi utilizado).

O micélio do micro-organismo foi em seguida colocado em nitrogênio líquido, e triturado em almofariz com auxílio de pistilo e N<sub>2</sub>. Em seguida, foram adicionados 50 mL de tampão preparado anteriormente. Esta mistura foi muito bem triturada e posteriormente mantida em banho de gelo por 10 minutos sob agitação suave.

As amostras foram posteriormente filtradas em gaze e recolhidas e equilibradas em tubos próprios para a centrifuga. As amostras foram



centrifugadas por 15 minutos a 10000g (9150 rpm) durante 15 minutos. Ao sobrenadante, foi adicionado uma solução 1M de  $MgCl_2$  necessário para atingir uma concentração de 30mM. A solução foi então agitada sob banho de gelo por 20 minutos e centrifugada a 40000g. O precipitado e o sobrenadante foram utilizados como fonte enzimática. Na figura 3.1 esta exibido o esquema indicando as etapas realizadas no protocolo 1 de extração enzimática.

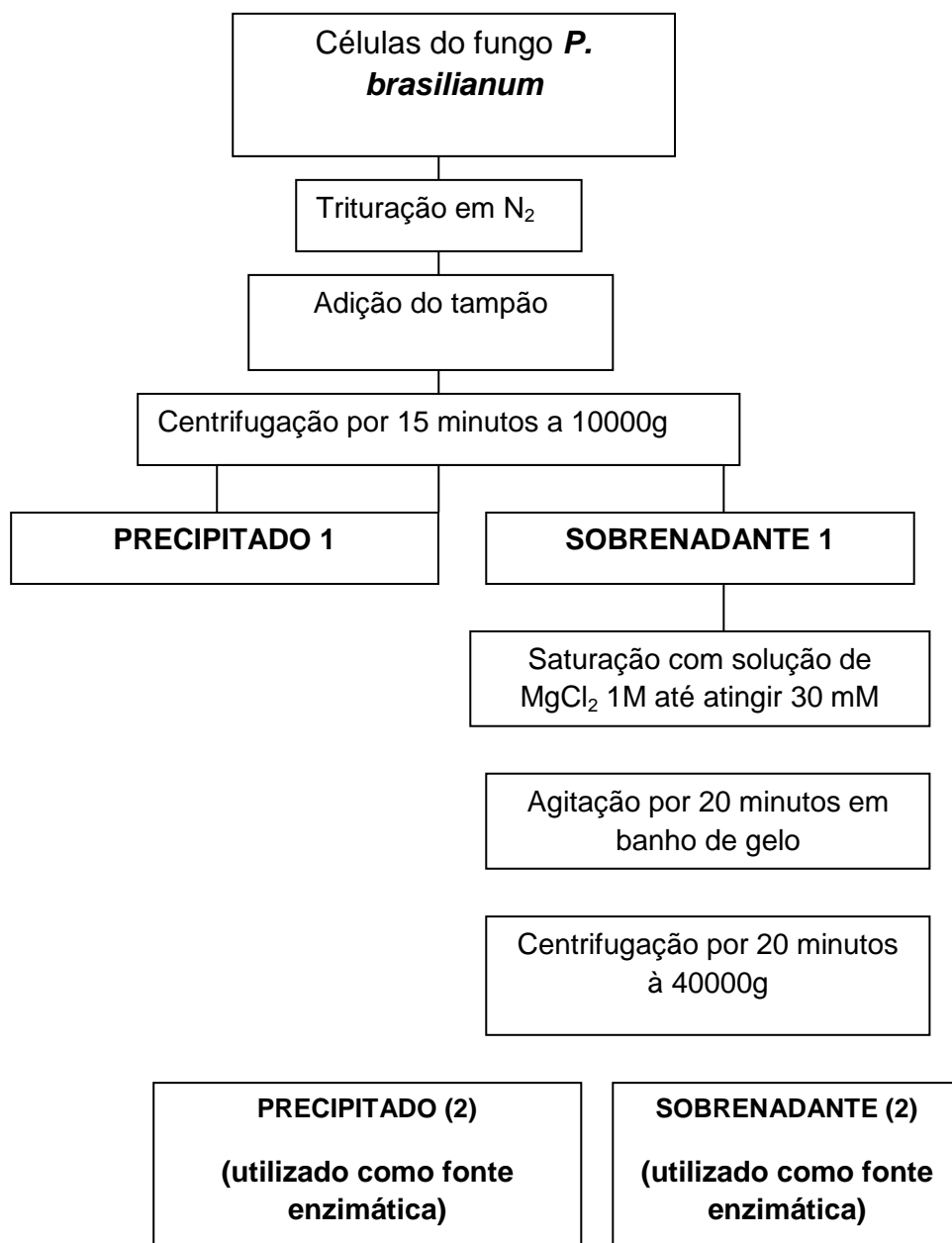


FIGURA 3.1 - Protocolo 1 para obtenção de extrato enzimático.

Posteriormente, determinou-se a concentração protéica das amostras (extratos enzimáticos obtidos das células de *P. brasilianum*) quantificadas pelo método de BRADFORD (1976).

Inicialmente, no intuito de simplificar o procedimento descrito anteriormente (protocolo 1), um protocolo mais simplificado (procolo 2) foi desenvolvido. Neste protocolo, o micro-organismo foi cultivado em meio de cultura líquido Czapeck enriquecido com 2% de extrato de levedura durante cinco dias sob agitação de 120 rpm. Em seguida, as células do fungo foram filtradas e colocadas em nitrogênio líquido e trituradas em almofariz com auxílio de pistilo. Em seguida, foram adicionados 10mL de tampão tris-HCl 25mM pH 8.8. Esta mistura foi muito bem triturada e posteriormente mantida em banho de gelo por 10 minutos sob agitação suave.

As amostras foram posteriormente filtradas equilibradas em tubos próprios para a centrífuga. As amostras foram centrifugadas a 10000g (9150 RPM) durante 15 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi utilizado como fonte enzimática.

O extrato enzimático preparado segundo o protocolo 2 também foi avaliado em gel de poliacrilamida SDS PAGE (monodimensional), conforme mencionado anteriormente. O gel foi em seguida revelado com auxílio de Comassie Blue.

### **3.4.11 - Ensaios enzimáticos para detecção da atividade da enzima PAL**

Foram realizados ensaios enzimáticos com o sobrenadante 1, precipitado 1 e sobrenadante 2, obtidos a partir do protocolo 1 descrito no item 3.4.10, assim como ensaios enzimáticos com o sobrenadante obtido no protocolo 2, com o objetivo de verificar se a enzima foi extraída com eficiência. Os ensaios enzimáticos foram realizados com a adição de 100 µL do aminoácido L-fenilalanina (20 mM) e 100 µL de cada extrato enzimático obtido

respectivamente em micro-tubos e a reação enzimática foi incubada durante 30 minutos numa temperatura de 45°C. Na tabela 3.13 apresentada, verifica-se os códigos utilizados nas análises no intuito simplificar as discussões.

TABELA 3.13 - Códigos utilizados nos ensaios enzimáticos

---

1	100 µL do sobrenadante 1 (controle)
2	100 µL do sobrenadante 1 (controle)
3	100 µL do sobrenadante 1+ 100 µL de fenilalanina
4	100 µL do sobrenadante 1+ 100 µL de fenilalanina
5	100 µL do precipitado 2 (controle)
6	100 µL do precipitado 2 (controle)
7	100 µL do precipitado 2+ 100 µL de fenilalanina
8	100 µL do precipitado 2+ 100 µL de fenilalanina
9	100 µL do sobrenadante 2 (controle)
10	100 µL do sobrenadante 2 (controle)
11	100 µL do sobrenadante 2+ 100 µL de fenilalanina
12	100 µL do sobrenadante 2+ 100 µL de fenilalanina

---

Em seguida, os extratos das reações enzimáticas foram analisados via HPLC/UV-MS/MS para o monitoramento da produção do ácido cinâmico, produto da reação com PAL. As condições para a realização das análises são descritas no item 3.4.9.

### 3.4.12 - Protocolo para fracionamento do extrato enzimático de *P. brasilianum* através de precipitação fracionada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Após a obtenção do extrato enzimático de acordo com os protocolos descritos anteriormente, foi realizada uma precipitação fracionada com sulfato de amônio. A concentração de sulfato de amônio a ser adicionada para atingir a saturação desejada foi determinada utilizando a tabela descrita 3.14.

TABELA 3.14 - Precipitação com sulfato de amônio – quantidade de sal a ser adicionado a 0 °C.

Saturação (%)	Sulfato de amônio (g.L <sup>-1</sup> )
0 – 25	134
25 – 55	179
55 – 80	161

Inicialmente, adicionou-se sulfato de amônio no intuito de atingir a saturação de 25%. Após todo o sal ter sido adicionado, a solução foi mantida sob agitação por 10 minutos em banho de gelo e posteriormente centrifugada a 10.000 g por 30 minutos. O precipitado foi congelado a -20 °C e o sobrenadante foi levado a 55% de saturação, como descrito anteriormente. Uma última adição de sulfato de amônio foi realizada para que o sobrenadante atingisse 80% de saturação. Retirou-se o sulfato de amônio adicionado ao extrato com o auxílio de uma membrana de diálise contra tampão tris-HCl 25 mM.

Os precipitados obtidos após o fracionamento foram submetidos a testes de atividade da enzima PAL no intuito de determinar a fração ativa. Em seguida, os extratos resultantes da reação enzimática foram analisados via

HPLC/UV-MS sob as mesmas condições descritas no item 3.4.9. com o objetivo de avaliar a produção do ácido cinâmico.

### **3.4.13 - Ensaios enzimáticos quantitativos com a enzima Fenilalanina amônia-liase**

No intuito de verificar a influência do aminoácido na produção da primeira enzima da rota biossintética dos compostos em estudo, o fungo foi cultivado em meio líquido Czapeck (2% extrato de levedura) na presença de Phe ( $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) e na ausência do aminoácido respectivamente para posterior avaliação quantitativa. O cultivo foi realizado de maneira estática a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo em cada um deles. O extrato enzimático foi obtido seguindo o procedimento descrito no item 3.4.11, seguido de precipitação salina e ensaios de atividade também descritos anteriormente.

Em seguida, foram realizados ensaios de atividade visando à produção e detecção de ácido cinâmico, produto da reação enzimática. O ensaio enzimático foi realizado adicionando-se a um micro-tubo 250  $\mu\text{L}$  de tampão tris-HCl 25 mM (pH 8,8) e 125  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático. A reação foi então iniciada com a adição de 150  $\mu\text{L}$  de L-fenilalanina (10 mM) e incubada a  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  sob agitação. Após 3 horas a reação foi finalizada com a adição de 25  $\mu\text{L}$  de HCl (6M). A solução foi agitada e centrifugada a 13.000 rpm por dois minutos e o sobrenadante submetido a análise por HPLC/UV.

Utilizou-se nas análises uma coluna cromatográfica PHENOMENEX LUNA Phenyl-hexyl (fase reversa) 250 x 4,6 mm (5 $\mu$ ) e utilizou-se o modo de eluição isocrático na proporção de 65:35 MeOH, água, ambos suplementados com 0,1% de ácido trifluoracético (TFA). Prepararam-se também brancos (triplicata) utilizando-se somente o extrato enzimático sem a adição do substrato, para controle da análise. Os brancos foram submetidos aos mesmos tratamentos das reações completas.

### 3.4.14 - Cultivo do fungo *P. brasilianum* em diferentes meios de cultivo visando a otimização da produção da enzima PAL

O fungo foi cultivado em quatro diferentes meios de cultura e posteriormente a produção de PAL pode ser quantificada a partir da produção do ácido cinâmico produzido a partir do aminoácido Phe nos ensaios de atividade com a enzima estudada. Os quatro meios de cultura testados são destacados na tabela 3.15 abaixo.

TABELA 3.15 - Composição dos meios de cultura utilizados no experimento

Meio de cultura	Composição
Meio BD	Batata 200 g, Dextrose 40 g, 1 L H <sub>2</sub> O
Meio Czapeck 2% extrato de levedura	Descrito na tabela 3.4
Meio Malte	Extrato de malte 10 g, extrato de levedura 1 g e phe 1 g, 1L H <sub>2</sub> O
Meio Beef	Extrato de Beef 10 g, Extrato de levedura 10 g, Phe 5 g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.0 g, KHPO <sub>4</sub> 3.0 g e MgSO <sub>4</sub> 0.5 g em 1L H <sub>2</sub> O

Depois de preparados, os experimentos foram devidamente esterilizados em autoclave durante 15 minutos à temperatura de 121 °C e 1 atm de pressão. Em seguida, pequenos fragmentos do meio BDA contendo micélio e esporos do micro-organismo em estudo foram transferidos assepticamente para os frascos. O crescimento do fungo se deu durante três dias sob 120rpm de agitação. Em seguida, preparou-se o extrato enzimático seguindo o procedimento descrito no item 3.4.11. Em todos os experimentos a massa

micelial de partida para a obtenção do extrato enzimático foi a mesma (20g) para posterior comparação quantitativa da produção de PAL. Os extratos foram submetidos a precipitação com sulfato de amônio conforme item 3.4.12 e foram realizados ensaios de atividade para as frações obtidas em triplicata (item 3.4.13). O produto da reação enzimática foi analisado por HPLC/UV conforme descrito no item 3.4.13 e a partir das áreas obtidas pode-se determinar o meio de cultura com maior influência na produção da enzima em estudo.

### **3.4.15 - Otimização das condições de incubação da reação enzimática de PAL**

Os parâmetros avaliados nas reações foram temperatura (38, 50 e 60 °C), pH (7,8, 8,8 e 10,2) e tempo de incubação (24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 e 120 h). As reações foram realizadas em triplicata em microtubos conforme descrito no item 3.4.13 avaliando inicialmente o pH e a temperatura e, uma vez otimizados, o tempo de incubação.

A produção de ácido cinâmico foi monitorada através de análises por HPLC/UV (item 3.4.13) e, a partir das áreas geradas nos cromatogramas, pôde-se determinar os melhores parâmetros de incubação. Os dados foram avaliados no software estatística pela Prof. Dra. Andréia Morandim-Giannetti.

### **3.4.16 - Purificação da enzima PAL produzida pelo fungo *P. brasilianum***

Com base em dados da literatura com relação à purificação da enzima fenilalanina amônia-liase a partir de outras fontes desta proteína, dois protocolos de purificação protéica foram realizados e são descritos a seguir.

Inicialmente, o precipitado com 55% de saturação obtido através da adição de sulfato de amônio ao extrato enzimático (item 3.4.12) foi ressuspendido em 3 mL de tampão tris-HCl pH 8.8 e dessalinizado com auxílio

de uma membrana de diálise. Em seguida, este extrato foi submetido à cromatografia de troca iônica. A coluna utilizada foi uma aniônica DEAE FF 1 mL e utilizou-se como fase móvel tampão tris-HCl 25 mM pH 8.8 na bomba A e tampão tris-HCl 25 mM pH 8.8 com 1 M NaCl na bomba B com gradiente linear de sal em 20 volumes de coluna (cv) e uma vazão de  $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

As frações desta etapa foram submetidas a teste de atividade e a eletroforese SDS-PAGE 15% para localizar as frações enriquecidas na proteína estudada e verificar a eficiência do processo. Em seguida, as frações que foram ativas para a enzima PAL foram reunidas, concentradas no centricom® e dessalinizadas em membrana de diálise contra tampão tris-HCl pH 8.8 com 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Posteriormente, a fração obtida da cromatografia de troca iônica foi submetida à cromatografia de hidrofobicidade (HIC). Utilizou-se uma coluna Phenyl FF (low sub) 1 mL e como fase móvel tampão tris-HCl 25 mM pH 8.8 com 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na bomba A e tampão tris-HCl 25mM pH 8.8 na bomba B com gradiente linear em 20 cv e vazão de  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . As frações foram novamente submetidas a testes de atividade e eletroforese SDS-PAGE.

No protocolo 2 de purificação, inicialmente, o precipitado com 55% de saturação foi dessalinizado em membrana de diálise contra tampão tris-HCl 50 mM pH 8.8 e submetido a cromatografia de exclusão molecular. Neste caso, utilizou-se uma coluna Superdex S200 preparativa e modo de eluição isocrático com tampão tris-HCl 50 mM pH 8.8 com 0,2 M de NaCl numa vazão de  $0,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Posteriormente, as frações que apresentaram atividade para a enzima PAL foram reunidas e concentradas em centricom® e dessalinizadas em membrana de diálise.

Em seguida, a fração obtida foi submetida a cromatografia de troca iônica, utilizando-se uma coluna DEAE FF 1mL e utilizou-se como fase móvel tampão tris-HCl 25 mM pH 8.8 na bomba A e tampão tris-HCl 25 mM pH 8.8 com 1 M NaCl na bomba B com gradiente linear de sal em 40 volumes de coluna (cv) e uma vazão de  $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .



### **3.4.17 - Digestão da enzima purificada com tripsina e identificação por espectrometria de massas**

A banda de interesse obtida no gel de poliacrilamida foi recortada com auxílio de uma lâmina de bisturi em capela de fluxo laminar para evitar contaminações e colocada em um micro-tubo. O passo posterior foi a lavagem do gel com o objetivo de remover o comassie e o SDS para as análises por espectrometria de massas. A lavagem se deu adicionando 50  $\mu\text{L}$  de uma solução 50 mM de bicarbonato de amônio e posterior incubação a temperatura ambiente por 5 minutos (Passo 1). Após este período, a solução foi removida e descartada. Em seguida, adicionaram-se 50  $\mu\text{L}$  de ACN ao gel e a incubação também se deu por aproximadamente 5 minutos (Passo 2). Os passos 1 e 2 foram repetidos até que o gel não apresentasse coloração azul.

Após a remoção do revelador comassie, foram realizadas reações de redução das pontes de dissulfeto de cisteína e consequente alquilação. Para isso, foram adicionados 20-50  $\mu\text{L}$  de uma solução 10 mM de DTT (em tampão 50 mM de bicarbonato de amônio) ao tubo (adição suficiente para cobrir o gel nos micro-tubos) e incubado durante 30 minutos a uma temperatura de 37 °C e rotação de 550 rpm em thermomixer. Em seguida, foi removida a solução de DTT e adicionado ACN aos pedaços de géis por 5 minutos. Depois de removida a acetonitrila, foram adicionados 20-50  $\mu\text{L}$  de uma solução 55 mM de iodoacetamida (em tampão 50 mM de bicarbonato de amônio) ao tubo e incubado durante 20 minutos a temperatura ambiente e na ausência de luz. Depois de removida a solução de iodoacetamida os passos 1 e 2 foram repetidos. Adicionaram ACN durante 5 minutos.

A digestão das proteínas se deu ao adicionar 100  $\mu\text{L}$  de tripsina (2  $\mu\text{g}$  de tripsina em tampão bicarbonato de amônio) e incubação por 16 h a 37 °C no thermomixer. Em seguida, os géis foram lavados com acetonitrila duas vezes consecutivas, concentrados e analisados por espectrometria de massas. As

análises foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Fábio Gozzo no Instituto de Química- UNICAMP.

### **3.4.18 - Avaliação da especificidade da enzima PAL frente à administração de diferentes substratos**

Verificou-se a especificidade da enzima estudada através da adição de diferentes substratos a reação enzimática. Os ensaios de atividade seguiram o procedimento descrito no item 3.4.13 e os substratos testados são listados abaixo:

- ❖ L-tirosina
- ❖ 4-bromo-fenilalanina
- ❖ 4-cloro-fenilalanina

Após 2 horas a reação foi finalizada com a adição de 25  $\mu$ L de HCl (6 M). A solução foi agitada e centrifugada a 14.000 rpm por um minuto. Este experimento foi realizado em triplicata e os produtos da reação foram analisados por HPLC/UV-MS conforme descrito no item 3.4.20.

### **3.4.19 - Cultivo do fungo *P. brasilianum* em meio líquido suplementado com aminoácidos halogenados**

No intuito de avaliar a adição de aminoácidos halogenados no metabolismo do fungo *P. brasilianum*, assim como uma tentativa de produção de metabólitos secundários halogenados via o caminho dos fenilpropanóides, o micro-organismo *P. brasilianum* foi cultivado em meio de cultura líquido Czapeck, descrito anteriormente, com a adição de 15 mg em três frascos de Erlenmeyer (250 mL) de cada um dos aminoácidos halogenados: 4-bromo-fenilalanina; 4-cloro-fenilalanina e 4-fluor-fenilalanina. Três frascos foram mantidos como controle do metabolismo do fungo em meio líquido Czapeck. Os diferentes meios de cultura foram esterilizados em autoclave durante 15 minutos

a 121 °C e 1 atm de pressão. Após esterilização, os meios foram inoculados de forma asséptica com 100µL da suspensão de esporos conforme procedimento descrito no item 3.4.1.

O fungo foi cultivado de forma estática durante 20 dias e em seguida, filtrado a vácuo. Ao filtrado, foram adicionados 30 mL de AcOEt para realização da partição líquido-líquido. O micélio foi extraído com 50 mL de EtOH e o extrato posteriormente concentrado em rotaevaporador.

O experimento descrito teve seu procedimento repetido sob agitação de 120 rpm com os mesmos aminoácidos halogenados para posterior comparação dos extratos e do metabolismo do micro-organismo.

Os extratos do fungo *P. brasilianum* referentes ao experimento descrito foram analisados por HPLC/UV-MS e HPLC/UV-MS/MS assim como descrito no item 3.4.20 abaixo.

### **3.4.20 - Análises por HPLC/UV-MS dos extratos referentes ao cultivo do fungo *P. brasilianum* em meio líquido suplementado com aminoácidos halogenados**

Para a realização das análises via HPLC/UV-MS dos extratos referentes ao cultivo do fungo *P. brasilianum* em meio líquido suplementado com diferentes aminoácidos halogenados foi utilizada uma coluna de fase reversa, PHENOMENEX Synergi Fusion 250 x 4.6 mm (5 µ de diâmetro de poro) e como fase móvel um gradiente entre água e MeOH ambos com a adição de 0,1% de TFA (ácido trifluoracético). O método testado teve uma variação do gradiente da seguinte forma:

Método: 0-15 min 30-70% MeOH; 15-30 min 70-90% MeOH; 30-40 min 90-100% MeOH

A fase móvel foi filtrada e degaseificada por 20 minutos em banho de ultra-som antes de ser utilizada. A vazão foi de 1mL.min<sup>-1</sup> e utilizou-se um

divisor de fluxo nas análises, sendo o volume direcionado ao espectrômetro de massas 30% do volume total. O volume injetado foi de 30µL no método utilizado e o solvente utilizado para dissolução dos extratos foi metanol. As condições de ionização por ESI no modo positivo de ionização estão descritas na Tabela 3.16.

TABELA 3.16 - Condições do espectrômetro de massas para (ESI+).

Temperatura da fonte (°C)	30
Temperatura do probe (°C)	300
Capilar (kV)	3.3
Cone (V)	20
Extrator (V)	5
Lentes RF (V)	0.66

### **3.4.21 - Avaliação de sais inorgânicos na busca de inibidores enzimáticos da atividade da enzima PAL**

Buscou-se possíveis inibidores da enzima Fenilalanina amônia-liase através da adição de diferentes sais inorgânicos ao extrato enzimático, seguido de ensaios de atividade quantitativos para determinar a porcentagem de inibição apresentada por cada um dos compostos testados.

Inicialmente, o fungo foi cultivado em meio líquido Czapeck enriquecido com 2% de extrato de levedura durante três dias sob agitação de 120 rpm. Em seguida, realizou-se a extração enzimática (item 3.4.11), seguido de precipitação salina (item 3.4.12). O precipitado com 55% de saturação foi ressuspenso em tampão tris-HCl pH 8.8 e dessalinizado em membrana de diálise. Em seguida, os ensaios de atividade com a PAL foram realizados em triplicata adicionando-se a um microtubo 250 µL de tampão Tris-HCl pH 8.8, 125 µL de solução enzimática e 150 µL de solução de diferentes possíveis inibidores enzimáticos na concentração de 1 mM (MgCl<sub>2</sub>, KCl, FeCl<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>,

CuCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>). A reação foi iniciada com a adição de 150 µL do aminoácido Phe. Foi realizado um controle sem a adição de nenhum inibidor. Neste caso, adicionaram-se 150 µL de tampão à reação. A reação foi terminada depois de 2 h através da adição de 25 µL de HCl 6 M.

A porcentagem de inibição apresentada para cada um dos compostos testados como inibidores da enzima PAL foi avaliada a partir da quantificação do produto da reação enzimática, o ácido cinâmico, que foi avaliado através de análises por HPLC/UV conforme descritas no item 3.4.13.

### **3.4.22 - Estudo da adição de inibidores enzimáticos *in vivo***

O estudo *in vivo* da adição de inibidores enzimáticos da enzima PAL foi avaliado no sentido de verificar comportamento da produção das brasiliamidas pelo fungo *P. brasilianum* em condições de inibição enzimática. Dessa maneira, o fungo foi cultivado em meio líquido Czapeck com a adição de CuCl<sub>2</sub> na concentração final de 1 mM ao meio de cultivo em triplicata de maneira estática durante 18 dias. Três frascos foram mantidos como controle sem a adição deste sal para posterior avaliação quantitativa da produção de brasiliamidas. Em seguida, as extrações foram realizadas como descrito no item 3.4.3 e analisadas por HPLC-MS com condições otimizadas e descritas no item 3.4.4 anterior.

### **3.4.23 - Extração de DNA genômico de hifas de *P. brasilianum***

Foram inoculados 10<sup>7</sup> esporos do fungo em 50 mL de meio Czapeck por 72 horas a 25 °C a 200 rpm de agitação em um frasco Erlenmeyer de 250 mL. O material foi transferido para um tubo de 50 mL e centrifugado a 4000rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C até o momento do uso. O conteúdo congelado foi transferido para um almofariz

contendo nitrogênio líquido e pulverizado com o pistilo. Em seguida, 100 mg do pó foram rapidamente transferidos para um micro-tubo contendo 400  $\mu\text{L}$  de tampão de extração (Tabela 3.2). Adicionaram-se 400  $\mu\text{L}$  de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e agitou-se em misturador do tipo vortex por dez minutos. Em seguida, centrifugou-se o tubo a 12000 rpm por 10 minutos e transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo. Adicionaram-se 300  $\mu\text{L}$  de clorofórmio, e o passo da centrifugação foi repetido. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e a ela foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Após ser misturado por inversão, o tubo foi incubado cinco minutos em freezer - 80 °C. Centrifugou-se o material a 13000 rpm por quatro minutos e descartou-se o sobrenadante. Ao “pellet” foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de etanol 70%, sendo seguido de centrifugação a 13000 g por um minuto. O sobrenadante foi descartado e, após secagem, o precipitado foi ressuspenso em 30  $\mu\text{L}$  de água Milli Q.

#### **3.4.24 - Amplificação de parte do gene PAL utilizando *primers* degenerados**

Baseado em análises de alinhamentos das sequências da proteína PAL de organismos similares a *P. brasilianum* (*P. marneffei* e *P. chrysogenum*) realizados no software *ClustalW2* (*Multiple sequence alignment*) foi possível realizar o desenho de oligonucleotídeos degenerados baseado em regiões conservadas do gene com o intuito de amplificação de parte do gene que codifica a enzima PAL. Foram desenhados dois *primers* sense baseados em duas diferentes regiões conservadas do gene e três *primers* anti-sense. Seis diferentes reações de polimerase em cadeia (PCR) foram testadas. As combinações de *primers* utilizadas nas reações de PCR foram Fw1 x Rev1; Fw1 x Rev2; Fw1 x Rev3; Fw2 x Rev1; Fw2 x Rev2; Fw2 x Rev3.

Nas reações de PCR para amplificação do gene codificador da PAL foram utilizados DNA molde 30  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  de cada *primer*

(oligonucleotídeo), 25 µL de Phusion<sup>®</sup> Master Mix contendo 0,04 U/µL de enzima Phusion<sup>®</sup> DNA Polymerase (New England Biolabs), tampão de reação 1x (Tris-HCl 100 mM pH 8,5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 400 µM de dNTPs, e 3% DMSO; foi adicionado ainda água para completar um volume de 50 µL. As reações foram realizadas em um termociclador Applied Biosystems GeneAmp<sup>®</sup> PCR system 9700 programado conforme a Tabela 3.17, sendo que a segunda, terceira e quarta etapa se repetem 30 vezes em ciclo.

TABELA 3.17 - Programa do termociclador nas reações de PCR do gene *PAL*.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
1 <sup>a</sup> – Início	98 °C	3 minutos
2 <sup>a</sup> – Desnaturação	98 °C	30 segundos
3 <sup>a</sup> – Anelamento	55 °C	30 segundos
4 <sup>a</sup> – Extensão	72 °C	30 segundos
5 <sup>a</sup> – Finalização	72 °C	5 minutos

Em seguida, com o objetivo de verificar a amplificação de fragmentos das reações de PCR, efetuou-se um gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> deixado correr por uma hora a 100 V. O gel foi revelado em transiluminador UV.

Os produtos das amplificações foram purificados com o kit MinElute<sup>®</sup> Qiagen, segundo especificações do fabricante.

### **3.4.25 - Sequenciamento dos amplicons**

Os produtos obtidos pela reação de PCR anterior foram sequenciados em um sequenciador Applied Biosystems 3730xl DNA Analyser, utilizando a técnica dos dideoxinucleotídeos, de acordo com a metodologia

descrita por SANGER (1997), utilizando os mesmos *primers* utilizados na reação de PCR.

### **3.4.26 - Sequenciamento do genoma do fungo *P. brasilianum***

O DNA do fungo *P. brasilianum* utilizado no sequenciamento foi obtido conforme procedimento descrito no item 3.4.23 anterior. O genoma do micro-organismo em estudo foi sequenciado em parceria a unidade de sequenciamento do Departamento de Bioquímica da Universidade de Cambridge no Reino Unido, utilizando para isso a plataforma *Solexa* da Illumina. A construção de uma biblioteca de DNA genômico se deu com o auxílio do kit Illumina library Nextera™ DNA. Posteriormente, o genoma foi novamente sequenciado utilizando a plataforma *454 FLX* da Roche. Os dados obtidos a partir de ambos os sequenciamentos foram submetidos a *assembly* em parceria com a pesquisadora Louise Cerdeira Teixeira do Instituto Fleury - São Paulo.

### **3.4.27 - Extração de RNA totais**

A principal preocupação na extração de RNA consiste na sua degradação por ribonucleases (RNAses), que são enzimas extremamente resistentes a vários tratamentos, inclusive térmicos (fervura, autoclavagem, etc.). Para diminuir a contaminação com RNAses nas soluções, equipamentos, vidrarias e reagentes é recomendável tratá-los com autoclavagem e DEPC (dietilpirocarbonato), que é um forte inibidor de RNAses.

Para o preparo de todas as soluções necessárias utilizou-se água livre de RNase (tratada com 0,05% de DEPC, um inibidor de RNAses). Todos os materiais utilizados para a extração e manipulação de RNA foram tratados por 1 hora em solução 0,01% de SDS; seguido de enxágüe de todo o material em água destilada. Em seguida, todo o material foi deixado imerso *overnight* em



solução 0,05% de DEPC (v/v). Retirou-se todo o material da solução de DEPC, sem enxaguar, e autoclavou-se por 20 minutos a 120 °C.

O RNA total foi obtido a partir de uma cultura do fungo, crescida por 3 dias em meio de cultura líquido indutor Czapeck suplementado com 0,5g/L do aminoácido L-fenilalanina, estéril e sob agitação de 150 rpm a 25 °C. Aproximadamente 120-130 mg do micélio foram coletados em fluxo laminar previamente preparado. Em seguida, macerados em nitrogênio líquido com o auxílio de almofariz e pistilo. A partir disso, iniciou-se o procedimento de extração de RNA totais utilizando-se o kit RNeasy Plant Mini Kit seguindo as especificações do fabricante. O RNA obtido no final do experimento foi então dissolvido em 30µL de água livre de RNase.

#### **3.4.28 - Estimativa da quantidade e qualidade dos RNAs totais**

A quantidade das amostras de RNA total foi avaliada utilizando-se 1 µL de amostra por espectrofotometria, utilizando-se o aparelho espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop®).

#### **3.4.29 - Construção do cDNA**

A construção do cDNA que codifica a enzima PAL foi realizada com auxílio do kit cDNA synthesis da Roche seguindo as instruções do fabricante.

Uma vez obtido o cDNA, este foi amplificado exponencialmente utilizando PCR. Os oligonucleotídeos utilizados nesta amplificação do gene PAL, por reação de polimerase em cadeia (PCR), foram desenhados com base no gene *pal* obtido nas informações obtidas do sequenciamento do genoma e de acordo com o vetor a ser utilizado na posterior etapa de clonagem. Em todos os casos, as enzimas de restrição utilizadas foram *Bam HI* (G↓GATCC) e *Hind III* (

A↓AGCTT) inseridas nos *primers* utilizados descritos no item 3.2 para posterior ligação nos vetores descritos.

As reações de PCR foram realizadas de acordo com o item 3.4.24 descrito anteriormente. As reações foram realizadas em um termociclador Applied Biosystems GeneAmp® PCR system 9700 programado conforme a Tabela 3.18, sendo que a segunda, terceira e quarta etapa se repetem 30 vezes em ciclo. A etapa de anelamento foi realizada com gradiente de temperatura conforme descrito na tabela 3.18.

TABELA 3.18 - Programa do termociclador nas reações de PCR do gene *PAL*.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
1 <sup>a</sup> – Início	98 °C	3 minutos
2 <sup>a</sup> – Desnaturação	98 °C	30 segundos
3 <sup>a</sup> – Anelamento	72 °C-0,2°C	30 segundos
4 <sup>a</sup> – Extensão	72 °C	30 segundos
5 <sup>a</sup> – Finalização	72 °C	5 minutos

Em seguida, com o objetivo de verificar a amplificação de fragmentos do gene da PAL, efetuou-se um gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídio 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> deixado correr por uma hora a 100 v. O gel foi revelado em transiluminador UV.

Os produtos das amplificações foram purificados com o kit MinElute® Qiagen, segundo especificações do fabricante.

### **3.4.30 - Ligação do gene da PAL nos vetores de expressão pET28a(+); pET24 e pETSUMO**

O DNA codificador da enzima fenilalanina amônia-liase foi digerido para que pudesse ser inserido diretamente nos plasmídeos de expressão pET28a, pET24(+) e pETSUMO. Nesta reação utilizou-se tampão 4 (50 mM de Acetato de Potássio, 20 mM Tris-Acetato, 10mM Acetato de Magnésio, 1 mM de ditioneitol, pH 7.9), e 10U das enzimas de *Bam HI-HF* e *Hind III* para digestão de aproximadamente de 3 µg de DNA.

Os fragmentos de DNA clivados da PAL foram recuperados em gel de agarose 1% e purificados com kit.

Antes da ligação, os vetores pET28a, pET24(+) e pETSUMO foram digeridos pelo mesmo procedimento utilizado na digestão do gene da PAL. Após a digestão, a reação foi aplicada em um gel de agarose 1% e a banda referente ao vetor clivado foi recuperada com o auxílio do kit MinElute<sup>®</sup> Qiagen.

Na ligação do gene da PAL ao vetor de expressão gerando o plasmídeo desejado foram utilizados 5 U da enzima T4 DNA Ligase (Fermentas) e tampão de reação contendo Tris-HCl 250 mM pH 7.6, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, ATP 5 mM, DTT 5 mM e 25% (m/v) polietileno glicol-8000. As reações de ligação foram mantidas a 16°C por 24 horas. A proporção vetor: inserto foi de 5:1 em todas as reações.

Após a ligação, fez-se a transformação em células de *E. coli* DH10B e os recombinantes foram selecionados por PCR de colônia, utilizando-se os mesmos oligonucleotídeos da amplificação. As colônias recombinantes foram crescidas em meio de cultura LB (Luria Bertani), por 16 horas e os plasmídeos contendo o gene da PAL foram purificados com kit E.Z.N.A plasmid purification kit, Omega.

O mesmo procedimento foi realizado na clonagem do gene da PAL no vetor pET24(+) que expressa a proteína com uma cauda poli-his C-terminal, utilizando para isso os oligonucleotídeos descritos no item 3.2. Finalmente, a clonagem do gene da PAL no vetor pET24(+) para a expressão da enzima sem fusão se deu através da amplificação do gene de interesse com os primers sense PAL\_Fw\_pet24 Ctag e antisense PAL\_Rev\_pet28Ntag, que apresenta codon terminador no primer anti-sense utilizado na amplificação do gene.

### **3.4.31 - Expressão e purificação da PAL em *E. coli* utilizando células da linhagem BL21 (DE3) e C41**

Os plasmídeos contendo o gene de interesse nos vetores pET28a, pET24(+) e pETSUMO recombinantes selecionados, foram utilizados para transformar células de *E. coli* das linhagens C41 e BL21 pelo mesmo procedimento utilizado para transformação em células da linhagem DH10B.

Em 10 mL de cultura LB líquido (Luria Bertani), foi realizado um pré-inóculo de uma colônia da placa de agar com as células transformadas. Esta cultura foi mantida à 37 °C sob agitação de 200 rpm. Após 16 horas, diluiu-se uma alíquota de 9 mL do pré-inóculo em 1000 mL do mesmo meio contendo o antibiótico kanamicina (50 mg. $\mu\text{L}^{-1}$ ) no caso dos plasmídeos pET28a e pET24(+) e Carbenicilina (100 mg. $\mu\text{L}^{-1}$ ) no caso dos plasmídeos pETSUMO selecionados. Ambas as culturas foram mantidas à 37 °C sob agitação de 200 rpm até atingir a densidade óptica de 0,6 à 600 nm, quando então, foi adicionado a este meio IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo) para uma concentração final de 400 mM, que foi mantido por mais 16 horas à 25 °C sob agitação de 200 rpm. Outras tentativas de indução foram realizadas utilizando uma temperatura de 15 °C. As células foram então centrifugadas à 4000 rpm por 15 minutos.

A massa de células bacteriana foi ressuspensa em 25 mL de tampão de sonicação (NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM, Imidazol 10 mM, pH 7,5) e sonificados em um sonicador Sonic Dismembrator model 500 (Fischer

Scientific) em amplitude 20 mA. Durante 5 minutos as células foram sonicadas por 10 segundos, com intervalos de 10 segundos entre cada pulso. As frações solúveis e insolúveis do produto lisado foram separadas por centrifugação durante 30 minutos à velocidade de 14000 rpm e temperatura de 4 °C. As amostras obtidas foram analisadas em SDS-PAGE 15%. Outros tampões de sonicação foram testados com a adição de diferentes agentes redutores (5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol; 1 mM TCEP; 5 mM TCEP; 1 mM TCEP + Phe) e seguiram mesmo procedimento de sonicação e obtenção do extrato proteico.

Após a análise de solubilidade das proteínas, os sobrenadantes foram purificados por cromatografia de afinidade em uma coluna contendo resina de níquel Ni-NTA superflow (Qiagen). Primeiramente a coluna foi lavada com 10 volumes de água, sendo cada volume equivalente a 1 mL e equilibrada com 5 volumes de tampão de sonicação. O sobrenadante foi adicionado à coluna e recolhido (eluato). Em seguida, foram aplicados 10 volumes de tampão de sonicação e a fração recolhida foi denominada eluato 1. Após esse processo, foi adicionado o tampão de sonicação acrescido com concentrações crescentes de imidazol: 40 mM, 80 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM e 500 mM. Cada solução de tampão contendo imidazol foi aplicada duas vezes (cada uma com um volume de 1 mL) e as alíquotas foram recolhidas. As frações obtidas na purificação foram analisadas em SDS-PAGE 15%.

As frações contendo a proteína purificada com 100 mM, 150 mM e 200 mM de imidazol foram reunidas, concentradas e armazenadas em tampão 20 mM Tris pH 8.8 e a troca de tampão se deu com o auxílio de um concentrador de amostras. Após a purificação, as proteínas obtidas foram armazenadas a 4 °C.

### **3.4.32 - Cromatografia por exclusão molecular**

A enzima PAL recombinante purificada foi submetida a cromatografia de exclusão molecular no intuito de se determinar o tamanho da proteína e conseqüentemente o estado oligomérico da mesma. Neste caso, utilizou-se uma coluna Superdex S200 preparativa e modo de eluição isocrático com tampão tris-HCl 50 mM pH 8.8 com 0,2 M de NaCl numa vazão de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. A partir da construção de uma curva de calibração com diferentes padrões de proteínas com tamanhos moleculares diferentes, pode-se determinar o tamanho da enzima em estudo.

### **3.4.33 - Purificação alternativa da enzima PAL sem imidazol**

Os precipitados bacterianos obtidos a partir da expressão da enzima PAL em BL 21(DE3) foram ressuspensos em 25 mL de tampão de sonicação otimizado (Tampão Tris 25 mM, pH 8.8; EDTA 1 mM; sacarose 250 mM; DTT 15 mM, PVPP 4% e ascorbato de sódio 40 mM, pH 8.8) e sonicados em um sonicador Sonic Dismembrator model 500 (Fischer Scientific) em amplitude 20 mA. Durante 5 minutos as células foram sonicadas por 10 segundos, com intervalos de 10 segundos entre cada pulso. As frações solúveis e insolúveis do produto lisado foram separadas por centrifugação durante 30 minutos à velocidade de 9150 rpm e temperatura de 4 °C. As amostras obtidas foram analisadas em SDS-PAGE 15%.

O sobrenadante foi adicionado à resina de níquel Ni-NTA superflow (Qiagen) depois de ter sido equilibrada com 5 volumes de tampão Tris 25 mM pH 8.8. Em seguida, foram aplicados 10 volumes de tampão com o intuito de lavagem das proteínas que não apresentaram interação com a resina. Neste momento, adicionaram-se 500 µL de SUMO protease (1 mg de SUMO protease para cada 50 mg de fusão). A reação se estendeu por aproximadamente

16 horas à 4 °C, e a enzima recombinante sem fusão foi posteriormente eluída com tampão (50 mM Tris, pH 8.8). As frações obtidas na purificação foram analisadas em SDS-PAGE 15%.

Outra metodologia de purificação sem a utilização de gradiente de imidazol foi a purificação utilizando gradiente de pH. Neste sentido, repetiu-se todo o procedimento descrito anteriormente, e a enzima PAL foi eluída utilizando-se tampão Tris 25 mM pH 4.0. A fração contendo a proteína purificada foi, concentrada e armazenada em tampão 20 mM Tris pH 8.8 e a troca de tampão se deu com o auxílio de um concentrador de amostras. Após a purificação, as proteínas obtidas foram armazenadas a 4 °C.

#### **3.4.34 - Otimização das condições de incubação da reação enzimática**

Para determinação do pH ótimo na reação, a enzima PAL recombinante foi incubada em tampão Tris 25 mM com diferentes valores de pH: pH 8.0, 8.8 e 9.5 à 45 °C e o tempo de incubação foi avaliado no mesmo experimento em função do pH estudado. Para cada valor testado de pH variou-se o tempo de incubação em 30 minutos, 1; 3; 6 e 24 h. As reações foram avaliadas com relação à produção de ácido cinâmico por HPLC de acordo com as condições especificadas no item 3.4.13.

A enzima em estudo também foi ensaiada em tampão correspondente ao seu pH ótimo em diferentes temperaturas (40, 45, 50 e 55 °C) visando a obtenção da temperatura ótima da PAL.

#### **3.4.35 - Estudos de cinética enzimática**

A enzima PAL recombinante foi ensaiada a partir de uma solução do aminoácido Phe. Os valores de concentração de Phe para a PAL extraída foram: 0.5, 1, 2, 5, 10, 25 e 50 mmol L<sup>-1</sup>. Utilizaram-se quantidades de 50 µl de

PAL ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) para uma solução final de 0,5 mL, completados com tampão Tris ( $25 \text{ mmol.L}^{-1}$  pH 8.8) e a reação teve duração de 3 h na temperatura ótima de  $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Os valores das constantes aparentes de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e da velocidade máxima ( $V_{\text{max}}$ ) foram calculadas a partir da velocidade inicial de cada ensaio utilizando-se o gráfico de Lineweaver-Burk.

### **3.4.36 - Avaliação da atividade da enzima PAL produzida por diferentes espécies de fungos**

Diferentes fungos do gênero *Penicillium*, *Aspergillus* e uma espécie de fungo do gênero *Xylaria* foram estudados no sentido de se avaliar a produção da enzima Fenilalanina amônia-liase por estes diferentes micro-organismos.

Os micro-organismos testados no experimento são listados abaixo e estão todos depositados na micoteca do LaBioMMi e são na sua maioria, endofíticos. Inicialmente, reativaram-se os micro-organismos em meio BDA durante sete dias e posteriormente, os fungos descritos foram cultivados em meio líquido Czapeck enriquecido com 2% de levedura sob agitação de 120 rpm durante cinco dias. Após filtração, foram adicionados 30mL de tampão tris-HCl 25 mM pH 8.8 ao micélio de cada um dos fungos cultivados.

Micro-organismos testados no experimento:

- *Xyllaria sp.*
- *P. citrinum*
- *P. herquei*
- *P simplississimum*
- *P. chrysogenum*
- *Penicillium sp.*(LaBioMMi 222)
- *Penicillium sp.*(LaBioMMi 223)
- *Aspergillus flavus*
- *Aspergillus aculeatus*



A reação enzimática com as células dos diferentes micro-organismos em tampão foi posteriormente realizada adicionando-se L-fenilalanina 2,5 mM. Após 10 minutos, a reação foi terminada com a adição de HCl 0,5 M e em seguida, o ácido cinâmico foi extraído como consequência da partição líquido-líquido com 30 mL de AcOEt. Três frascos foram mantidos como controle para posterior comparação com os extratos referentes às reações enzimáticas.

A avaliação da atividade da PAL através da produção de ácido cinâmico a partir do aminoácido L-fenilalanina foi realizada através de análises por HPLC/UV-MS, que possuem as condições descritas no item 3.4.9.

### **3.4.37 - Adição de [2-<sup>13</sup>C] L-fenilalanina as células de *P. brasilianum* visando o estudo dos intermediários biossintéticos das brasiliamidas**

Inicialmente, o micro-organismo *P. brasilianum* foi cultivado em meio de cultura líquido Czapeck (descrito na tabela 3.4) enriquecido com 2% de extrato de levedura de maneira estática a 25 °C durante cinco dias. Em seguida, filtraram-se à vácuo os frascos e adicionaram-se 50 mL de tampão tris-HCl (25 mM) pH 8.8 ao micélio. À suspensão de células do micro-organismo foram adicionados 50 mL de [2-<sup>13</sup>C] L-fenilalanina (2,5 mM) e deixou-se reagindo sob agitação de 120 rpm. Em seguida, a reação foi terminada depois de 2 h e 12 h adicionando-se HCl 6 M aos frascos. A extração dos precursores foi realizada a partir da adição de AcOEt e consequente partição líquido-líquido. A formação do ácido cinâmico e os outros intermediários biossintéticos das amidas foram analisados por HPLC/UV-MS conforme descrito no item 3.4.38 abaixo.

### **3.4.38 - Análises por HRMS dos experimentos relacionados à biossíntese das brasilamidas**

Para as análises dos extratos obtidos no item 3.4.37 via HRMS (LTQ orbitrap Velos, ESI) foi utilizada uma coluna de fase reversa, WATERS X-Terra ODS 3.0 x 30 mm (3,5  $\mu$  de diâmetro de poro) e como fase móvel um gradiente entre acetonitrila e água ambos suplementados com 0,1% ácido fórmico. O método testado teve uma variação de gradiente de eluição de 5-100% durante 8 minutos. A vazão utilizada foi de 0,4mL.min<sup>-1</sup>, o volume injetado foi de 10  $\mu$ L no método utilizado e o solvente utilizado para dissolução dos extratos foi MeOH.

### **3.4.39 - Avaliação da produção de brasilamidas quando o fungo *P. brasilianum* é submetido à fatores de estresse**

Os fatores de estresse aos quais o fungo *P. brasilianum* foi submetido no experimento foram exposição diária do fungo a luz UV (Fator 1); estresse mecânico (Fator 2); ausência de íons Fe<sup>2+</sup> no cultivo (Fator 3) e de ions PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (Fator 4), todos os fatores de estresse testados são reportados como estímulos à produção de fenilpropanoides descritos para plantas (RITTER & SCHULZ, 2004). Nos experimentos 1 e 2, o fungo foi cultivado em meio sólido Czapeck conforme descrito na tabela 3.4. No caso do experimento 1, o micro-organismo foi submetido a raios UV diários (5 minutos de exposição) durante 15 dias. No experimento 2, o fungo foi submetido a constantes cortes mecânicos e cultivado também por 15 dias. Já nos experimentos 3 e 4 o fungo foi cultivado em meio de cultura sólido Czapeck na ausência dos ions Fe<sup>2+</sup> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> respectivamente, nos diferentes experimentos testados. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e o fungo foi cultivado sob condições padrões e mantido como controle para posteriores comparações no nível quantitativo.

Nos diferentes experimentos o fungo *P. brasilianum* foi submetido a processos de micro-extrações. Após o período de crescimento do micro-organismo em placa de Petri (15 dias), o halo de crescimento foi medido e a placa inteira de cultura contendo o fungo, foi submetida à micro-extração. Utilizou-se a proporção (1:2:3) de metanol: acetato de etila: diclorometano para extração das brasiliamidas e posteriormente, o conteúdo do tubo foi sonicado por 15 minutos e posteriormente filtrado. O filtrado foi seco em capela e ressuspendido em MeOH para a realização das análises por HPLC/UV-MS. As condições de análise foram as mesmas descritas no item 3.4.38.

#### **3.4.40 - Avaliação da enzima Fenilalanina amônia-liase nas folhas de *Melia azedarach***

Inicialmente, para realizar os experimentos com a enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), foram utilizadas folhas da planta adulta *Melia azedarach* coletadas no estacionamento do Departamento de Química da UFSCar.

A extração da enzima PAL foi realizada utilizando-se 25 mg de folhas trituradas em N<sub>2</sub> líquido. Posteriormente, foram adicionados 100 mL de solução tampão preparada no item 3.4.11 anterior. A suspensão obtida foi agitada por 10 minutos em banho de gelo. Após homogeneização com tampão, o extrato foi filtrado em gaze para tubos Falcon de 50 mL mantidos a 4 °C e centrifugados a 10.000 g por 15 minutos. O sobrenadante obtido foi submetido a precipitação com sulfato de amônio seguindo o procedimento descrito no item 3.4.12.

Verificou-se a presença da enzima PAL através de ensaios de atividade (item 3.4.13), e o ácido cinâmico, produto da reação enzimática foi posteriormente analisado via HPLC/UV conforme descrito no item 3.4.13.



## 4 - Resultados e Discussão

### 4.1 - Estudo da incorporação de precursores biossintéticos no metabolismo das brasiliamidas

O fungo endofítico *Penicillium brasilianum* vêm sendo estudado no laboratório LaBioMMi há 16 anos e representa uma potencial fonte de metabólitos secundários bioativos. Inúmeros compostos já foram purificados a partir da fermentação deste organismo em meios de cultivo líquidos e sólidos e caracterizados por técnicas espectroscópicas (SANTOS, 2003). Entre os metabólitos produzidos, destacam-se meroterpenos inseticidas, potenciais agentes contra o vetor *Aedes aegypt* (FILL et al., 2007; FILL et al., 2009), alcalóides tremorgênicos, como a verruculogenina e verruculogenina-TR2, caracterizados por serem importantes micotoxinas (SANTOS, 2003, FILL et al., 2012), o policetídeo ácido dimetilorselínico, precursor dos meroterpenos, e dois esteróides, ergosterol e 6,8-peróxido de ergosterol. Além destes compostos foram identificadas amidas bis-fenilpropanoidicas, as brasiliamidas A-F (Figura 1.6), alvos de estudo do trabalho que parecem derivar da rota biossintética dos fenilpropanóides (FILL et al., 2010).

A possibilidade de produção de fenilpropanóides fúngicos nos inspirou a realização de estudos biossintéticos preliminares os quais indicaram que a adição do aminoácido L-fenilalanina ao meio de cultura de *P. brasilianum* intensificava a produção destes metabólitos conforme observado nos experimentos de detecção seletiva desses compostos por espectrometria de massas. Experimentos visando o estudo da cinética de metabolismo do aminoácido L-fenilalanina pelo micro-organismo *P. brasilianum* mostraram que o consumo de Phe é concomitante com a produção de brasiliamidas, sugerindo que este aminoácido esteja intimamente ligado a produção destes compostos (FILL et al., 2009). A partir destes resultados, a rota biossintética das

brasiliamidas produzidas pelo fungo *P. brasilianum* foi avaliada com a adição de [2-<sup>13</sup>C-Phe]. As análises dos extratos enriquecidos com aminoácido isotopicamente marcado via <sup>13</sup>C RMN e HPLC/UV-MS, indicaram a incorporação de duas unidades do aminoácido L-fenilalanina na estrutura das brasiliamidas (FILL, 2009; FILL et al., 2010) e identificaram os carbonos 2 e 2' enriquecidos com <sup>13</sup>C. Baseado nas incorporações obtidas, FILL et. al. (2010) propuseram uma rota biossintética para a formação de brasiliamidas baseada na biossíntese de fenilpropanóides produzidos por plantas. Inicialmente, formam-se os intermediários derivados do ácido cinâmico e, posteriormente, com exceção da brasiliamida F (**6**), todas as estruturas moleculares das amidas bis-fenilpropanoídicas, tem o carbono carboxílico do aminoácido precursor (C-1) reduzido e aminado (Figura 4.1). Como consequência, deve ocorrer a formação de cinamaldeído (**9**) a partir da redução aminativa, seguido de passos alternados de reduções e oxidações, levando a formação de dois intermediários 1-aryl-3-amino-2-propanona (**15**), que seriam intermediários chaves na produção das brasiliamidas **1-5**. O acoplamento das duas unidades é esperado do ponto de vista da química orgânica (Figura 4.2) para levar a formação dos compostos **1-6**. Apenas duas posteriores N-acetilações seriam necessárias para a formação da brasiliamida A (**1**). Dessa maneira, os esquemas apresentados nas figuras 4.1 e 4.2 estão em completo acordo com os resultados encontrados nos experimentos com o precursor isotopicamente marcado.

A presença das estruturas parciais 1-aryl-3-amino-2-propanona (**16** e **17** na figura 4.2) é rara em metabólitos secundários fúngicos. Foi verificado em uma espécie de *Aspergillus* o acúmulo de 1-(4-hidroxifenil)-3-amino-2-propanona, mas é um dos poucos exemplos encontrados na literatura (BENZ et al., 1974).

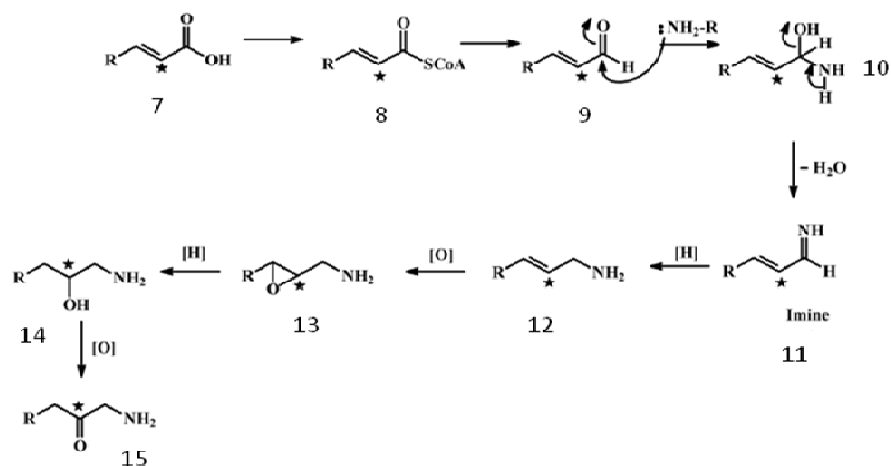


FIGURA 4.1 - Aminoação redutiva e isomerização da fenilalanina levando a produção dos precursores 1-aryl-3-amino-2-propanona. Os carbonos enriquecidos são assinalados no esquema (Extraído de FILL et al., 2010).

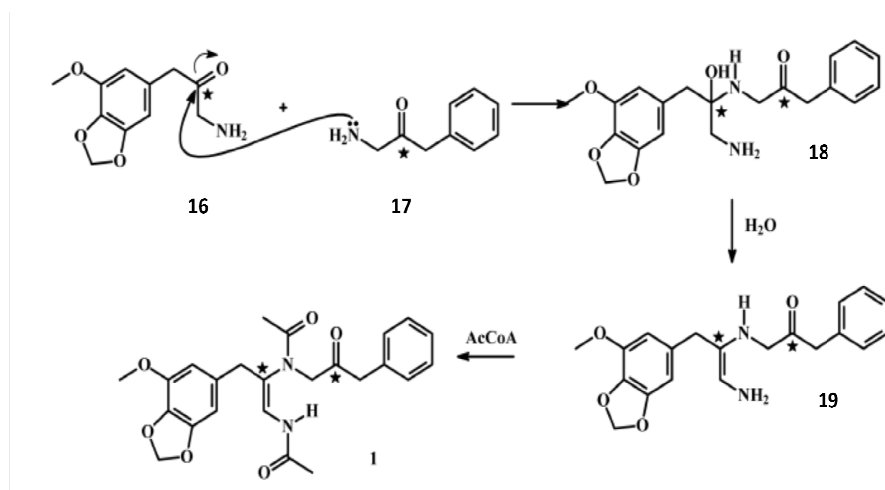


FIGURA 4.2 - Acoplamento de duas unidades 1-aryl-3-amino-2-propanonas (Extraído de FILL et al., 2010).

Com o intuito de estudar quantitativamente a intensificação da produção de brasilamidas ao adicionar Phe ao meio de cultivo, foi proposto um experimento para determinação da porcentagem de incorporação do aminoácido em estudo no metabolismo destes metabólitos secundários. Para este propósito, o fungo *P. brasilianum* foi cultivado em quadruplicata em meio líquido Czapeck suplementado com o aminoácido Phe. Quatro frascos foram mantidos como controle (sem adição de Phe ao meio) para posterior comparação quantitativa. O procedimento para este experimento é descrito no item 3.4.2.

Em seguida, os extratos referentes ao experimento proposto foram analisados via HPLC-MS/MS, cujas condições foram otimizadas em estudos anteriores (FILL, 2009) e são descritas em 3.4.4, para posterior estimativa da concentração da substância brasiliamida A nos diferentes meios de cultivo e determinação da porcentagem de incorporação do aminoácido na rota biossintética das brasiliamidas.

Estudos de quantificação de metabólitos secundários produzidos por micro-organismos são dificultados uma vez que se lida com uma matriz viva, que é modificada durante todo o crescimento e desenvolvimento do micro-organismo. Dessa maneira, a padronização externa se torna interessante nos estudos visando a estimativa da produção de brasiliamida A nos meios suplementados com o aminoácido Phe e nos meios mantidos como controle, sem a adição do mesmo.

Inicialmente, realizaram-se experimentos de íons produtos no modo positivo de ionização para a substância padrão brasiliamida A com relação  $m/z$  439 e, uma vez obtido o espectro de íons produtos do padrão, pode-se determinar o canal de SRM ( $439 > 380$ ) utilizado nas análises para posterior quantificação da brasiliamida A.

No caso de experimentos de íons produtos, o primeiro quadrupolo é programado de maneira que apenas uma determinada relação  $m/z$  passe, filtrando-se todos os demais íons. Assim, este íon pode ser fragmentado com uma energia conhecida na cela de colisão e todos seus fragmentos podem ser analisados no segundo quadrupolo e direcionados ao detector (SIUZDAK, 1996). Nos experimentos de SRM (*Selected Reaction Monitoring*) alta seletividade é obtida, uma vez que, ambos os quadrupolos são programados para deixarem passar apenas uma determinada relação massa/carga. Assim, podemos analisar um íon oriundo de uma substância em pequenas concentrações, mesmo em uma matriz complexa e sem qualquer resolução cromatográfica, desde que se



conheça alguma fragmentação específica do íon precursor (SIUZDAK, 1996; SKOOG et al., 2002).

Em seguida, construiu-se uma curva de calibração externa com o padrão isolado de brasiliamida A como pode ser observado na figura 4.3 abaixo.

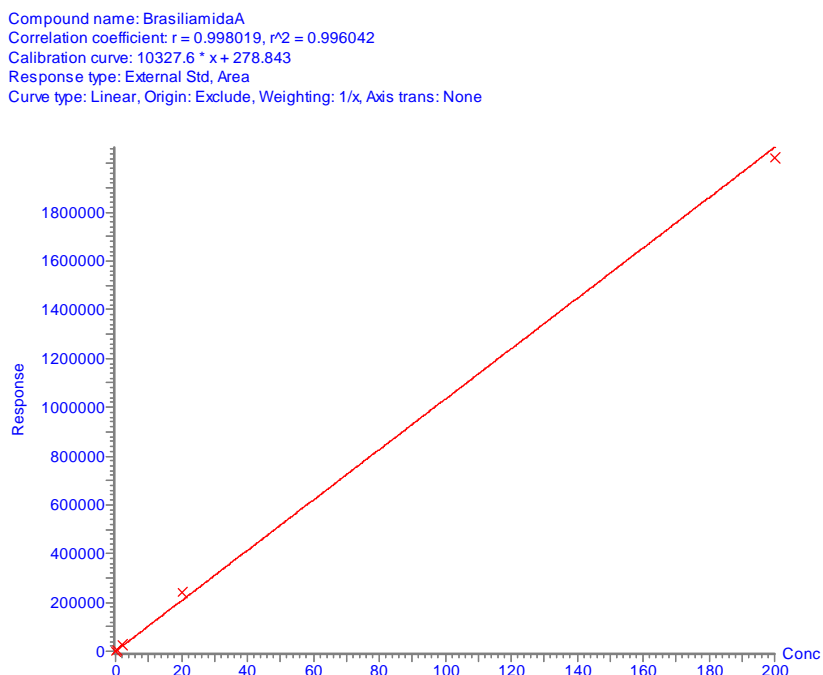


FIGURA 4.3 - Curva de calibração para a substância brasiliamida A.

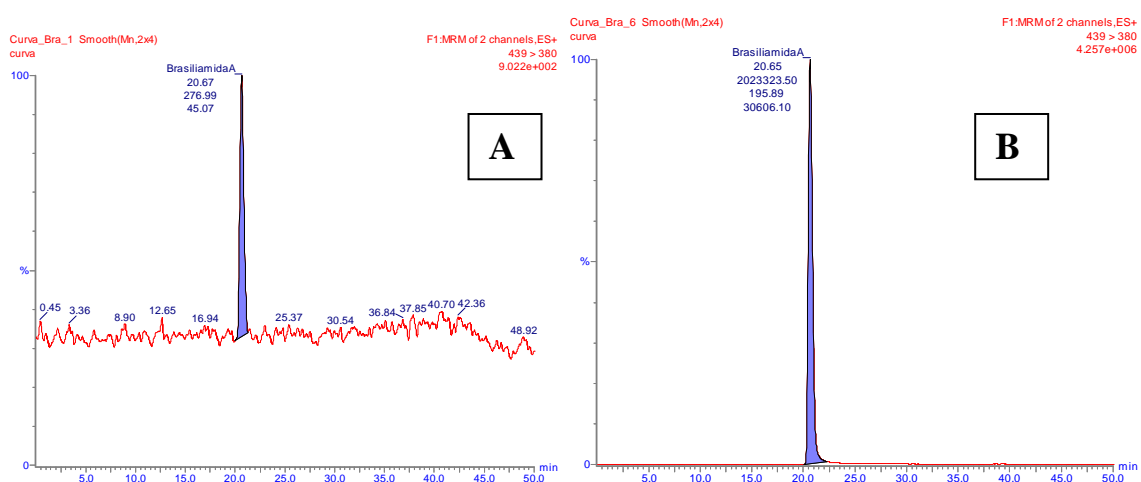


FIGURA 4.4 - Cromatograma de íons totais referentes aos experimentos de SRM da substância brasiliamida A (A) menor concentração estudada (B) maior concentração testada para construção da curva.

A curva de calibração foi construída com os valores de áreas geradas a partir da integração das bandas referentes à substância brasiliamida A em diferentes concentrações no software Masslinx4.1 (Quantify) (Figura 4.3). Observa-se na figura 4.4A acima a área gerada pelo equipamento no ponto referente à menor concentração de análise ( $0,002 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e na Figura 4.4B, a maior concentração do padrão analisado. A curva apresentada visualizada na figura 4.3 apresentou boa linearidade ( $R^2=0,996$ ).

A partir da equação de reta gerada com a construção da curva de calibração da brasiliamida A, estimou-se a concentração da amida produzida nos meios de cultura suplementados com o aminoácido adicionado. Uma vez que o experimento foi realizado em quadruplicata, um dos pontos de cada cultivo foi excluído. A média entre os pontos referentes às concentrações de brasiliamida A nos meios de cultivo com a adição de 25 mg de fenilalanina foi  $5,316 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Estimou-se da mesma maneira a média entre os pontos referentes à concentração de brasiliamida A nos meios de cultura controles, ou seja, sem a adição de L-fenilalanina, encontrando-se um valor de  $0,388 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

A partir dos valores médios estimados de concentrações de brasiliamida A produzida nos experimentos propostos, foi verificado através de comparação, que o fungo aumenta a produção de brasiliamida A no meio de cultura quando o cultivo é realizado com a adição de 25 mg em aproximadamente 1300%, ou seja, aumenta a produção de brasiliamida A em aproximadamente 13 vezes.

Em seguida, determinou-se aproximadamente, a porcentagem de incorporação do aminoácido adicionado na produção da substância brasiliamida A. Para isso, considerou-se que duas moléculas do aminoácido L-fenilalanina levavam a formação de uma única molécula de brasiliamida A, como verificado anteriormente nos estudos biossintéticos (FILL, 2009; FILL et al., 2010). Considerou-se ainda, as massas moleculares do aminoácido (165) e da amida estudada (438) e calculou-se dessa maneira, o número de moléculas de

aminoácido ( $1,81 \cdot 10^{21}$ ) e, a partir deste valor, determinou-se o número de moléculas de brasiliamida A que seriam teoricamente formadas a partir da incorporação de 100% das moléculas de aminoácido ( $9,09 \cdot 10^{20}$ ). Considerando-se a massa molecular da brasiliamida A, 438, determinou-se a concentração de brasiliamida A teórica se houvesse 100% de incorporação do aminoácido adicionado ( $0,663 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Finalmente, determinou-se através da subtração das concentrações de brasiliamida A no controle (brasiliamida A produzida intrinsecamente pelo fungo) e no experimento de suplementação (brasiliamida A produzida intrinsecamente pelo fungo + brasiliamida A produzida devido a adição de Phe), que o fungo tem a capacidade de incorporação de 0,75%, uma vez que a concentração verificada foi  $4,929 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Dessa maneira, visualiza-se que a adição de fenilalanina no meio de cultivo aumenta a produção de brasiliamida A em 13 vezes, entretanto há um excesso grande de aminoácido adicionado, podendo haver saturação das enzimas responsáveis pela produção de brasiliamida A.

O experimento representou uma estimativa da produção de brasiliamida A nos meios de cultura suplementados com o aminoácido L-fenilalanina. É importante ressaltar que nenhum processo de validação foi realizado, uma vez que este não era o principal objetivo e, portanto, os números apresentados representam apenas uma estimativa da produção de brasiliamida A.

Uma vez determinada a porcentagem de incorporação de Phe na estrutura das brasiliamidas, o micro-organismo *P. brasilianum* foi cultivado em diferentes meios de cultivo no intuito de otimizar a produção destes compostos e estimar a quantidade produzida nos diferentes meios.

O fungo foi cultivado em meios sólidos de arroz, arroz suplementado com 25 mg de L-fenilalanina, canjica, assim como foi cultivado em meio líquido Czapeck e Czapeck enriquecido com 25 mg de L-fenilalanina. O micro-organismo teve seu crescimento interrompido com 28 dias quando cultivado em meios sólidos e 18 dias nos meios líquidos. Ambos os tempos de

cultivo foram baseados em curvas de produção realizadas em estudos anteriores no LaBioMMi (FILL, 2009). As extrações foram realizadas segundo procedimento descrito no item 3.4.2.

Inicialmente, foi construída uma curva de calibração externa para o padrão da substância brasiliamida A conforme observado na figura 4.3. Em seguida, os extratos obtidos a partir do cultivo do fungo nos diferentes meios de cultura foram submetidos à análises via HPLC-MS/MS e posteriormente estimou-se, com base nas áreas encontradas relacionadas as bandas cromatográficas referentes a brasiliamida A, e, com base na equação de reta encontrada na curva de calibração, as quantidades de amida produzida em cada um dos meios de cultura estudados. Na tabela 4.1 abaixo visualiza-se a produção da substância brasiliamida A em cada meio de cultura avaliado.

TABELA 4.1 - Valores de concentração estimados para a produção de brasiliamida A em diferentes meios de cultura.

<b>Meio de cultura estudado</b>	<b>Média das concentrações de brasiliamida A (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>
Arroz	31,8
Arroz + L-fenilalanina	42,0
Canjica	54,1
Czapeck	1,2
Czapeck + L-fenilalanina	5,3

Com base nos valores estimados da produção de brasiliamida A em diferentes meios de cultura verifica-se que o fungo apresenta maior produção dos compostos de interesse no meio sólido de canjica. Foi verificado ainda, que a adição do aminoácido L-fenilalanina aumenta consideravelmente a produção da substância brasiliamida A nos meios de cultivo suplementados com este aminoácido conforme verificado nos estudos anteriores.

A incorporação do ácido cinâmico, também possível precursor da biossíntese das brasiliamidas, formado a partir da reação enzimática da enzima PAL e o substrato Phe, também foi avaliada através de um experimento de cultivo do fungo *P. brasilianum* em meio líquido suplementado com 25 mg de ácido cinâmico deuterado (d<sub>7</sub>-ácido cinâmico), no intuito de se determinar a incorporação deste ácido precursor no metabolismo das brasiliamidas.

Depois de 30 dias de cultivo, verificou-se que o ácido cinâmico adicionado ao meio de cultura do fungo *P. brasilianum* inibiu o crescimento deste micro-organismo. Ainda no intuito de estudar a biossíntese das amidas bis-fenilpropanoídicas e determinar, assim como anteriormente, a estimativa da porcentagem de incorporação de ácido cinâmico na produção das brasiliamidas. O fungo foi cultivado em meio líquido Czapeck suplementado com 25 mg de ácido cinâmico, agora não deuterado em sua estrutura química, de maneira estática a 25 °C.

O experimento proposto foi acompanhado ao longo de 30 dias e foi verificado durante este período que o ácido cinâmico também inibiu completamente o crescimento do micro-organismo.

Tal fato despertou interesse, uma vez que o ácido cinâmico é um possível precursor biossintético das brasiliamidas, e, portanto, seria produzido no próprio metabolismo do fungo em estudo, o que torna intrigante a inibição do fungo por este composto. Algumas hipóteses foram sugeridas a partir de tais observações. A primeira delas, seria que a concentração de ácido cinâmico adicionada ao meio de cultivo seria tóxica ao fungo *P. brasilianum*, entretanto em menores concentrações do composto testado, o fungo se desenvolveria e não apresentaria inibição de crescimento.

A hipótese foi investigada no sentido de determinar se o fungo *P. brasilianum* se desenvolveria em concentrações menores de ácido cinâmico, possível precursor das brasiliamidas. Tal questionamento foi avaliado através de ensaios antifúngicos em placas de Petri alterando-se a concentração de ácido

cinâmico nos testes de inibição. As concentrações utilizadas foram 500 (concentração utilizada no cultivo em Erlenmeyer), 250 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , sendo a última, a concentração utilizada em ensaios antifúngicos com compostos puros descritos na literatura.

Nas figuras a seguir verificam-se os resultados obtidos a partir dos ensaios de inibição do fungo *P. brasilianum* frente ao ácido cinâmico. Observam-se os halos de crescimento do micro-organismo no experimento controle (cultivo do fungo sem a adição de ácido cinâmico), em comparação ao crescimento relativo do fungo nas concentrações mencionadas do composto estudado. Os valores avaliados para os halos de crescimento nos experimentos são mencionados na Tabela 4.2 abaixo.

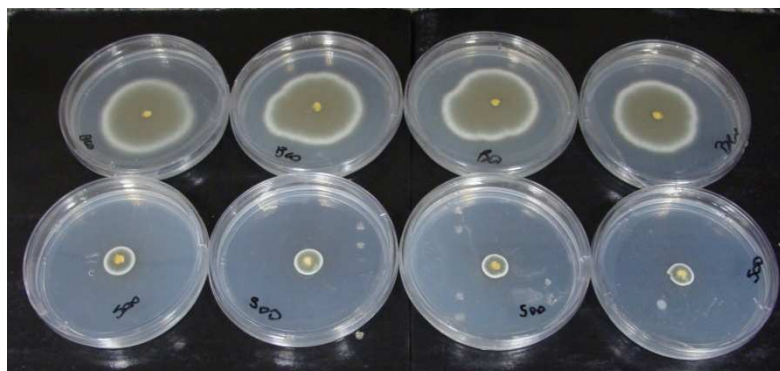


FIGURA 4.5 - Ensaio de inibição do crescimento do fungo *P. brasilianum* frente ao ácido cinâmico na concentração de 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O experimento controle é visualizado acima.

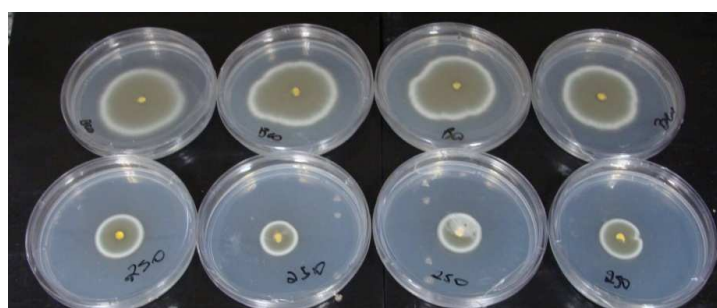


FIGURA 4.6 - Ensaio de inibição do crescimento do fungo *P. brasilianum* frente ao ácido cinâmico na concentração de 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O experimento controle é visualizado acima.

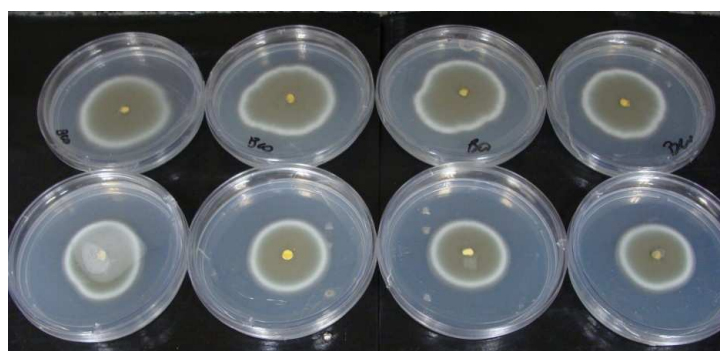


FIGURA 4.7 - Ensaio de inibição do crescimento do fungo *P. brasiliense* frente ao ácido cinâmico ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). O experimento controle é visualizado acima.

TABELA 4.2 - Valores de halos de crescimento para o fungo *P. brasiliense* na presença de ácido cinâmico

Halo de crescimento (cm)	Concentração de ácido cinâmico ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) 1)
4,8 x 4,6	0 (controle)
5,4 x 5,2	0 (controle)
5,2 x 5,1	0 (controle)
5,2 x 5,0	0 (controle)
4,6 x 4,0	100
4,1 x 4,0	100
3,9 x 4,0	100
4,0 x 4,3	100
2,1 x 2,3	250
2,3 x 2,2	250
2,1 x 2,1	250
2,5 x 2,5	250
1,4 x 1,3	500
1,3 x 1,4	500
1,5 x 1,5	500
1,7 x 1,5	500

Os resultados mencionados indicam que em qualquer concentração avaliada de ácido cinâmico ministrada ao micro-organismo, há uma inibição considerável quando comparado ao controle, sem a adição do composto. Na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  avaliada, verificou-se uma inibição de aproximadamente 30% com relação ao controle. Embora o fungo tenha se desenvolvido em menores concentrações de ácido cinâmico nos cultivos em placa de Petri (meio BDA), os cultivos em meio líquido nestas concentrações de ácido continuaram inibindo o micro-organismo estudado.

Na avaliação da hipótese levantada anteriormente, os resultados indicaram que a concentração adicionada de ácido cinâmico no meio de cultura é relevante, entretanto, não é completamente responsável pela inibição encontrada, uma vez que o ácido cinâmico foi inibidor em todas as concentrações avaliadas no experimento.

Uma segunda hipótese avaliada sugere que o fungo poderia produzir ácido cinâmico para posterior formação de brasiliamidas em seu metabolismo possivelmente ligado a uma macromolécula, e não livre no meio e difundido no citosol, uma vez que este composto é inibidor do metabolismo do micro-organismo em estudo.

Buscas na literatura indicaram a possibilidade de haver um tunelamento metabólico (*metabolic channeling*) entre as primeiras enzimas do caminho biossintético dos fenilpropanóides (PAL e C4H) conforme descrito por ACHNINE et al. (2004). Os pesquisadores descrevem que o fenômeno envolve a organização física das enzimas sucessivas da via metabólica em grandes complexos enzimáticos em que os intermediários metabólicos são canalizados sem a sua difusão no citosol. Este processo de tunelamento entre intermediários permite controle do fluxo metabólico, assim como, protege intermediários biossintéticos instáveis ou restringe o acesso de outras enzimas de vias metabólicas que competem entre si pelo substrato. O tunelamento do ácido cinâmico entre as enzimas PAL e C4H já foi reportado por CZICHI & KINDLI



(1975), HRAZDINA & JENSEN, (1985), RASMUSSEN & DIXON, (1999) e parece ser responsável pelo comportamento observado em *P. brasilianum*.

Dessa maneira, verificou-se que o ácido cinâmico é inibidor do crescimento do fungo *P. brasilianum*, este fato inspirou a avaliação de outros cinamatos frente ao crescimento do fungo em estudo. Os compostos testados foram o ácido 4-metoxicinâmico e o ácido 3,4-metoxipiperonilcinâmico, ambos previamente sintetizados no grupo LaBioMMi. Os ensaios de inibição de crescimento foram realizados em placas de Petri contendo meio BDA e os cinamatos citados foram testados nas mesmas concentrações utilizadas nos experimentos referentes aos testes com o ácido cinâmico.

Nas figuras abaixo, visualizam-se os halos de crescimento do fungo *P. brasilianum* frente as diferentes concentrações dos compostos testados em comparação ao controle. Nota-se que ambos os compostos inibiram o crescimento do micro-organismo em estudo, quando se compara quantitativamente os valores de halos de crescimento encontrados nos ensaios com os halos encontrados no controle (meio de cultura BDA sem a adição dos cinamatos estudados), conforme indicado na Tabela 4.3 abaixo.

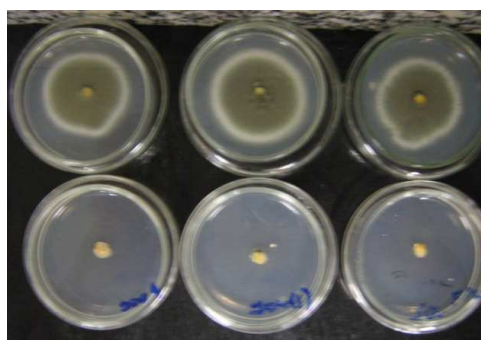


FIGURA 4.8 - Ensaio de inibição do ácido 4-metoxicinâmico frente ao fungo *P. brasilianum* na concentração de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . O experimento controle é visualizado acima.

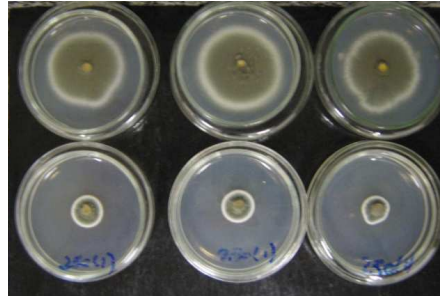


FIGURA 4.9 - Ensaio de inibição do ácido 4-metoxicinâmico frente ao fungo *P. brasilianum* na concentração de 250 µg.mL<sup>-1</sup>. O experimento controle é visualizado acima.

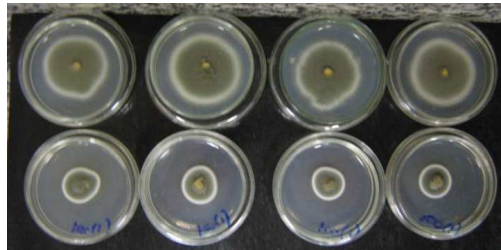


FIGURA 4.10 - Ensaio de inibição do ácido 4-metoxicinâmico frente ao fungo *P. brasilianum* na concentração de 100 µg.mL<sup>-1</sup>. O experimento controle é visualizado acima.

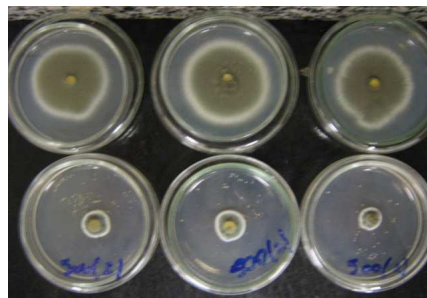


FIGURA 4.11 - Ensaio de inibição do ácido 3,4-metoxipiperonilcinnâmico frente ao fungo *P. brasilianum* na concentração de 500 µg.mL<sup>-1</sup>. O controle é comparado acima.

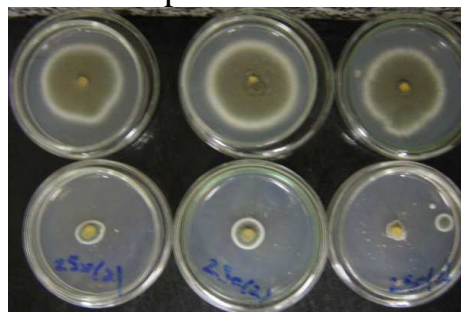


FIGURA 4.12 - Ensaio de inibição do ácido 3,4-metoxipiperonilcinnâmico frente ao fungo *P. brasilianum* na concentração de 500 µg.mL<sup>-1</sup>. O controle é comparado acima.

TABELA 4.3 - Valores de halos de crescimento para o fungo *P. brasilianum* na presença de cinamatos

<b>Halo de crescimento do fungo com ácido 4-metoxi-cinâmico (cm)</b>	<b>Halo de crescimento do fungo com ácido 3,4-metoxipiperonilcinâmico (cm)</b>	<b>Concentração dos compostos testados (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>
3,8 x 3,7	3,8 x 3,7	0
4,2 x 3,8	4,2 x 3,8	0
3,7 x 3,8	3,7 x 3,8	0
3,6 x 3,8	3,6 x 3,8	0
0	1,4 x 1,3	500
0	1,2 x 1,3	500
0	1,3 x 1,4	500
0	1,2 x 1,3	500
1,3 x 1,3	1,4 x 1,3	250
1,5 x 1,4	1,3 x 1,2	250
1,4 x 1,4	1,5 x 1,3	250
1,4 x 1,3	1,4 x 1,2	250
1,8 x 1,8	-	100
1,7 x 1,9	-	100
2,0 x 1,9	-	100
2,0 x 2,0	-	100

A partir dos valores de halos de crescimento visualizados na tabela e nas figuras anteriores, verifica-se que os cinamatos testados apresentam inibição frente ao fungo testado. Os experimentos referentes ao ensaio do composto ácido 3,4-metoxipiperonilcinâmico na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentaram contaminação e não foi possível a medição dos halos.

Na literatura é verificado que a rota biossintética envolvendo a produção de metabólitos secundários via a rota dos fenilpropanóides é ativa em plantas superiores e está envolvida principalmente em mecanismos de defesa. A biossíntese do ácido cinâmico é dessa maneira, muito estimulada por estresses bióticos e abióticos como ataques de patógenos, tecidos prejudiciais, irradiação UV, baixas temperaturas ou baixos níveis de nitrogênio, fosfato ou ferro (RITTER & SCHULZ, 2004). Neste sentido, as enzimas presentes na rota biossintética destes compostos tem sua produção aumentada quando um micro-organismo infecta uma planta, o que pode justificar a inibição do crescimento do fungo *P. brasilianum*, quando é cultivado na presença do ácido cinâmico e de outros fenilpropanóides como os cinamatos estudados.

#### **4.2 - Estudos da enzima Fenilalanina amônia-liase (PAL) produzida pelo fungo *P. brasilianum*.**

A avaliação da rota biossintética das amidas bis-fenilpropanoídicas via o caminho dos fenilpropanóides, foi realizada através do estudo da primeira enzima envolvida na biossíntese destes metabólitos secundários, a fenilalanina amônia-liase.

Inicialmente, verificou-se a produção desta enzima pelo fungo *P. brasilianum* através do cultivo deste micro-organismo em meio líquido Czapeck enriquecido com 2% de extrato de levedura durante cinco dias sob agitação. Após este período, o fungo foi filtrado e ao micélio formado foram adicionados 30 mL de tampão tris-HCl 25 mM pH 8.8, dessa maneira, a reação enzimática foi realizada com as células ressuspensas do fungo neste tampão.

Às células ressuspensas em tampão adicionou-se Phe 2,5 mM e após 30 minutos, a reação enzimática foi terminada com a adição de HCl 0,5 M. Dois frascos foram mantidos como controle sem a adição de fenilalanina. A formação de ácido cinâmico a partir da L-fenilalanina via PAL foi monitorada a partir de análises por espectrometria de massas, descritas anteriormente no item 3.4.15.

Inicialmente, foram realizadas análises para o ácido cinâmico padrão de massa molecular 148, dessa maneira, visualiza-se no espectro de íons produtos no modo negativo de ionização o pico do íon molecular desprotonado com  $m/z$  147, como visualizado no espectro apresentado na figura 4. 13 abaixo.

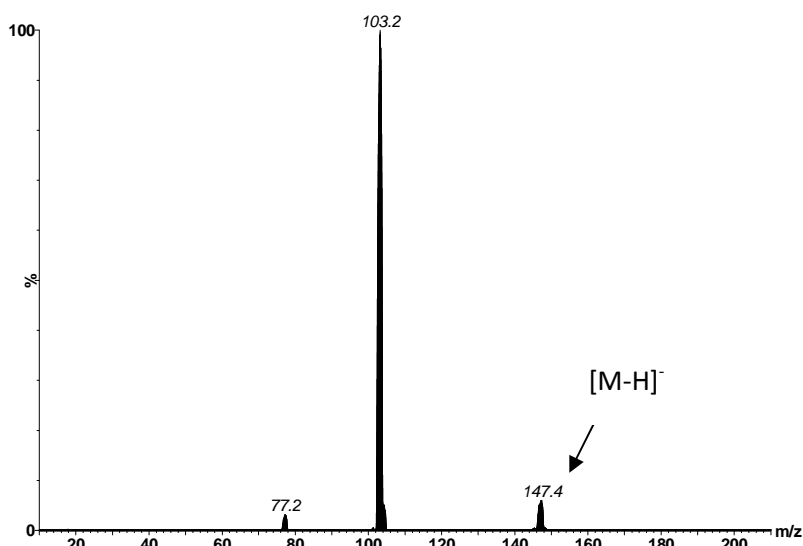


FIGURA 4.13 - Espectro de íons produtos obtido no modo negativo de ionização para o ácido cinâmico padrão.

Em seguida, depois de otimizadas as condições de ionização para o ácido cinâmico padrão, os extratos referentes aos ensaios enzimáticos foram analisados por MS/MS (Figura 4.12) onde observa-se a formação de ácido cinâmico a partir do aminoácido fenilalanina, quando relacionados o espectro do produto obtido pela reação, ao espectro do ácido cinâmico padrão.

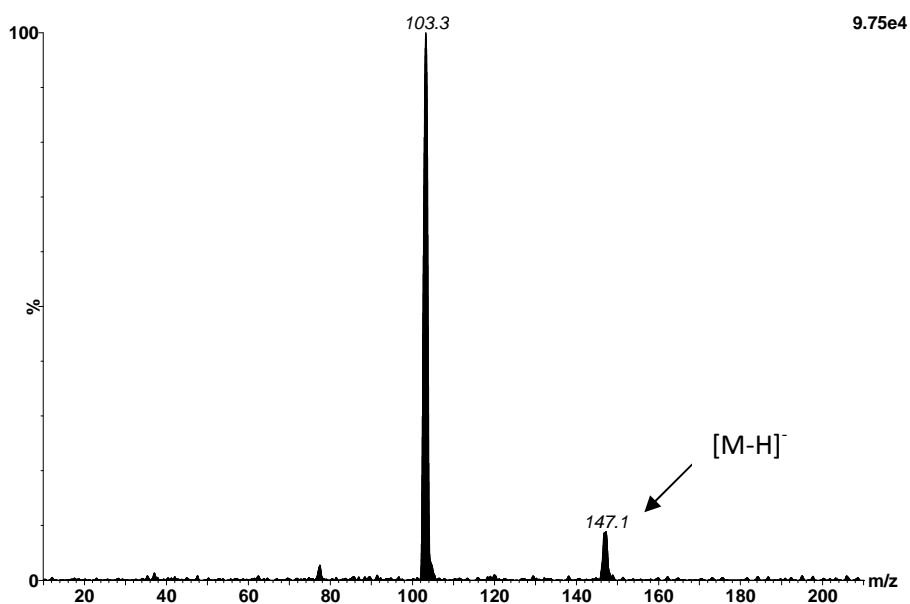


FIGURA 4.14 - Espectro de ions produtos de  $m/z$  147 referente ao protocolo 3 nos 30 min de reação.

Dessa maneira, visualiza-se no metabolismo do micro-organismo *P. brasilianum* a produção da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) o que seria uma indicação de que as brasiliamidas pudessem ser formadas via a ação desta enzima e consequente biossíntese via a rota dos fenilpropanóides.

Em plantas, muitas enzimas típicas da rota biossintética dos fenilpropanóides, por exemplo, cinamato 4-hidroxilase e ácido p-cumárico-CoA ligase, atuam no aminoácido L-fenilalanina para posterior formação de sinapato, que é posteriormente oxidado para formação do grupo metoxipiperonil. Dessa maneira, as brasiliamidas apresentam muitas similaridades com a rota biossintética dos bis-fenilpropanóides produzidos por plantas e representam metabólitos muito interessantes, especialmente pelo fato de serem isolados por *P. brasilianum*, endofítico de *Melia azedarach*.

O caminho biossintético dos fenilpropanóides nas plantas é na maioria das vezes utilizado para produção de metabólitos secundários que são mediadores de estresses bióticos (micro-organismos, insetos, etc.) e abióticos (principalmente a luz UV). Por outro lado, nos fungos esta rota metabólica parece ser curta e os passos biossintéticos iniciais envolvem oxidação de

enzimas que são capazes de degradar os precursores dos fenilpropanóides levando a formação de moléculas menores como benzoatos e estirenos encontrados em algumas espécies de *Penicillium*.

Neste sentido, alguns autores visualizam a rota biossintética dos fenilpropanóides como a representação de um campo de batalha bioquímico pela sobrevivência. Uma teoria recentemente desenvolvida (EMILIANI et.al., 2009) indica que as plantas terrestres adquiriram a habilidade de produzir fenilpropanóides a partir dos micro-organismos via transferência genética horizontal. Durante a evolução, muitos micro-organismos parecem ter preservado esta habilidade metabólica no intuito de autodefesa e para poderem se associar com plantas controlando as respostas químicas das plantas durante a colonização.

Uma vez que não existem relatos da extração da enzima PAL a partir do micro-organismo em estudo, dois diferentes protocolos foram testados e avaliados a partir da produção de ácido cinâmico gerado nas reações enzimáticas das frações obtidas. O primeiro destes protocolos foi realizado no laboratório de Biossíntese de produtos naturais localizado na Unesp-Araraquara sob a supervisão da Prof. Dra. Maysa Furlan e o Dr. Fernando Continguiuba aplicado a enzimas PAL de plantas.

Os extratos foram em seguida, avaliados com relação a dosagem protéica a partir da construção de uma curva de calibração utilizando albumina como padrão proteico, e a partir da equação de reta gerada, estimou-se a concentração proteica de cada um dos extratos gerados. Na tabela 4.4 apresentada a seguir visualiza-se os valores de absorbância encontrados para cada extrato e a concentração proteica determinada através da equação de reta obtida a partir da curva de calibração.

TABELA 4.4 - Valores de absorvância e concentração dos extratos proteicos.

Tipo de extrato	Absorvância (nm)	Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> )
Sobrenadante 1	0,202	0,116
Precipitado 1	0,851	0,156
Sobrenadante 2	0,171	0,114

Posteriormente, avaliou-se o protocolo testado através de ensaios enzimáticos com o sobrenadante 1, precipitado 1 e sobrenadante 2, com o objetivo de verificar se a enzima foi extraída com eficiência. Os ensaios enzimáticos foram realizados com a adição do aminoácido Phe em micro-tubos e a reação enzimática foi incubada durante 30 minutos numa temperatura de 45 °C, conforme procedimento descrito na literatura. Na tabela 3.13 apresentada anteriormente, verifica-se os códigos utilizados nas análises no intuito simplificar as discussões.

TABELA 4.5 - Códigos utilizados nos ensaios enzimáticos

1	100 µL do sobrenadante 1 (controle)
2	100 µL do sobrenadante 1 (controle)
3	100 µL do sobrenadante 1+ 100 µL de fenilalanina
4	100 µL do sobrenadante 1+ 100 µL de fenilalanina
5	100 µL do precipitado 2 (controle)
6	100 µL do precipitado 2 (controle)
7	100 µL do precipitado 2+ 100 µL de fenilalanina
8	100 µL do precipitado 2+ 100 µL de fenilalanina
9	100 µL do sobrenadante 2 (controle)
10	100 µL do sobrenadante 2 (controle)
11	100 µL do sobrenadante 2+ 100 µL de fenilalanina
12	100 µL do sobrenadante 2+ 100 µL de fenilalanina

Em seguida, os extratos das reações enzimáticas foram analisados via HPLC-MS/MS para o monitoramento da produção do ácido cinâmico, produto da reação com PAL. As condições para a realização das análises são descritas no item 3.4.9, assim como a transição utilizada nas análises por SRM.



Os TICs referentes as reações enzimáticas com o sobrenadante 1, precipitado 1 e sobrenadante 2 são visualizados abaixo.

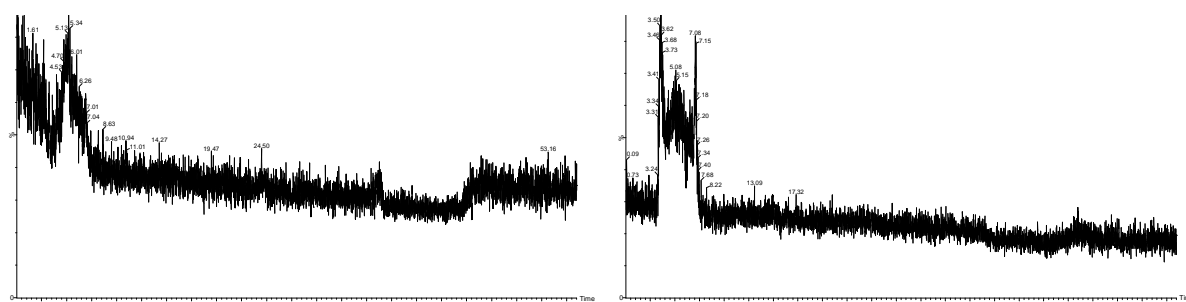


FIGURA 4.15 - Cromatogramas referentes aos experimentos 1 e 2 descritos na tabela 4.5.

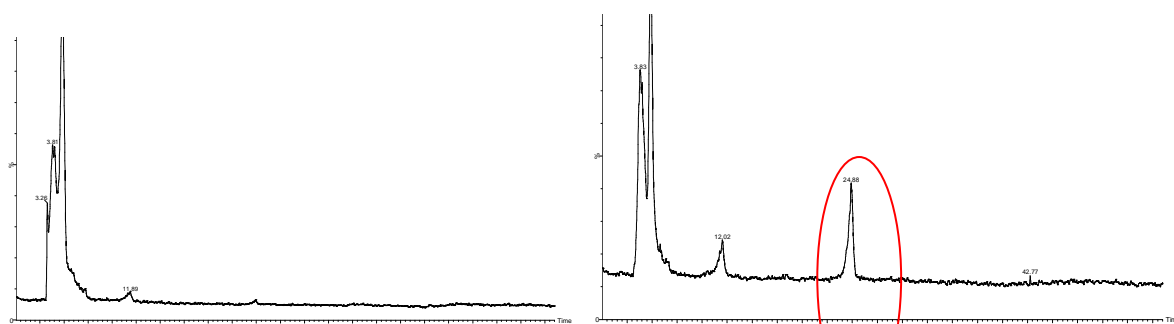


FIGURA 4.16 - Cromatogramas referentes aos experimentos 3 e 4 descritos na tabela 4.5.

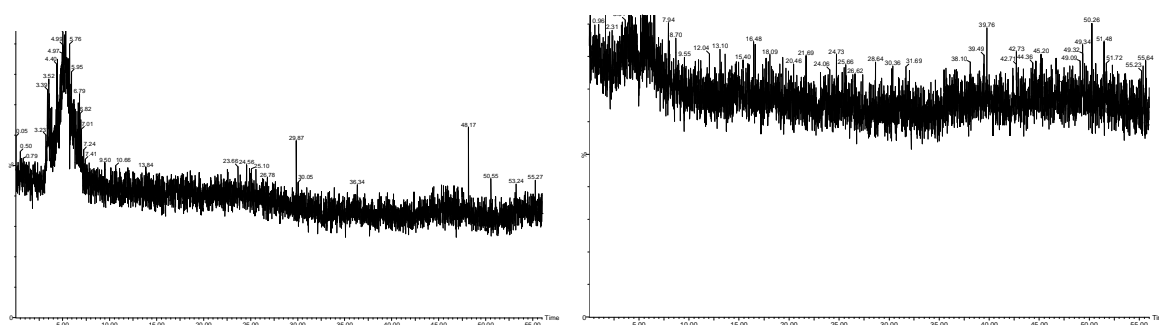


FIGURA 4.17 - Cromatogramas referentes aos experimentos 5 e 6 descritos na tabela 4.5.

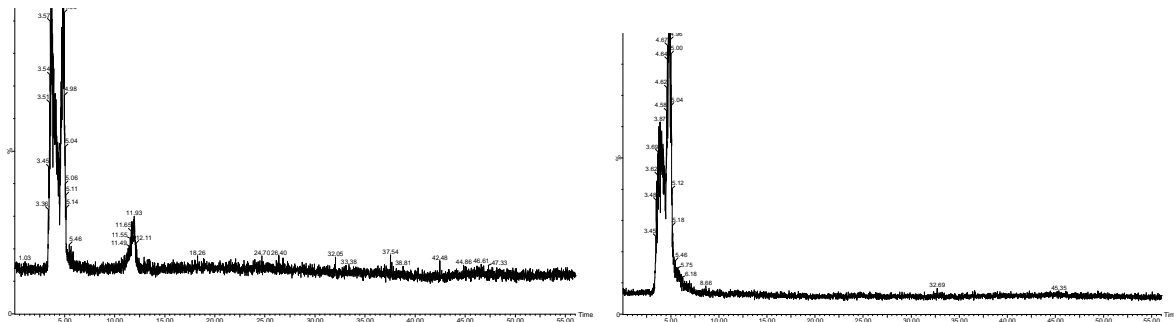


FIGURA 4.18 - Cromatogramas referentes aos experimentos 7 e 8 descritos na tabela 4.5.

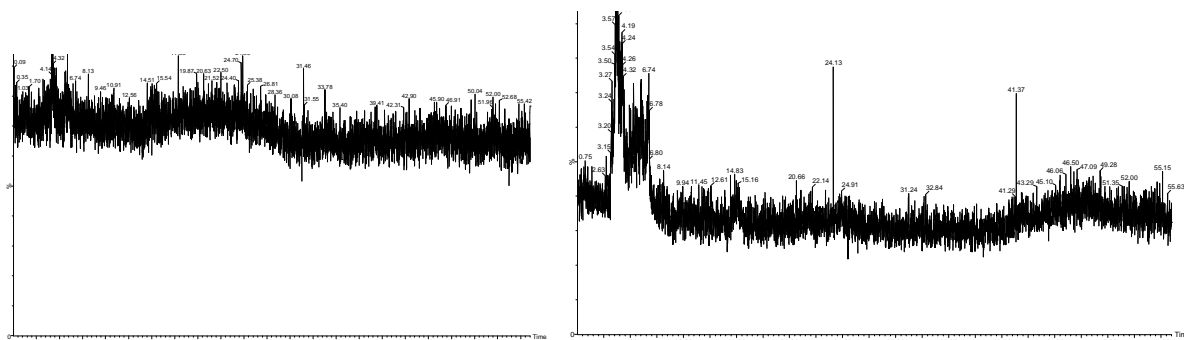


FIGURA 4.19 - Cromatogramas referentes aos experimentos 9 e 10 descritos na tabela 4.5.

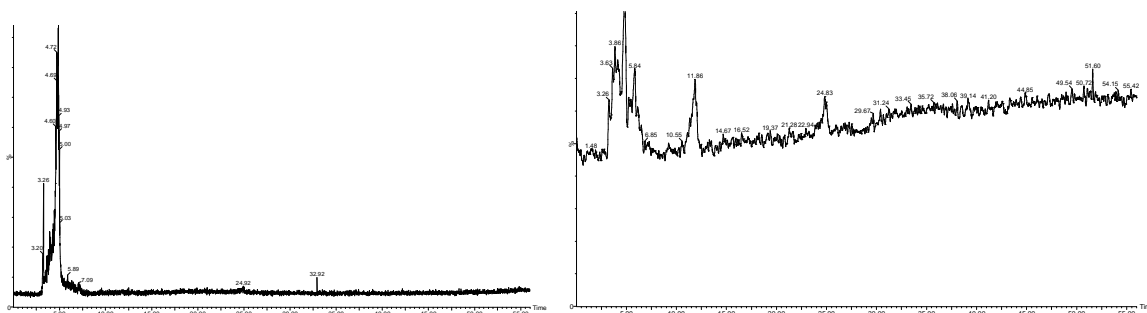


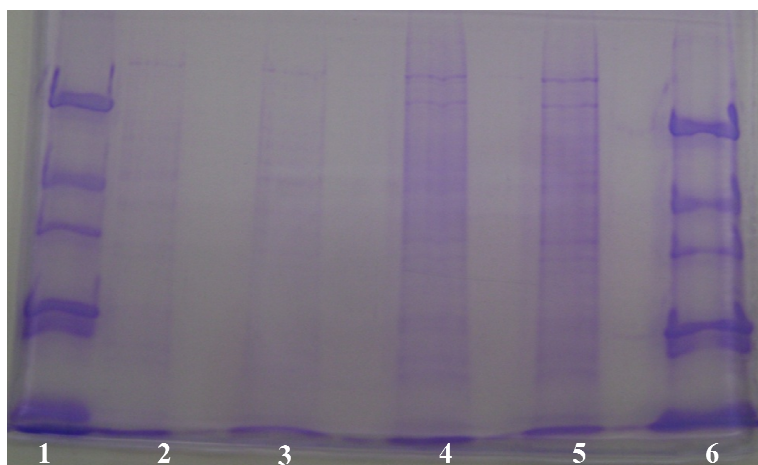
FIGURA 4.20 - Cromatogramas referentes aos experimentos 11 e 12 descritos na tabela 4.8.

A partir dos TICs referentes às análises dos ensaios enzimáticos, visualiza-se que o fungo foi apto na produção da enzima PAL no seu metabolismo e verifica-se que a enzima foi devidamente extraída e o produto da reação enzimática foi observado nos extratos referentes ao sobrenadante 1,

conforme assinalado em vermelho, indicando mesmo tempo de retenção quando comparado ao cromatograma de SRM obtido para o ácido cinâmico padrão. Este experimento representou o primeiro passo para o processo de purificação e posterior caracterização da enzima PAL nativa.

No intuito de simplificar o protocolo 1, o micro-organismo foi cultivado em meio de cultura líquido Czapeck enriquecido com 2% de extrato de levedura durante cinco dias sob agitação de 120 rpm. Em seguida, as células do fungo foram trituradas e às células foram adicionados 10 mL de tampão tris-HCl 25 mM pH 8.8. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi utilizado como fonte enzimática.

Uma vez preparados os extratos enzimáticos, estes foram avaliados em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%. Realizou-se o gel de poliacrilamida SDS no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular-LBBM sob a orientação da Prof. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza. Na figura 4.21 abaixo se visualiza o gel obtido.



**1 e 6** - Padrão de peso molecular (MM 116, 66, 45, 35, 25, 18, 14)

**2 e 3** - Extrato enzimático armazenado à 4°C

**4 e 5** - Extrato enzimático armazenado à -20°C

FIGURA 4.21 - Gel de poliacrilamida SDS monodimensional dos extratos enzimáticos.

No primeiro e último poços observam-se os padrões de massas moleculares, já nos poços 2 e 3 observa-se o extrato enzimático depois de três dias guardado em geladeira a 4 °C. Nos poços 4 e 5, observa-se os extratos enzimáticos do sobrenadante depois de ser refrigerado em freezer, -20 °C também durante três dias. Os resultados indicaram que proteínas com a massa molecular em torno de 70-80 kDa (massa molecular aproximada dos monômeros da enzima PAL isolada a partir de diferentes organismos relatados na literatura) foram produzidas e extraídas segundo o protocolo apresentado.

Foram realizados ainda, ensaios enzimáticos com o objetivo de verificar a extração da enzima PAL de maneira eficiente. Os extratos referentes às reações enzimáticas foram analisados via HPLC-MS/MS no modo de aquisição SRM, para detecção do ácido cinâmico. As análises indicaram, entretanto, que em nenhum dos extratos foi possível detectar o ácido cinâmico e, portanto, verifica-se que a extração da enzima PAL não foi eficiente segundo o protocolo 2 descrito.

A partir destes estudos preliminares desenvolveu-se uma metodologia para a obtenção do extrato enzimático de *P. brasilianum*, visando posteriormente, a purificação e a caracterização da enzima PAL nativa. Uma vez obtido o extrato enzimático pelo protocolo 1 descrito, uma etapa interessante no processo de pré-purificação do extrato proteico seria a precipitação fracionada com sulfato de amônio. Este processo se baseia na precipitação de proteínas pela alta concentração de sulfato de amônio e caracteriza-se por ser um processo muito importante para a separação de misturas complexas de proteínas, uma vez que a concentração de sal necessária para precipitação é diferente para cada proteína.

Com base em estudos descritos na literatura relacionados à purificação da enzima PAL (produzida por diferentes fontes, principalmente micro-organismos) realizou-se a precipitação fracionada visando 25, 55 e 85% de saturação. Posteriormente, cada um dos precipitados foram ressuspensos em

tampão tris-HCl pH 8.8, dessalinizados e submetidos a testes de atividade da enzima estudada (item 3.4.13).

Em seguida, os extratos das reações enzimáticas foram analisados via HPLC-MS/MS para o monitoramento da produção do ácido cinâmico. As condições para a realização das análises são descritas no item 3.4.9, assim como a transição utilizada nas análises por SRM. Os TICs referentes às reações enzimáticas com o precipitado 25%, precipitado 55% e precipitado 85% são visualizados nas figuras abaixo.

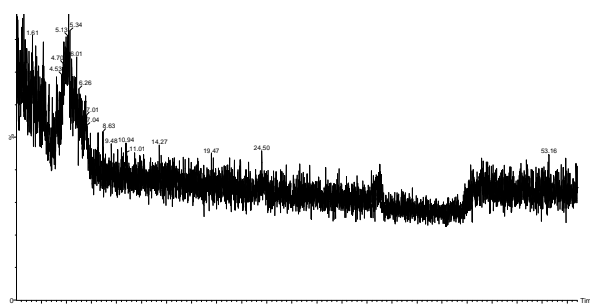


FIGURA 4.22 - Cromatograma referente à reação enzimática com o precipitado 1 (25% saturação).

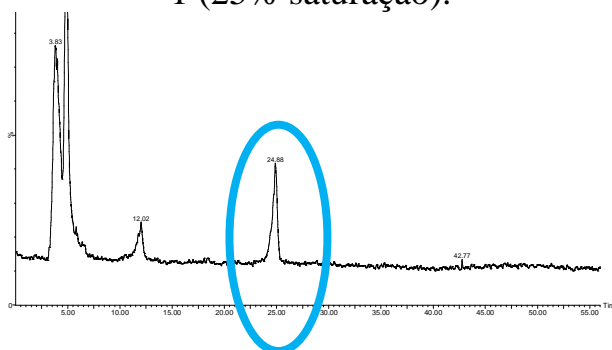


FIGURA 4.23 - Cromatograma referente à reação enzimática com o precipitado 2 (55% saturação).

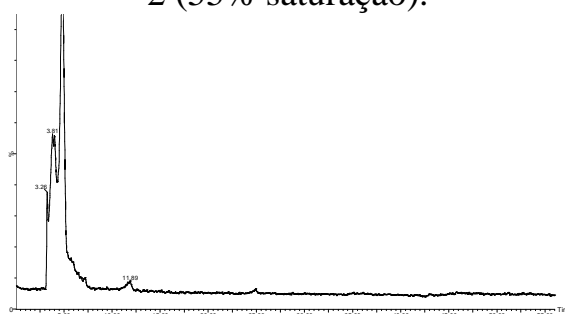


FIGURA 4.24 - Cromatograma referente a reação enzimática com o precipitado 3 (85% saturação).

A partir dos TICs referentes às análises dos ensaios enzimáticos com os precipitados obtidos a partir da precipitação fracionada com sulfato de amônio, visualiza-se que a enzima de interesse se encontra na fração referente a 55% de saturação, obtendo-se desta maneira, mais uma etapa de purificação enzimática com sucesso.

Estudos de otimização dos parâmetros de cultivo do fungo visando máxima produção da enzima PAL também foram realizados e os dados apresentados anteriormente com relação a intensificação da produção de brasiliamidas em diferentes meios nos levaram a questionar a produção da enzima PAL nos meios de cultura na presença de Phe. A maior produção da enzima implicaria em uma maior facilidade de purificação e caracterização desta. Neste sentido, no intuito de verificar a influência do aminoácido na produção da primeira enzima da rota biossintética dos compostos em estudo, o fungo foi cultivado em meio líquido Czapeck (2% extrato de levedura) na presença de L-fenilalanina ( $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) e na ausência do aminoácido respectivamente para posterior avaliação quantitativa.

Foram obtidos extratos enzimáticos, para ambos os cultivos apresentados, partindo da mesma massa micelial do fungo *P. brasilianum* nos experimentos para conseguinte avaliação da produção de PAL. Em seguida, verificou-se quantitativamente a produção da enzima PAL através da formação do ácido cinâmico, produto da reação enzimática.

A maior produção do ácido cinâmico implica na maior produção da enzima PAL pelo micro-organismo estudado, uma vez que as áreas referentes às bandas cromatográficas são proporcionais a concentração de ácido cinâmico produzido e, conseqüentemente, proporcional a produção da enzima PAL no extrato proteico. Os cromatogramas referentes à reação enzimática para ambos os extratos enzimáticos obtidos são visualizados abaixo. Na tabela abaixo 4.6, visualizam-se as áreas encontradas para os experimentos propostos.

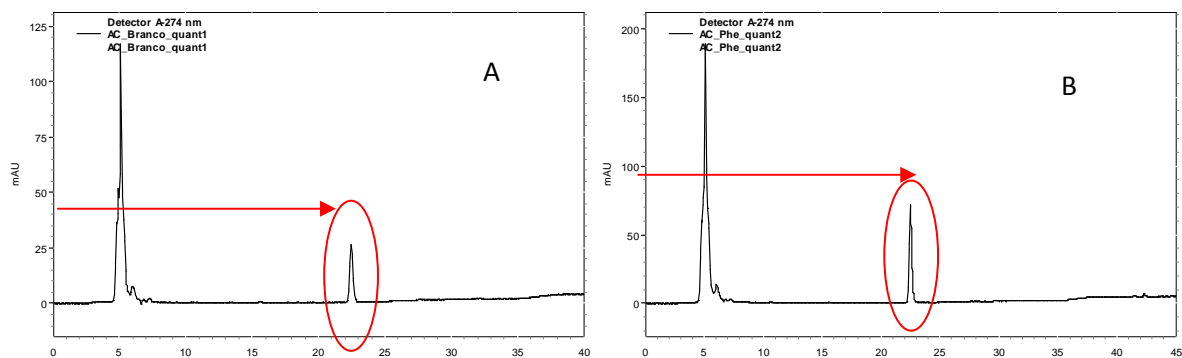


FIGURA 4.25 - Cromatogramas obtidos para as reações enzimáticas com os extratos brutos obtidos do cultivo do fungo na ausência (A) e presença de Phe (B) respectivamente.

TABELA 4.6 - Áreas encontradas para o cultivo do fungo na ausência e presença de Phe

Meio de cultura estudado	Área da banda cromatográfica referente ao ácido cinâmico (media da triplicata)
Czapeck	417901
Czapeck enriquecido com Phe (0,5g.L <sup>-1</sup> )	1205148

De acordo com os resultados apresentados, a adição do aminoácido Phe ao meio de cultura induz a maior produção da enzima PAL e consequentemente, aumenta a produção das brasiliamidas no meio de cultivo, conforme visualizado no estudo descrito (Tabela 4.1). A adição da Phe estimulou a produção da enzima PAL em 288% com relação ao meio de cultivo sem a adição do aminoácido exógeno. A área do ácido cinâmico produzido a partir da reação enzimática com o extrato enzimático obtido a partir do meio suplementado com Phe foi três vezes maior quando comparado a produção do ácido cinâmico no extrato enzimático sem Phe.

A produção da enzima PAL pelo fungo *P. brasilianum* também foi avaliada quando o fungo foi submetido a modificações na composição do meio de cultivo. Sabe-se que modificações nas condições de cultivo podem alterar a composição proteica e conseqüentemente, o metabolismo secundário do micro-organismo. Dessa maneira, o estudo visou a avaliação da produção da enzima PAL pelo fungo quando cultivado em diferentes meios de cultivo, podendo-se determinar o meio de cultura mais adequado para estudo da enzima PAL.

O fungo foi cultivado em quatro diferentes meios de cultura, descritos no item 3.4.14. Os meios foram selecionados de acordo com a literatura visando à maior produção da enzima PAL. Posteriormente, a produção da enzima pode ser quantificada a partir da produção do ácido cinâmico produzido a partir do aminoácido Phe nos ensaios de atividade com os extratos enzimáticos preparados a partir dos cultivos do fungo em diferentes meios de cultivo. A tabela 4.7 abaixo apresenta os dados de área obtidos para o ácido cinâmico através das análises via HPLC/UV nos diferentes extratos enzimáticos gerados a partir dos quatro diferentes cultivos.

TABELA 4.7 - Áreas obtidas para o ácido cinâmico a partir das reações enzimáticas com a PAL obtida quando o fungo foi cultivado em diferentes meios de cultivo

Meio de cultura selecionado	Área da banda cromatográfica referente ao ácido cinâmico (media da triplicata)
Czapeck	264635
BD	373599
<b>Malte</b>	<b>568791</b>
Beef	364321



Através da análise dos dados obtidos verificou-se a maior produção da enzima PAL no meio de cultura com composição de extrato de malte, extrato de levedura, Phe e H<sub>2</sub>O, constatação importante nos passos posteriores de purificação e caracterização da enzima alvo.

Os parâmetros de incubação da reação catalisada por uma enzima de interesse também são muito importantes para os estudos envolvendo todos os passos de purificação e caracterização estrutural. Uma vez que existem poucos relatos na literatura envolvendo a enzima PAL produzida por micro-organismos, visou-se a otimização dos parâmetros de incubação da enzima que foram avaliados no intuito de máxima produção do ácido cinâmico nas reações enzimáticas. O pH ótimo para as enzimas PALs descritas em diferentes organismos esta na faixa de 8.2 ~ 9.0 e a temperatura ótima reportada varia entre os organismos estudados. PAL isolada de tabaco apresenta temperatura ótima em 35 °C, 55 °C em girasol, e 44 ~ 46 °C em *Rhizoctonia* (HYUN et al., 2011).

Os parâmetros avaliados nas reações foram temperatura (38, 50 e 60 °C), pH (7,8, 8,8 e 10,2) e tempo de incubação (24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 e 120 h). As reações foram realizadas em triplicata avaliando inicialmente o pH e a temperatura e uma vez otimizados, o tempo de incubação.

A produção de ácido cinâmico foi monitorada através de análises por HPLC/UV e, a partir das áreas geradas nos cromatogramas, determinou-se os melhores parâmetros de incubação. Os dados foram avaliados no software estatística.

A tabela 4.8 abaixo apresenta as áreas referentes às bandas cromatográficas do ácido cinâmico, quando a enzima PAL era submetida a diferentes condições de temperatura e pH. Os experimentos foram realizados em duplicata que são denominadas A e B na tabela 4.8 apresentada.

TABELA 4.8 - Valores de áreas encontradas para o ácido cinâmico quando a reação enzimática foi submetida a variações na temperatura e pH.

T(°C)	pH	A	B	[A]	[B]	Média	Desvio padrão
38	7,8	226047	209519	0,002436	0,00227	2,35	8,26E-05
38	8,8	307534	317395	0,003251	0,00335	3,30	4,93E-05
38	10,2	0	425519	0,000176	0,00443	2,30	2,13E-03
50	7,8	2716786	2594693	0,027343	0,02612	26,73	6,10E-04
50	8,8	3011271	2606300	0,030288	0,02624	28,26	2,02E-03
50	10,2	2729671	2845915	0,027472	0,02863	28,05	5,81E-04
60	7,8	0	165752	0,000176	0,00183	1,00	8,29E-04
60	8,8	272483	709355	0,002900	0,00727	5,08	2,18E-03
60	10,2	224366	260235	0,002419	0,00278	2,60	1,79E-04

A partir dos dados visualizados na tabela 4.8, pode-se avaliar os valores ótimos de pH e temperatura utilizados na reação enzimática. O gráfico de superfície apresentado na figura 4.26 ilustra este resultado.

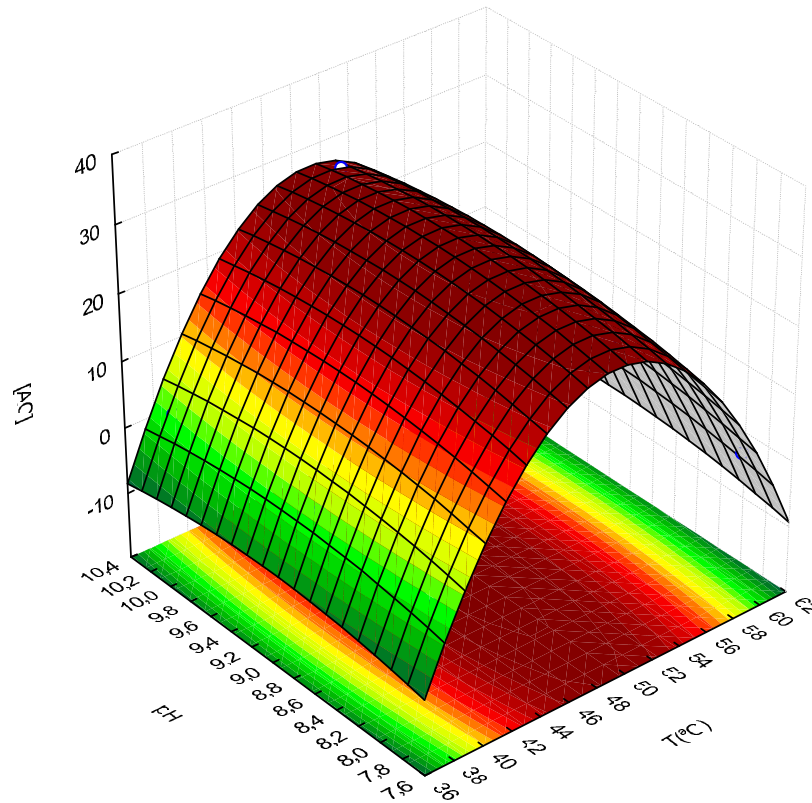


FIGURA 4.26 - Gráfico tridimensional onde se visualiza as condições ótimas de temperatura e pH para a reação enzimática com a enzima PAL.

No gráfico visualizado na figura 4.27, que representa o corte do gráfico 4.26 anterior, pode-se determinar a temperatura ótima de incubação em 49 °C e o pH ótimo da reação em 8,9 - 9,0, conforme indicado abaixo. As cores mais intensas apresentadas no gráfico indicam a maior concentração de ácido cinâmico formado na reação enzimática testada.

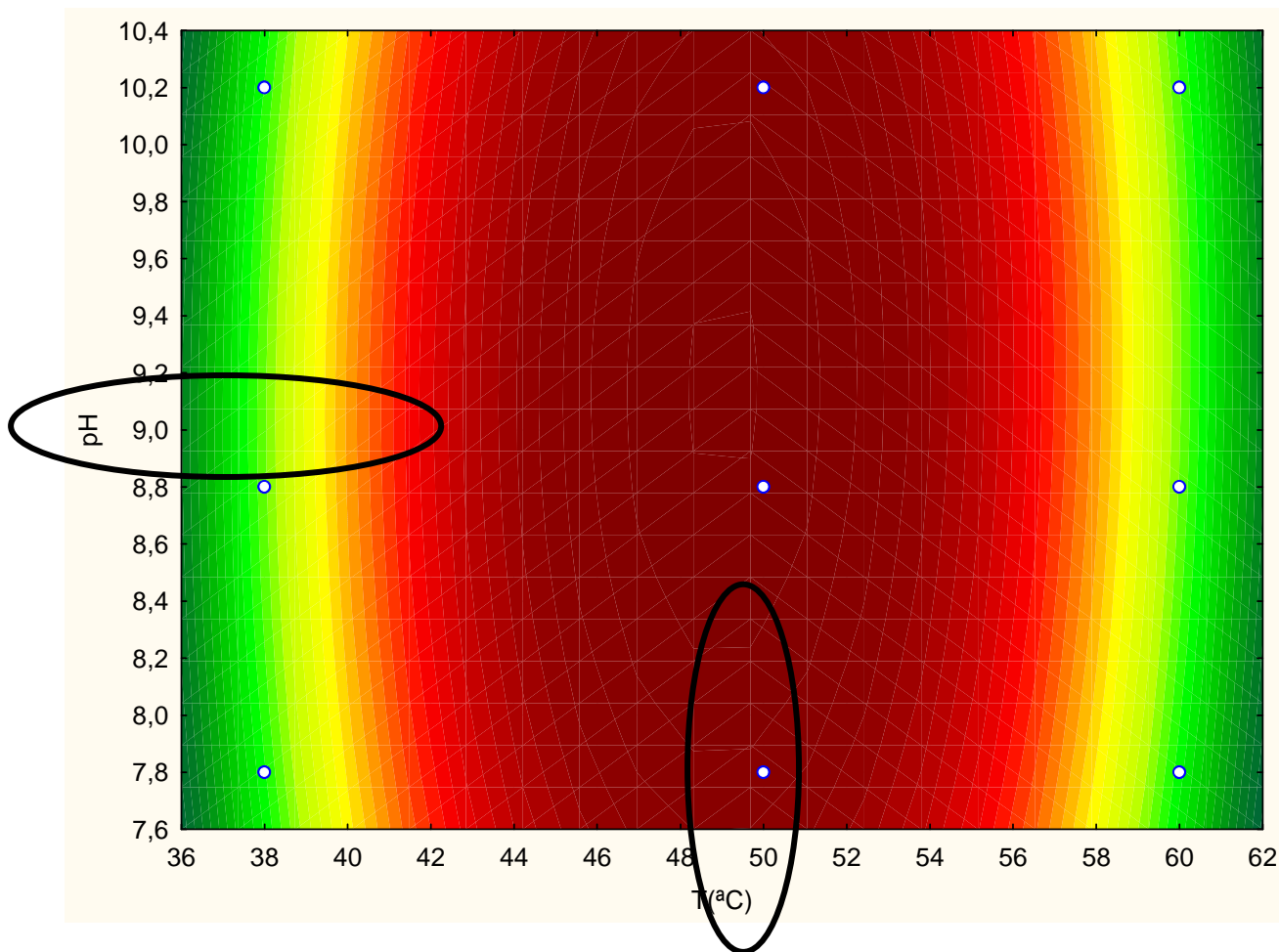


FIGURA 4.27 - Gráfico tridimensional onde se visualiza as condições ótimas de temperatura e pH para a reação enzimática com a enzima PAL, agora visto de cima. Em preto observam-se os parâmetros ótimos avaliados no experimento.

O tempo de incubação da reação utilizando como fonte enzimática os extratos proteicos brutos de *P. brasilianum* também foi avaliado e verifica-se máxima produção de ácido cinâmico em 97 horas de reação, conforme observado no gráfico apresentado na figura 4.28.

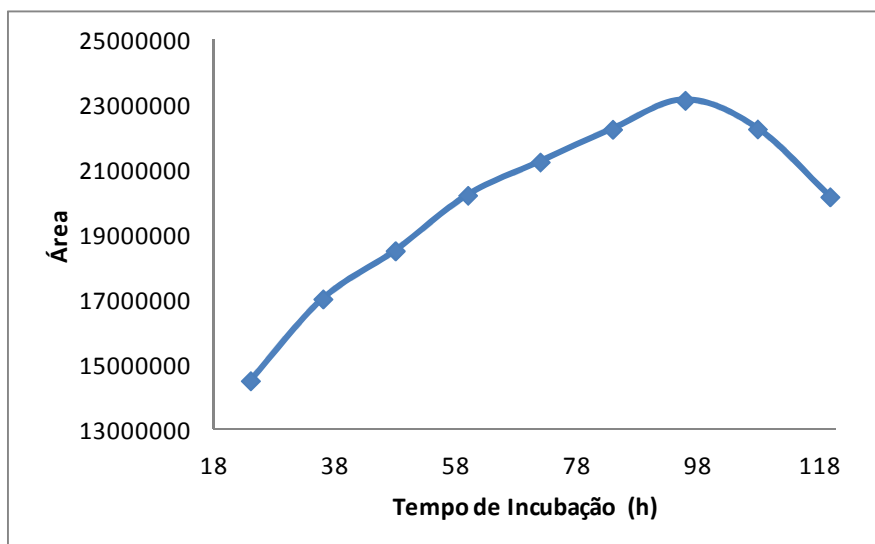


FIGURA 4.28 - Gráfico indicando o tempo de incubação ótimo da reação enzimática com o extrato bruto proteico de *P. brasiliianum*.

O processo de purificação de uma proteína de interesse consiste em uma combinação de técnicas que exploram as diferentes propriedades da proteína-alvo, como a carga elétrica, o tamanho e a solubilidade, as quais variam de uma proteína para outra, visando isolá-la das demais em um extrato proteico. A purificação pode ser feita por uma série de etapas e técnicas cromatográficas diferentes que devem obedecer a uma sequência lógica, baseadas nas propriedades do material. Múltiplas etapas ocasionam perdas inerentes de amostras e conseqüentemente, levam a um baixo rendimento do processo.

A fonte de proteína no presente estudo foram células do micro-organismo *P. brasiliianum*. As células foram rompidas e as proteínas obtidas em solução foram chamadas de extrato bruto (protocolo 1). O processo de purificação enzimático foi avaliado através de testes de atividade da enzima PAL e também testes que avaliam a pureza e a eficiência do processo como a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS.

Com base em trabalhos na literatura envolvendo a purificação da enzima PAL produzida por micro-organismos, foram desenvolvidas estratégias

de purificação baseadas na literatura, todas baseadas em cromatografia de troca iônica, exclusão molecular e hidrofobicidade.

A tabela a seguir descreve o processo de purificação da enzima PAL produzida por *Rhizoctonia solani* e *Rhodotorula glutinis*, respectivamente, nos quais foi baseado o processo de purificação da enzima PAL produzida pelo fungo *P. brasilianum*.

TABELA 4.9 - Purificação da enzima PAL produzida pelos fungos *Rhizoctonia solani* e *Rhodotorula glutinis* (MACDONALD & D’CUNHA, 2007)

<b>Passos para purificação da PAL de <i>Rhizoctonia solani</i></b>	<b>Passos para purificação da PAL de <i>Rhodotorula glutinis</i></b>
Precipitação com sulfato de amônio (0-55%)	Tratamento com temperatura
Precipitação com acetona (40-60%)	Precipitação com sulfato de amônio (0-55%)
Cromatografia por troca iônica (coluna DEAE)	Cromatografia por troca iônica (coluna DEAE)
-	Cromatografia por interação hidrofóbica (coluna Fenil)
-	Cromatografia por exclusão molecular)

Baseado nos processos de purificação descritos na tabela acima, e nas propriedades da enzima PAL descrita por outros organismos, um primeiro protocolo de purificação foi proposto visando à purificação e o isolamento da enzima PAL produzida pelo fungo *P. brasilianum*.

Inicialmente, o precipitado com 55% de saturação obtido através da adição de sulfato de amônio ao extrato enzimático foi ressuspendido em tampão tris-HCl pH 8.8 e dessalinizado com auxílio de uma membrana de diálise. Em seguida, este extrato foi submetido à cromatografia de troca iônica. A coluna utilizada foi uma aniônica DEAE Sepharose, onde o grupo carregado

responsável pela separação cromatográfica é  $-N^+(C_2H_5)_2H$ . A escolha da fase estacionária foi baseada na literatura (tabela 4.9) relacionada à enzima PAL já identificada por outros micro-organismos. A separação foi realizada aumentando linearmente a proporção de NaCl na fase móvel, conforme descrito no item 3.4.16. O cromatograma obtido a partir da separação proposta pode ser visualizado na figura 4.29 abaixo.

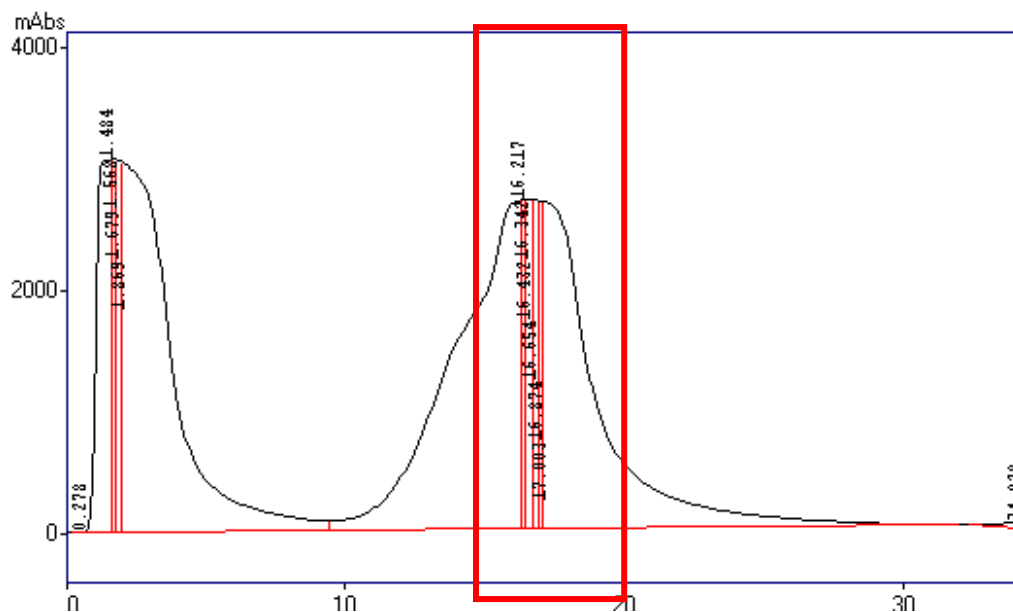


FIGURA 4.29 - Cromatograma obtido para a cromatografia de troca iônica realizada para o extrato das células de *P. brasiliense*. No eixo x o tempo de corrida e no eixo y a absorbância medida. Em vermelho, as frações ativas com relação à enzima PAL.

As frações desta etapa de purificação foram submetidas a testes de atividade e eletroforese SDS-PAGE para localizar a proteína estudada e verificar a eficiência do processo, respectivamente. Em seguida, as frações ativas (15-20 minutos) assinaladas em vermelho, para a enzima PAL foram reunidas, concentradas no centrífugo e dessalinizadas em membrana de diálise contra tampão tris-HCl pH 8.8 com 1M  $(NH_4)_2SO_4$ . Posteriormente, a subfração obtida foi submetida à cromatografia de hidrofobicidade (HIC). Utilizou-se uma coluna Phenyl Sepharose onde, neste caso, as proteínas são eluídas reduzindo a

interação hidrofóbica através da redução de íons no tampão com o decrescimo do gradiente de sal. As frações foram novamente submetidas a testes de atividade e eletroforese SDS-PAGE. O cromatograma obtido nesta etapa de purificação pode ser observado na figura 4.30 abaixo.

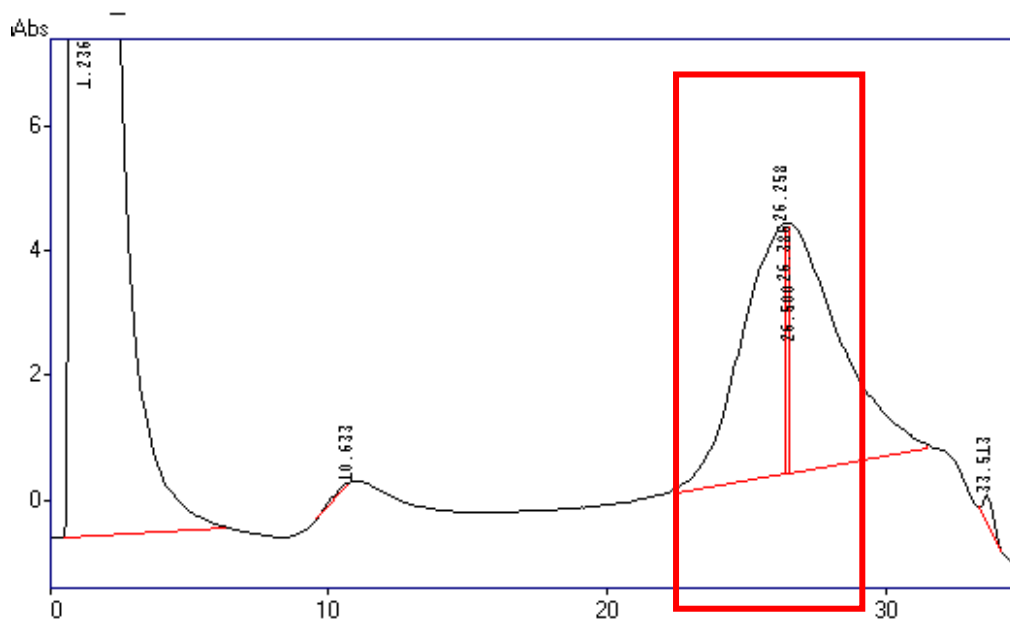


FIGURA 4.30 - Cromatograma referente a etapa de cromatografia de interação hidrofóbica realizada para o extrato das células de *P. brasilianum*. No eixo x o tempo de corrida e no eixo y a absorbância medida. Em vermelho, as frações ativas com relação à enzima PAL.

As frações obtidas a partir da cromatografia de interação hidrofóbica que se mostraram ativas, assinaladas em vermelho na figura 4.28, (22-29 minutos) foram reunidas e dessalinizadas em membrana de diálise. Todas as etapas do processo podem ser visualizadas no gel monodimensional SDS-PAGE apresentado na figura 4.31.



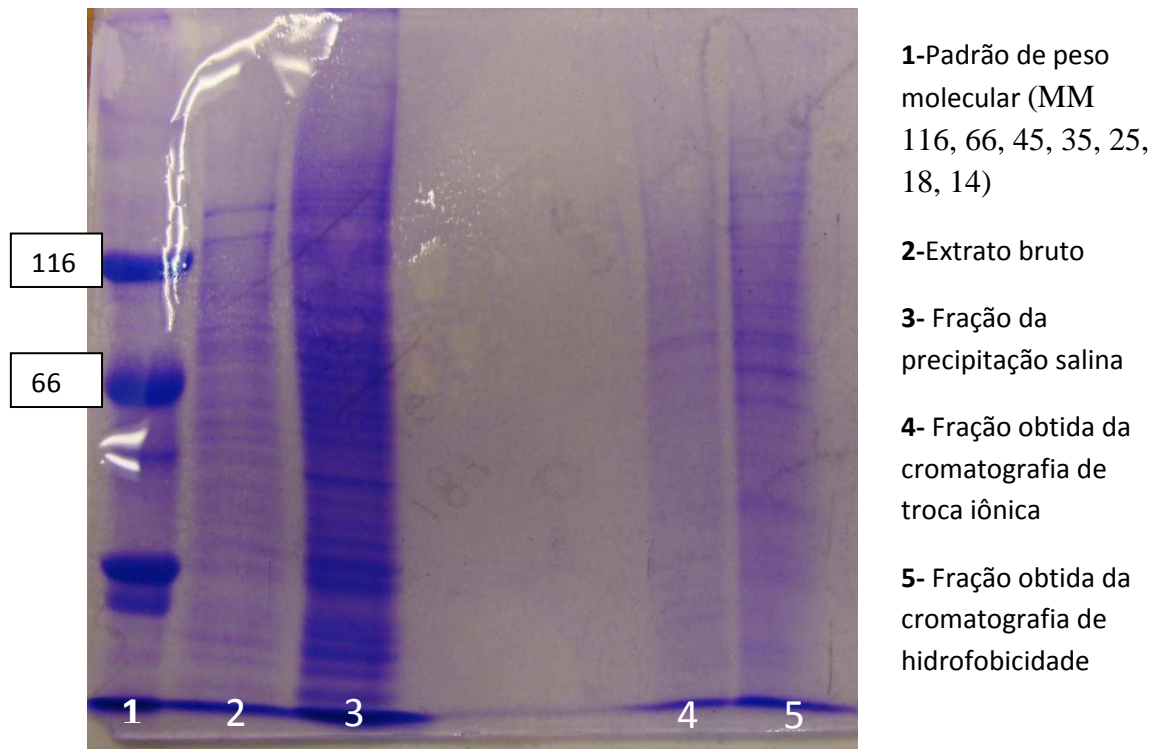


FIGURA 4.31 - Gel de poliacrilamida SDS-PAGE das etapas do protocolo de purificação 1.

A análise do gel monodimensional indicou que o protocolo de purificação 1 não foi eficiente, uma vez que mesmo após consecutivos processos de purificação através de diferentes técnicas cromatográficas ainda existem inúmeras impurezas conforme observado na canaleta 5 da figura 4.31 acima.

A observação do gel anterior nos levou a aplicar outra metodologia (protocolo 2), agora baseada no tamanho da enzima de interesse (maior que 200kDa). Inicialmente, o precipitado com 55% de saturação foi ressuspenso em tampão e dessalinizado em membrana de diálise contra tampão tris-HCl 50 mM pH 8.8 e submetido a cromatografia de exclusão molecular. Neste caso, utilizou-se uma coluna Superdex S200 e modo de eluição isocrático com tampão tris-HCl 50 mM pH 8.8 com 0,2 M de NaCl. O cromatograma obtido está mostrado na figura 4.32.

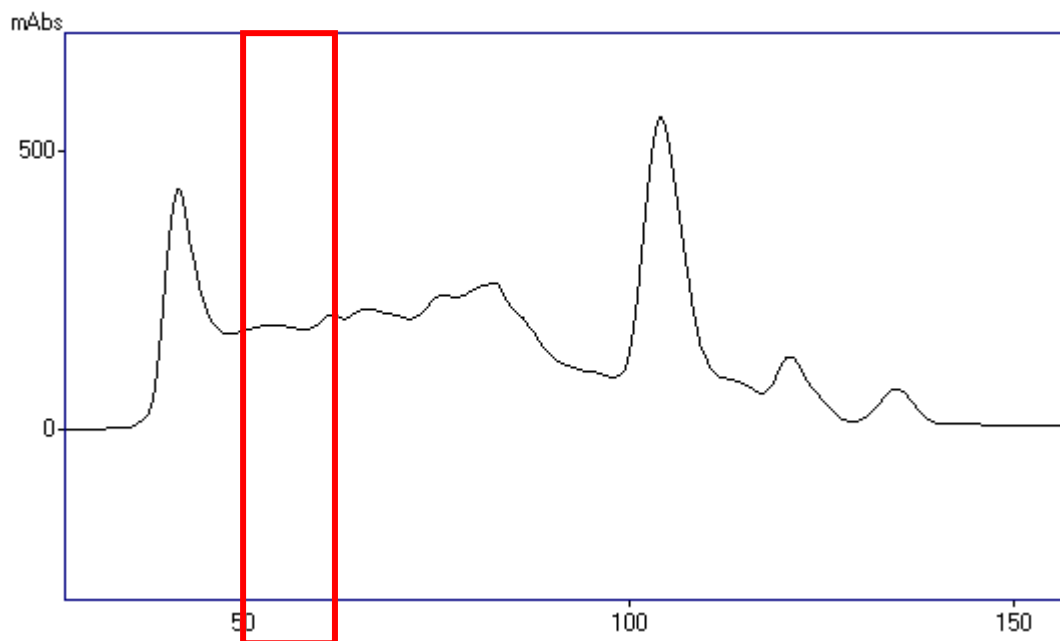


FIGURA 4.32 - Cromatograma obtido na etapa de cromatografia por exclusão molecular. No eixo x o tempo de corrida e no eixo y a absorbância medida. Em vermelho, as frações ativas com relação à enzima PAL.

Posteriormente, as frações que apresentaram atividade (50-60 minutos) para a enzima PAL foram reunidas e concentradas em centrífuga e dessalinizadas em membrana de diálise. Em seguida, a fração obtida foi submetida à cromatografia de troca iônica, utilizando-se uma coluna DEAE e gradiente de eluição linear descrito no item 3.4.16. O cromatograma obtido pode ser visualizado na figura abaixo, assim como visualiza-se em vermelho as frações ativas na enzima PAL que foram reunidas e concentradas.

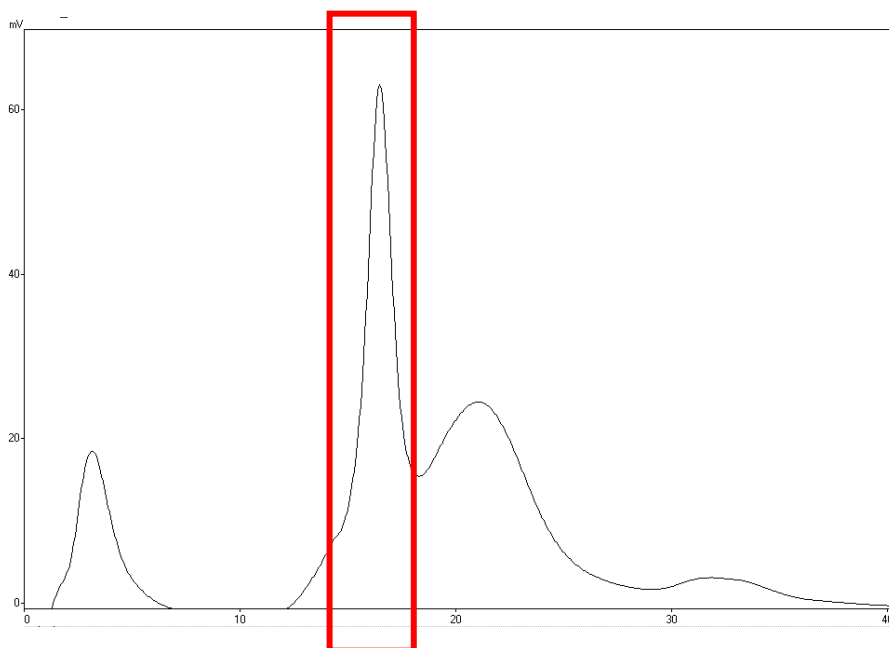
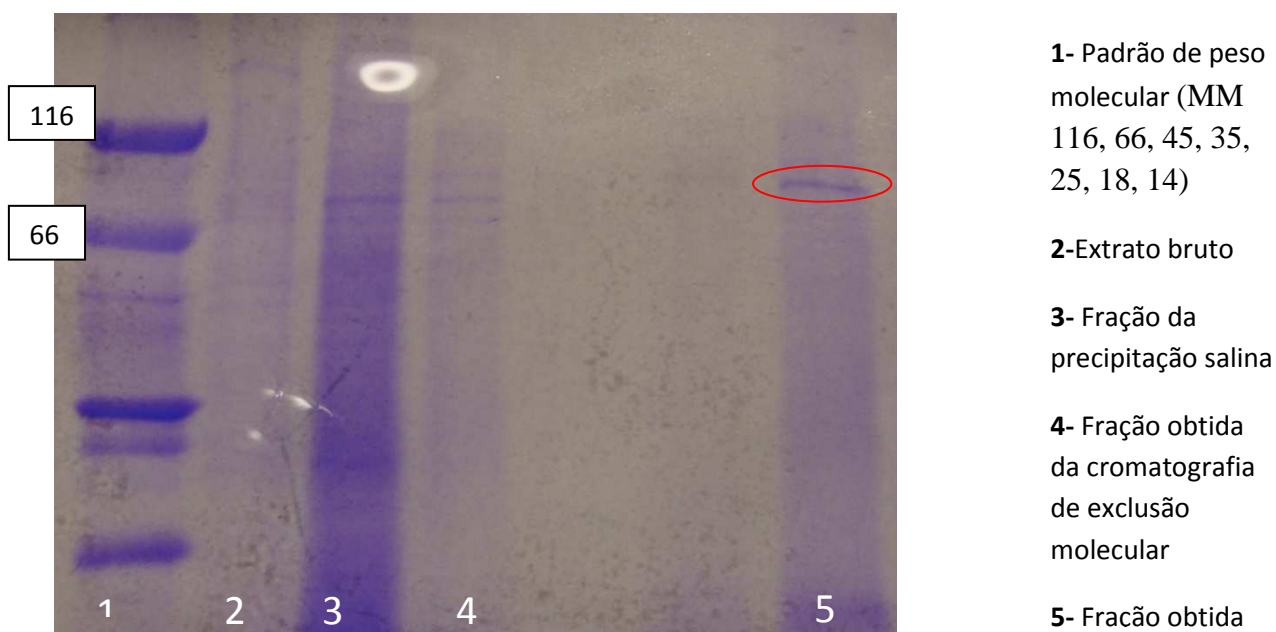


FIGURA 4.33 - Cromatograma obtido na etapa de cromatografia por troca iônica. No eixo x o tempo de corrida e no eixo y a absorvância medida. Em vermelho, as frações ativas com relação à enzima PAL.

O processo de purificação pode ser avaliado através da realização de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. As canaletas indicam cada uma das etapas de purificação apresentadas no segundo protocolo testado.



- 1-** Padrão de peso molecular (MM 116, 66, 45, 35, 25, 18, 14)
- 2-** Extrato bruto
- 3-** Fração da precipitação salina
- 4-** Fração obtida da cromatografia de exclusão molecular
- 5-** Fração obtida

FIGURA 4.34 - Gel de poliacrilamida SDS-PAGE das etapas do protocolo de purificação 2.

A partir da análise do gel apresentado, verifica-se que o segundo protocolo de purificação teve uma maior eficiência quando comparado ao primeiro devido ao menor número de bandas proteicas observadas no gel de poliacrilamida, conforme assinalado na figura 4.34 acima. Em seguida, a banda assinalada em vermelho na figura 4.34 foi recortada do gel e digerida com tripsina, conforme procedimento descrito no item 3.4.17 e identificada por espectrometria de massas.

A tripsina é uma protease e apresenta grande especificidade em relação ao substrato, catalisando a hidrólise das ligações lisina e arginina. A digestão das enzimas em peptídeos menores, aliada a dados de espectrometria de massas inerentes a estes peptídeos gera informações que culminam na identificação das proteínas em bancos de dados. Para tal fim, dois tipos de resultados são utilizados. O primeiro usa a informação relativa à massa molecular dos peptídeos oriundos da digestão enzimática (*Peptide Mass Fingerprint* – PMF), enquanto o segundo, faz uso de resultados obtidos pela fragmentação de peptídeos individuais previamente detectados (CANTÚ et al., 2008).

Os programas mais comumente empregados para a identificação de proteínas em bancos de dados a partir de dados de MS são o *Sequest* e o *Mascot*. No caso deste estudo, utilizou-se o *Mascot*. Ambos os programas correlacionam espectros de massas de fragmentação (não interpretados) de peptídeos com sequências de aminoácidos de proteínas registradas em bancos de dados. De forma geral, estes programas têm como objetivo encontrar a sequência de aminoácidos, em um determinado banco de dados, que melhor descreve os íons fragmentos encontrados em um espectro. As sequências “candidatas” são procuradas nos bancos de dados de acordo com a massa do peptídeo intacto e com o espectro de fragmentação obtido para cada peptídeo (CANTÚ et al., 2008).

Neste sentido, os peptídeos gerados foram analisados por MS e a partir da utilização do software *Mascot*, pode-se determinar a identidade da proteína purificada. A análise indicou similaridade com a enzima glutamato desidrogenase, produzida pelo fungo *P.chrysogenum*, conforme se visualiza na figura 4.35 abaixo.

Query	Dupes	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	M	Score	Expect	Rank	U	1	2	3	Peptide
2.1	1	549.3162	1096.6178	1096.6241	-0.0062	0	64	0.0015	1	U	■	■	■	K.ALQVSVPER.V
2.2	1	564.8087	1127.6028	1127.6015	0.0013	0	57	0.03	1	U	■	■	■	K.FLGFQIFK.N
2.3	1	566.2885	1130.5624	1130.5720	-0.0096	0	47	0.0049	1	U	■	■	■	R.NQMGVLTGK.G

FIGURA 4.35 - Busca por similaridade na base de dados NCBI.

A similaridade entre as enzimas pode ser visualizada na figura 4.36. Em preto verifica-se a enzima glutamato desidrogenase produzida por *P. chrysogenum* e disponível no banco de dados analisado. Em vermelho pode-se observar os peptídeos produzidos pela digestão da enzima produzida por *P. brasilianum*.

```

1  MMQNLPFPEPE FEQAYKELAS TLENSTLRFQK KPEYRKALQV VSVPERVIQF
51  RVVWEDDKGQ VQINRGYRVQ FNSALGPYKG GLRFHPTVNL SILKFLGFQ
101 IFKNALTGLN MGGGKGGSDF DPKGKTNEI RRFCVSFMTL LCKHIGADTD
151 VPAGDIGVTG REVGFMFGQY KKIRNQWEGV LTGKGGSWG SLIRPEATGY
201 GVVYVEHMI QHASGGKESF AGKRVAISGS GNVAQYAALK VIELGGSVIS
251 LSDSQGALVL NGEESFSTAE EINTIAEIKV QRKQIAELAT QDAFSSKFKY
301 IPGARPWNTI AGRIDVALPS ATQNEVSGDE AKALIAAGCK FIAEGSNMGS
351 TQEAI DVFEA HRDANPGAAA IWYAPGKAAN AGGVAVSGLE MAQNSARVNW
401 SREEVDSRLK KIMEDCFNNG LSTAKEYVTP AEGVLP SLVA GSNIAGFTKV
451 AEAMKEHGDW W

```

FIGURA 4.36 - Similaridade entre as enzimas glutamato desidrogenase produzidas por *P. marneffeii* (preto) e *P. brasilianum* (vermelho).

A enzima glutamato desidrogenase é responsável pela formação do composto  $\alpha$ -cetoglutarato a partir do glutamato como substrato da reação enzimática e faz parte do metabolismo primário do micro-organismo. Ainda que a análise por espectrometria de massas indicasse a purificação da enzima glutamato desidrogenase produzida por *P. brasilianum*, os ensaios de atividade apresentados anteriormente atestam a produção da enzima PAL, uma vez que a fração foi ativa e o ácido cinâmico foi produzido e detectado. Dessa maneira, verifica-se que a enzima PAL possivelmente encontra-se em traços na fração analisada e esta impura conforme atestado pelas análises por EM. Embora a concentração da enzima não fosse suficiente para caracterização bioquímica da proteína, alguns estudos foram realizados no intuito de determinação da especificidade enzimática com a fração ativa de PAL.

As enzimas são catalisadores extraordinários, assim como apresentam um alto grau de especificidade, isso significa que elas discriminam muito bem entre substratos competidores. A especificidade surge a partir do fato de que a enzima apresenta grupos funcionais arranjados de forma ótima a formar uma variedade de interações químicas com um dado substrato no estado de transição. No intuito de estudar a especificidade da enzima PAL produzida pelo fungo *P. brasilianum*, diferentes substratos foram administrados na reação enzimática com a enzima estudada, todos apresentando alta similaridade estrutural ao aminoácido fenilalanina (4-bromo-Phe; 4-cloro-Phe; tirosina). Em seguida, os extratos obtidos a partir da reação enzimática foram analisados por HPLC-MS/MS, visando à busca dos produtos da desaminação dos compostos, o que indicaria a atuação da enzima PAL nos substratos testados.

Inicialmente foi avaliado o composto 4-bromo-fenilalanina como substrato da reação enzimática. O espectro de massas (*full scan*) do produto da reação pode ser visualizado na figura 4.37 abaixo.

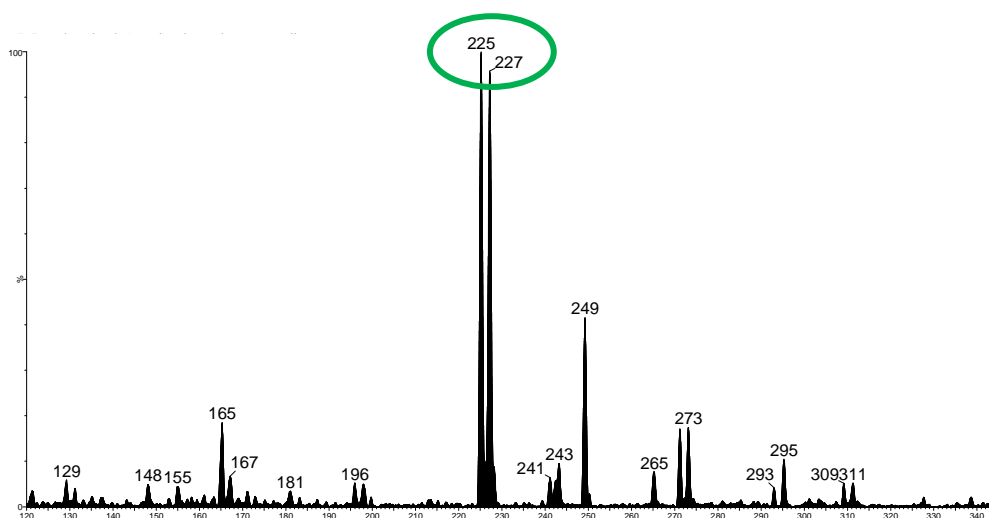


FIGURA 4.37 - Espectro de massas do produto obtido a partir da reação enzimática da PAL com o 4-bromo-fenilalanina como substrato.

A partir do espectro de massas obtido visualiza-se a formação de um produto de reação com 17 unidades de massa a menos do que o substrato adicionado na reação, uma vez que é detectada a formação do íon com relação  $m/z$  225. O produto formado parece estar coerente com a ação da enzima PAL que catalisa a saída do grupo  $\text{NH}_3$  do aminoácido. Verifica-se ainda na figura 4.37 um íon com relação  $m/z$  227 numa proporção de 1:1, característico do perfil isotópico do elemento bromo na molécula ionizada, e, portanto, comprova-se a atuação da PAL no substrato bromado adicionado.

Foram realizados experimentos de MS/MS no intuito de confirmar a identidade do produto formado conforme visualizado na figura 4.38 abaixo.

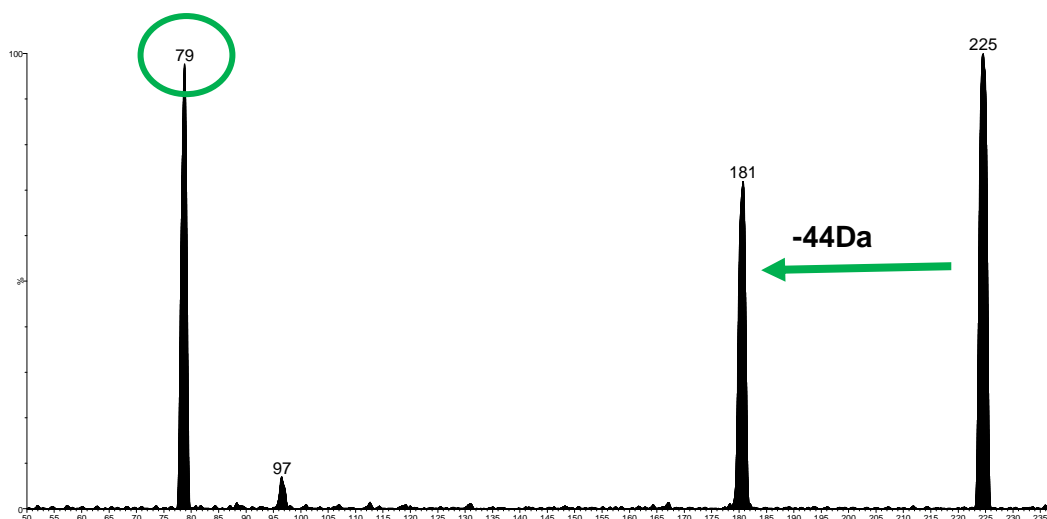
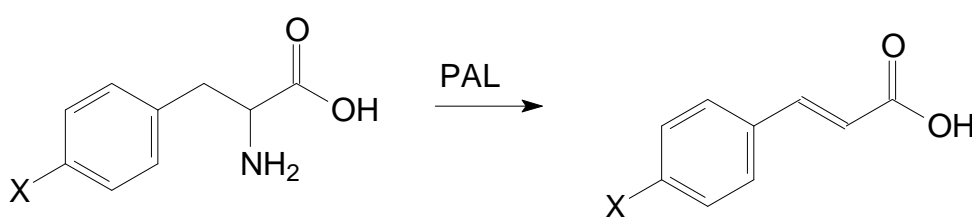


FIGURA 4.38 - Espectro de MS/MS do produto formado a partir da reação enzimática da PAL com o 4-bromo-fenilalanina como substrato.

Os íons formados no espectro de MS/MS apresentado confirmam a presença do átomo de bromo na estrutura química do produto da reação ( $m/z$  79), assim como a perda de 44 unidades de massa, indicando a saída de uma molécula de  $\text{CO}_2$  e desta maneira, não deixam dúvidas da atuação da enzima PAL no substrato testado. A reação enzimática catalisada pela enzima PAL no substrato testado pode ser observada na figura 4.39 abaixo.



**X= Br; Cl**

FIGURA 4.39 - Reação enzimática da enzima PAL com os substratos halogenados testados no experimento proposto.

Outro substrato adicionado à reação que visou testar a especificidade da enzima PAL foi o 4-cloro-fenilalanina. O produto da reação



foi analisado por HPLC-MS e seu respectivo espectro de massas (*full scan*) podem ser vistos na figura 4.40 abaixo.

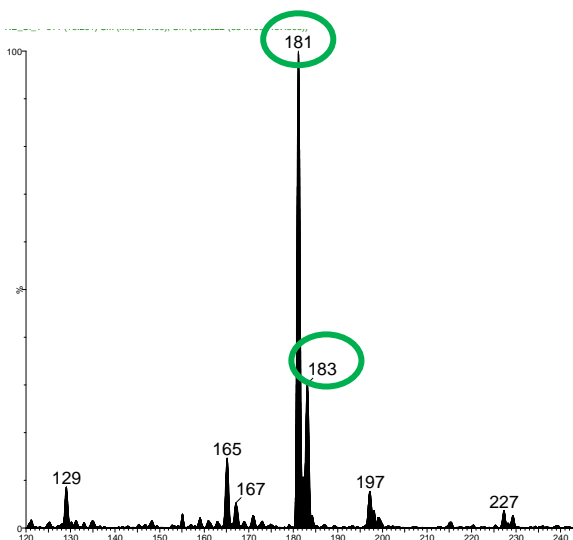


FIGURA 4.40 - Espectro de massas do produto obtido a partir da reação enzimática da PAL com o 4-cloro-fenilalanina como substrato.

No espectro de massas apresentado na figura 4.40 observa-se um íon com relação  $m/z$  181, que apresenta 17 unidades de massa a menos que o substrato adicionado, indicando também a atuação da enzima PAL no substrato adicionado. Visualiza-se ainda a presença de um íon  $[M+H+2]^+$  com  $m/z$  183 numa proporção de 33% com relação ao pico do íon molecular protonado, característica da presença do átomo de cloro na molécula formada. A fragmentação do produto formado foi estudada através de estudos de MS/MS e o espectro de íons produtos pode ser observado abaixo.

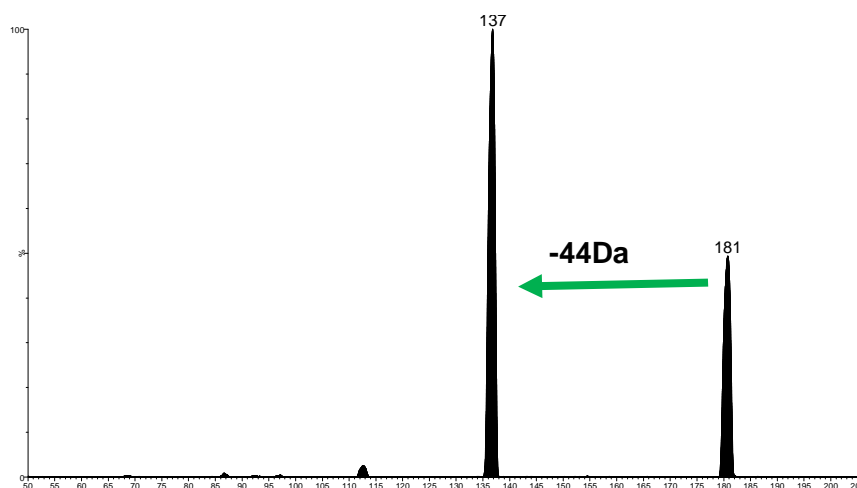


FIGURA 4.41 - Espectro de MS/MS do produto formado a partir da reação enzimática da PAL com o 4-cloro-fenilalanina como substrato.

A análise do espectro de massas apresentado acima indica a formação do produto visualizado na figura 4.39, onde **X** é um átomo de cloro. Dessa maneira atestou-se que a enzima PAL apresenta especificidade para ambos os substratos halogenados testados.

Existem duas rotas biossintéticas potenciais a partir de aminoácidos aromáticos para a formação do ácido p-cumárico. Na primeira rota (figura 4.42), conhecida nas plantas, o ácido p-cumárico é formado num processo de duas etapas. A primeira etapa é a atuação da enzima PAL a qual é responsável pela saída do grupamento amino do aminoácido Phe formando o ácido cinâmico. O próximo passo é a atuação da enzima citocromo P-450 que catalisa a oxidação do ácido cinâmico, com conseqüente formação do ácido p-cumárico. Em outra rota biossintética, mais curta, o aminoácido tirosina é desaminado para levar a formação do ácido p-cumárico sem que haja a formação do ácido cinâmico (figura 4.42).

Algumas enzimas PAL além de converter o aminoácido Phe a ácido cinâmico aceitam como substrato o aminoácido Tir, e, nestes casos, a enzima passa a ter a denominação de TAL (Tirosina amônia-liase) e o produto da reação é o ácido p-cumárico. Entretanto, a descrição na literatura das enzimas

PAL/TAL tanto produzidas por plantas quanto por micro-organismos, são descritas por preferirem a Phe como substrato, o que significa que a conversão da catálise é muito maior neste caso. As únicas exceções foram recentemente reportadas pela bactéria *Rhodobacter capsulatus* e também para o organismo *Rhodobacter sphaeroides*. A enzima PAL/TAL reportada para *Rhodobacter capsulatus* apresenta atividade TAL 150 vezes maior do que a enzima PAL e apresenta maior homologia do gene com plantas (32% de identidade com a sequência da PAL da planta *Pinus taeda*) do que com micro-organismos (VANELLI et al., 2007).

Uma vez que a obtenção do ácido-p-cumárico pela rota biossintética envolvendo a enzima TAL é mais direta e desejável, alguns pesquisadores tem se dedicado a estudar micro-organismos que apresentem alta conversão do aminoácido Tir em ácido p-cumárico pela TAL.

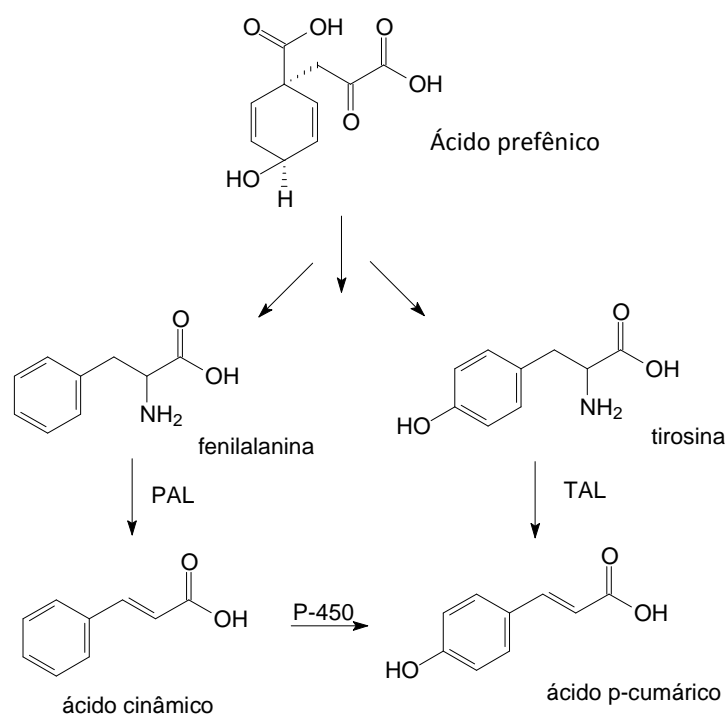


FIGURA 4.42 - Formação do ácido p-cumárico por duas vias metabólicas diferentes, pela ação das enzimas PAL e da TAL.

Dessa maneira, foi investigada também a habilidade da enzima PAL produzida pelo fungo *P. brasilianum* em atuar como tirosina amônia-liase (TAL) através da adição do aminoácido tirosina como substrato da reação enzimática. O extrato obtido através da reação realizada foi analisado por HPLC-MS e pode-se através do cromatograma de íon selecionado observado na figura 4.43 abaixo, visualizar a formação do íon com relação  $m/z$  163, massa referente à desaminação do aminoácido adicionado, indicando que a enzima PAL produzida por *P. brasilianum* também pode atuar como TAL.

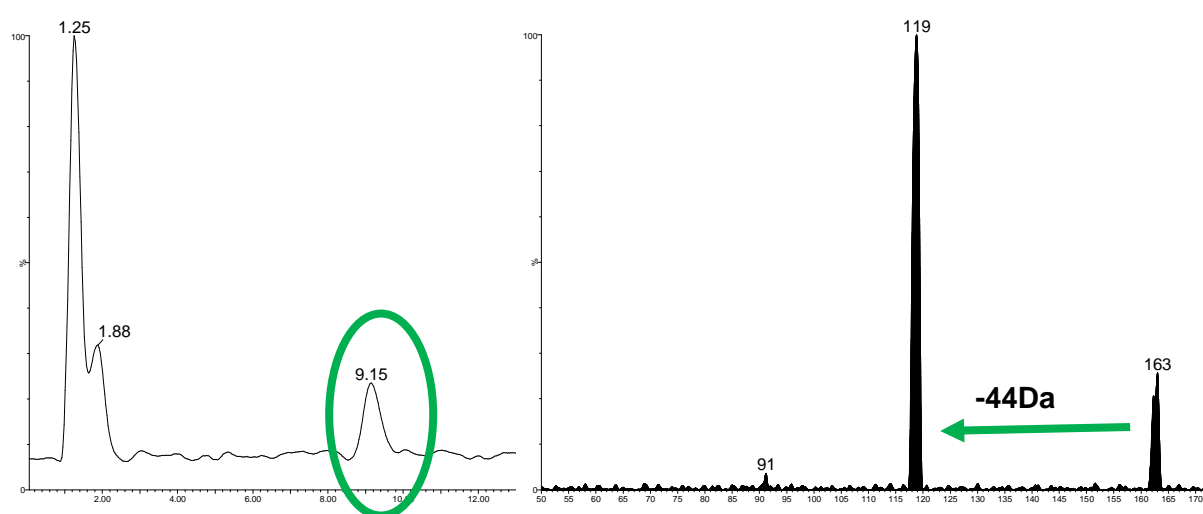


FIGURA 4.43 - Cromatograma de íons selecionados de  $m/z$  163, correspondente a formação do ácido p-cumárico, assinalado em verde e espectro de MS/MS do ácido p-cumárico, respectivamente.

A fragmentação do produto formado foi estudada através de estudos de MS/MS (figura 4.43) e visualiza-se no espectro de massas a perda de 44 unidades de massa referente a uma molécula de  $\text{CO}_2$  que comprova a formação do ácido p-cumárico e a consequente atuação da enzima estudada como TAL.

A especificidade da enzima PAL foi estudada por outros micro-organismos produtores. No caso do fungo *Rhizoctonia solani* a enzima PAL foi incubada com vários substratos (2.5 mM) em tampão Tris-HCl 25 mM durante 30 minutos. Os substratos testados estão descritos na tabela 4.10 abaixo, assim

como os valores encontrados de atividade para os substratos (KALGATGI & SUBBARAO, 1975).

TABELA 4.10 - Especificidade da enzima PAL produzida por *Rhizoctonia solani* (KALGATGI & SUBBARAO, 1975).

<b>Substrato testado</b>	<b>Atividade (%)</b>
L-tirosina	15
3,4-Dihidroxifenilalanina	10
p-fluorfenilalanina	31
o-fluorfenilalanina	14
D-fenilalanina	N.D.
p-cloro-fenilalanina	N.D.
L-triptofano	N.D.

Visualiza-se na tabela acima algumas similaridades com a enzima PAL produzida pelo fungo *P. brasilianum*, como a formação do ácido p-cumárico pela desaminação da tirosina. Entretanto, observa-se que a enzima PAL produzida pelo fungo *Rhizoctonia solani* não foi apta em catalisar a reação utilizando o 4-cloro-fenilalanina, conforme observamos para a enzima estudada de *P. brasilianum*. Este é mais um indicativo de que as enzimas, embora apresentem a mesma função de catálise, elas apresentam inúmeras peculiaridades, cabendo o estudo de cada uma delas em particular.

A tentativa de incorporar halogênios em estruturas de metabólitos secundários deriva do conhecimento de que hoje um número significativo de fármacos com uso clínico é baseado em metabólitos secundários halogenados produzidos por micro-organismos e plantas. A incorporação de halogênios, por exemplo, os elementos F, Cl e Br na estrutura química de um produto natural podem resultar em mudanças positivas na atividade biológica destes compostos, assim como na sua bioavaliação e estabilidade. Neste sentido, halogênios

fornece uma versátil funcionalização em um sítio específico da estrutura molecular. O método tradicional de gerar análogos halogenados de produtos naturais é através da síntese orgânica destes compostos, o que torna o método muito demorado e com alto custo. Uma abordagem então, seria o uso de micro-organismos associados ao conhecimento da biologia molecular, no intuito de gerar novos análogos halogenados (GOSS et al., 2003).

Dessa maneira, no intuito de avaliar *in vivo* a especificidade da enzima PAL, assim como, avaliar a adição de aminoácidos halogenados no metabolismo do fungo *P. brasilianum*, e como uma tentativa de produção de metabólitos secundários halogenados via o caminho dos fenilpropanóides, o micro-organismo *P. brasilianum* foi cultivado em meio de cultura líquido Czapeck, com a adição de 15 mg em três frascos de Erlenmeyer de cada um dos aminoácidos halogenados: 4-bromo-fenilalanina; 4-cloro-fenilalanina e 4-fluor-fenilalanina. Três frascos foram mantidos como controle do metabolismo do fungo em meio líquido Czapeck. O experimento foi realizado de maneira estática e posteriormente, sob agitação para comparação qualitativa.

Os extratos foram em seguida analisados via HPLC/UV-MS nas condições descritas no item 3.4.20 anterior. Na figura 4.44, visualizam-se os cromatogramas referentes ao controle (sem adição de aminoácidos halogenados) em comparação ao cromatograma referente ao cultivo do fungo em meio líquido (partição) suplementado com os diferentes aminoácidos halogenados.

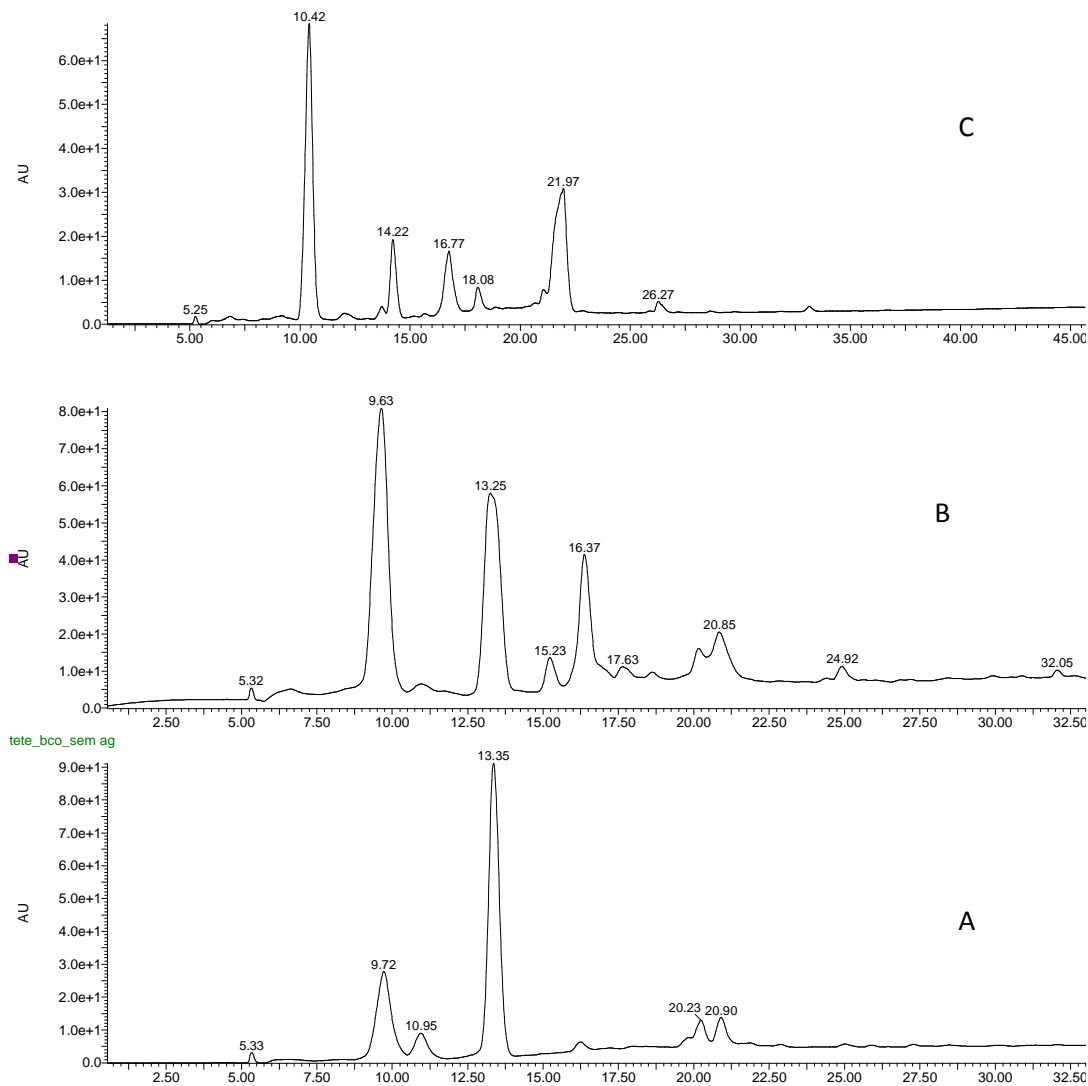


FIGURA 4.44 -Cromatogramas referentes ao controle (A) e cromatograma referente ao cultivo com adição de 4-bromo-fenilalanina (B); com a adição de 4-cloro-fenilalanina (C).

Observam-se diferenças significativas quando se comparam os cromatogramas referentes ao controle, sem adição de aminoácidos halogenados (Figura 4.44 A) e referente ao cultivo do fungo em meio líquido suplementado com 4-bromo-fenilalanina (Figura 4.44B) e com a adição de 4-cloro-fenilalanina (Figura 4.44C). A diferença mais significativa, entretanto, é o aparecimento em 16,37 min de uma banda cromatográfica, conforme visualizado na figura 4.44B e o aparecimento de uma banda cromatográfica em 14,22 minutos na figura 4.44C. As outras diferenças são de cunho quantitativo das substâncias já produzidas no controle pelo micro-organismo e não são relevantes para a

discussão, já que o objetivo do estudo é verificar a produção de metabólitos secundários halogenados.

Uma vez que estão sendo realizadas análises por HPLC/UV-MS foi possível que cada banda observada nas análises por HPLC/UV-MS fosse relacionada ao seu respectivo espectro de massas. Dessa maneira, as bandas cromatográficas no TIC (cromatograma de íons totais) referente às bandas cromatográficas em 16,37 minutos na figura 4.44B e 14 minutos na figura 4.44C foram processadas e o espectro de massas (*full scan*) pode ser observado na Figura 4.45 abaixo.

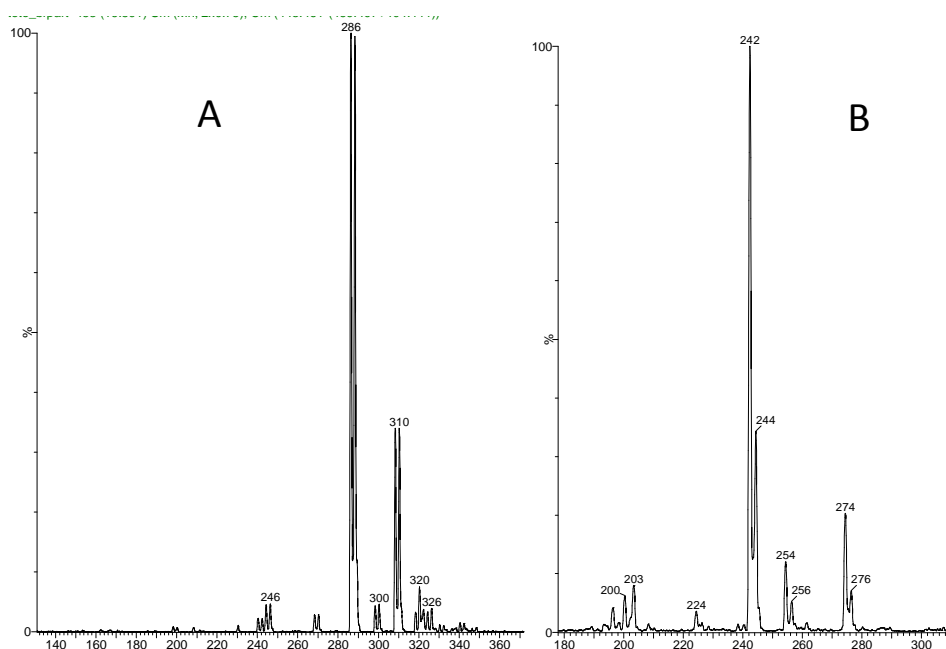


FIGURA 4.45 - Espectro de massas obtido para a banda em 16 minutos (A); Espectro de massas obtido para a banda em 14 minutos (B).

A partir dos espectros de massas apresentados na figura 4.45 anterior, visualiza-se a produção de metabólitos secundários com 42 unidades de massa a mais ( $m/z$  286 e  $m/z$  242) do que os padrões adicionados no meio de cultura líquido, 4-bromo-fenilalanina e 4-cloro-fenilalanina respectivamente ( $m/z$  244 e  $m/z$  200). Verifica-se na figura 4.45A um íon isótopo com relação  $m/z$  288 numa proporção de 1:1, característico da presença do elemento bromo na molécula ionizada. Já no espectro de massas apresentado na figura 4.45B



observa-se um íon com relação  $m/z$  244, numa proporção de 33% com relação ao pico do íon molecular protonado, característica da presença do átomo de cloro na molécula formada.

Com o conhecimento de que o fungo produziu possíveis produtos de biotransformação, foram propostos experimentos no intuito de determinar a estrutura molecular destes produtos formados e visualizar as transformações realizadas pelo micro-organismo nas estruturas moleculares dos padrões adicionados. Inicialmente, foram realizados experimentos de HPLC/UV-MS/MS para o íon de relação  $m/z$  286 referente ao produto de biotransformação do padrão 4-bromo-fenilalanina e o espectro de íons produtos pode ser visualizado na figura 4.46 abaixo.

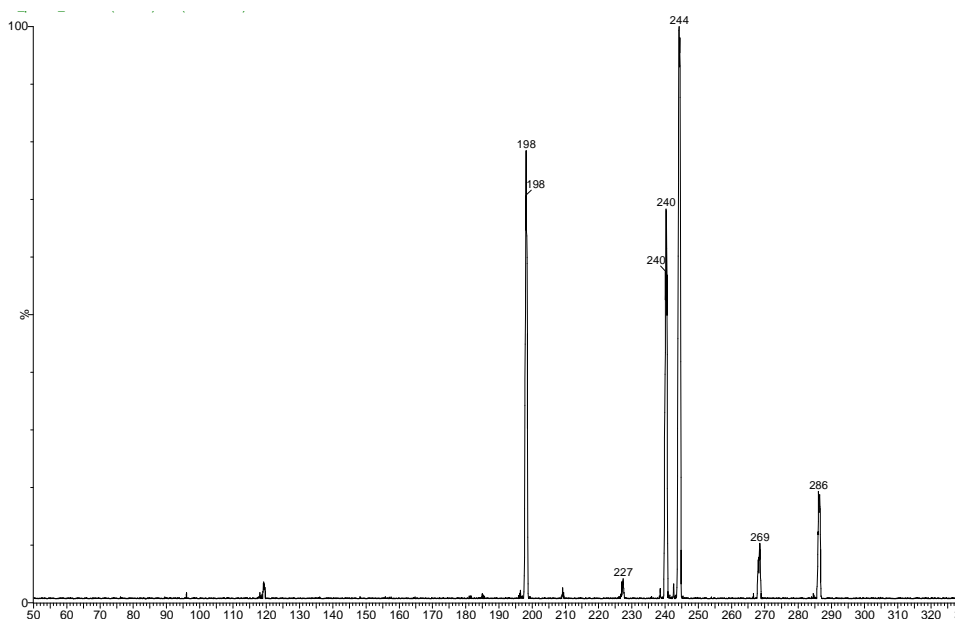


FIGURA 4.46 - Espectro de íons produtos para o produto de biotransformação do 4-bromo-fenilalanina.

Em seguida, foram realizados experimentos via HPLC/UV-MS/MS para o íon com relação  $m/z$  242, produto de biotransformação formado a partir do padrão 4-cloro-fenilalanina, o espectro de íons produtos pode ser visualizado na figura 4.47 abaixo.

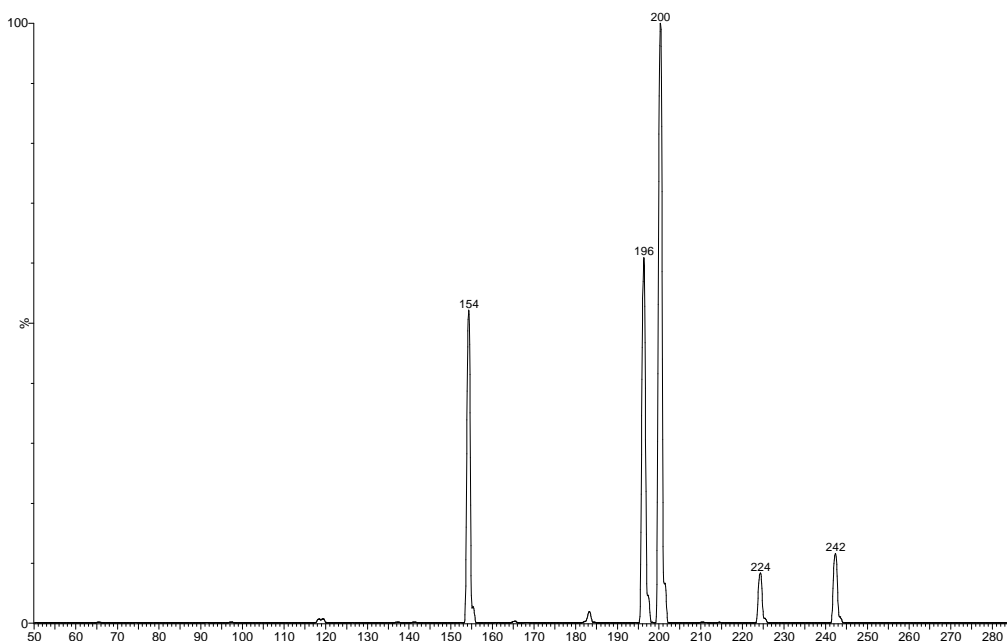


FIGURA 4.47 - Espectro de íons produtos para o composto N-acetilado produzido a partir do padrão 4-cloro-fenilalanina.

A partir dos espectros de íons produtos referentes aos produtos de biotransformação produzidos pelo fungo, visualizam-se perdas características de 42 unidades (ceteno) de massa e 46 unidades de massa (ácido fórmico), propôs-se a partir dos dados uma possível estrutura para os produtos formados a partir da biotransformação dos aminoácidos halogenados. A estrutura molecular referente ao produto formado é apresentada na figura 4.48 abaixo, e é resultado de uma *N*-acetilação dos aminoácidos adicionados. O mecanismo de fragmentação do produto *N*-acetilado pode ser visualizado na figura 4.49 abaixo.

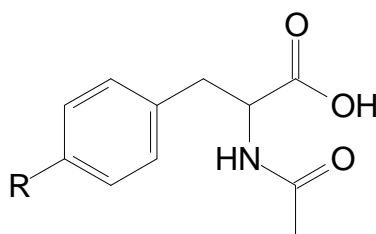


FIGURA 4.48 - Estrutura molecular proposta para os produtos formados.

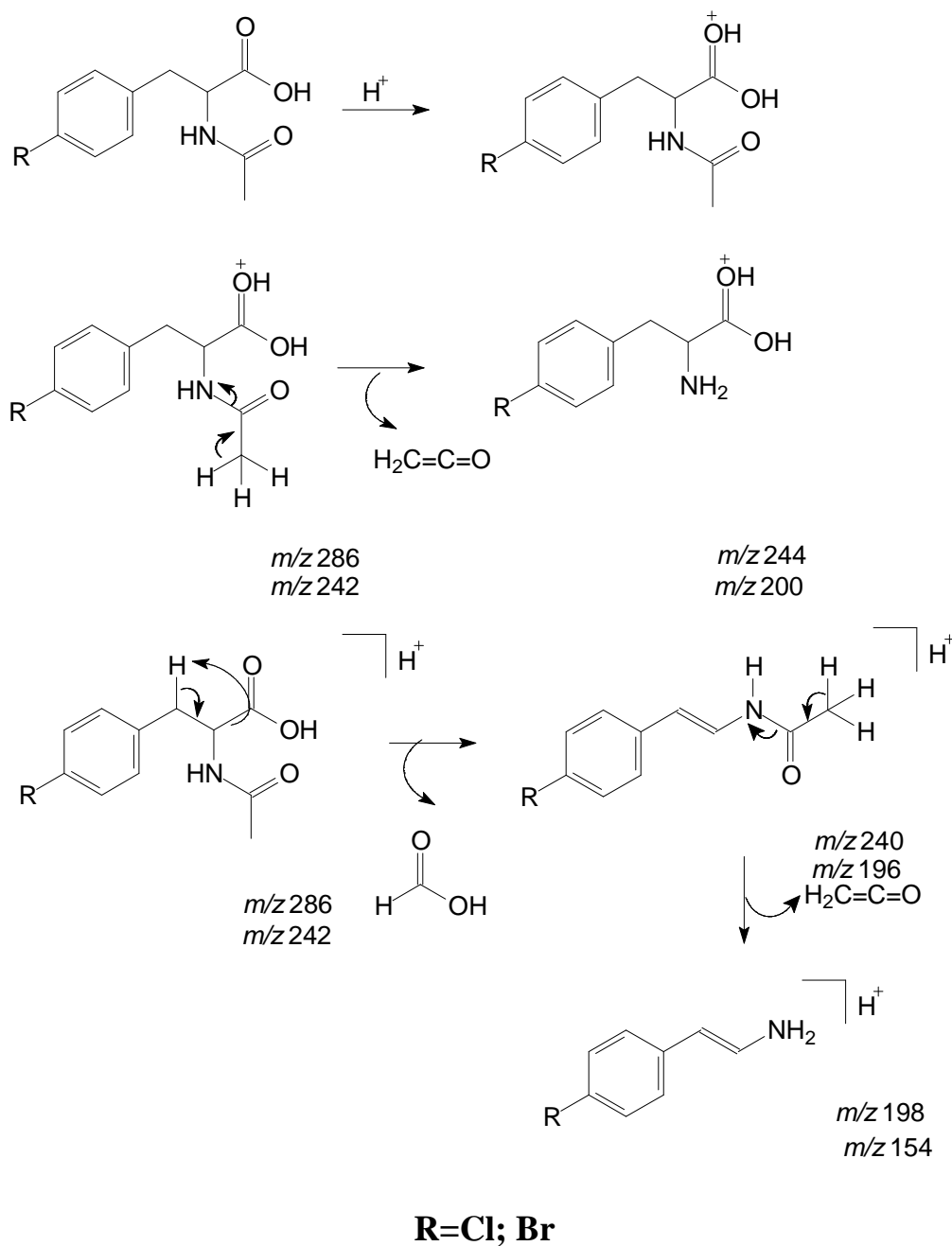


FIGURA 4.49 - Mecanismo de fragmentação proposto para as molécula acetiladas formadas.

No mecanismo de fragmentação proposto visualiza-se inicialmente, o rearranjo de hidrogênio, levando a saída de ceteno com respectiva perda de massa de 42 unidades. Em seguida, observa-se a migração de hidrogênio e correspondente saída de 46 unidades de massa, referente à saída de uma molécula de ácido fórmico, conforme observado na figura 4.49. A partir do íon com relação  $m/z$  240 ou  $m/z$  196, observa-se um rearranjo de hidrogênio e

consequente saída de ceteno, levando ao íon  $m/z$  198 ou  $m/z$  154, correspondente à perda de 42 unidades de massa.

Em estudos por espectrometria de massas, cada um dos elementos apresenta isótopos menos abundantes que levam a íons  $[M+H+1]^+$  e  $[M+H+2]^+$  no espectro de massas. No caso do elemento bromo, são formados íons referentes a  $[M+H+2]^+$  com intensidade de 1:1 com relação ao pico do íon molecular. Já quando nos referimos ao elemento cloro, o íon  $[M+H+2]^+$  apresenta intensidade de 33% com relação ao pico do íon molecular protonado. Neste sentido, existe uma ferramenta no software (*Masslinx* 4.1) que gera o espectro de massas com a proporção isotópica da fórmula molecular inicial apresentada. Essa ferramenta foi importante no estudo estrutural dos produtos de biotransformação produzidos pelo fungo. Dessa maneira, gerou-se um espectro de massas considerando-se a N-acetilação dos aminoácidos halogenados adicionados a partir das fórmulas moleculares das substâncias propostas ( $C_{11}H_{11}NO_3Br$ ) e ( $C_{11}H_{11}NO_3Cl$ ) respectivamente, transformação que levaria a 42 unidades de massa a mais nas estruturas moleculares dos padrões adicionados, assim como observado anteriormente. Nas figuras 4.50 e 4.51 visualizam-se os espectros encontrados para os aminoácidos N-acetilados formados pelo micro-organismo assim como os espectros de massas com as proporções isotópicas sugeridas pelo software do equipamento.

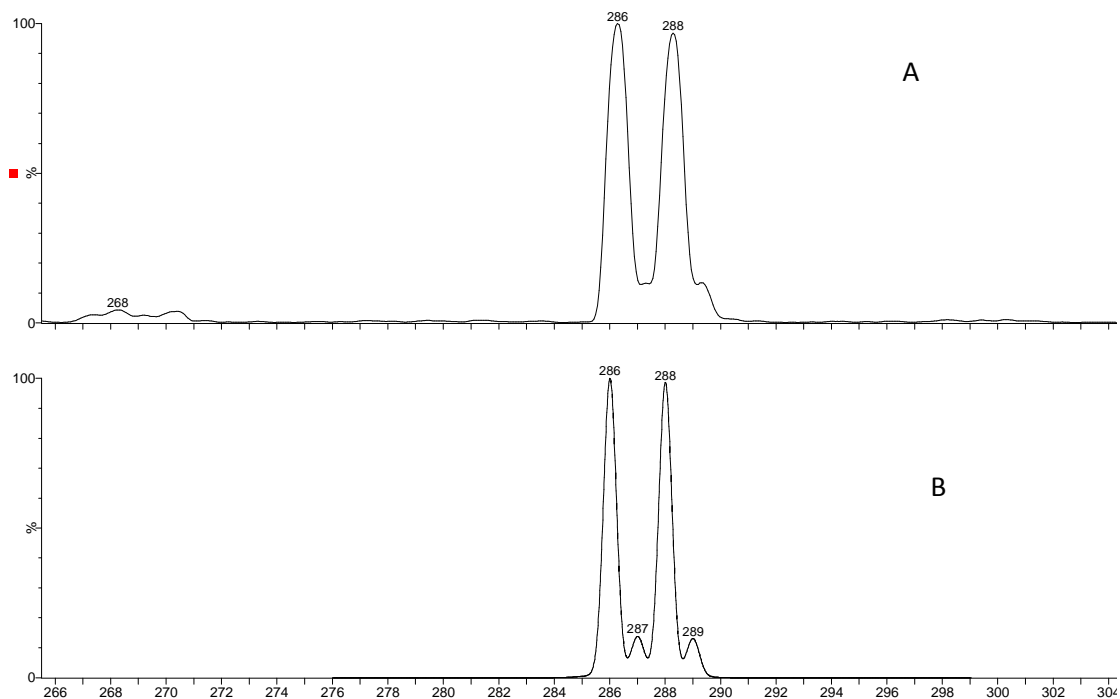


FIGURA 4.50 - Espectro de massas obtido para o produto do fungo (A) e espectro gerado no software do equipamento para a fórmula molecular  $C_{11}H_{11}NO_3Br$  (B).

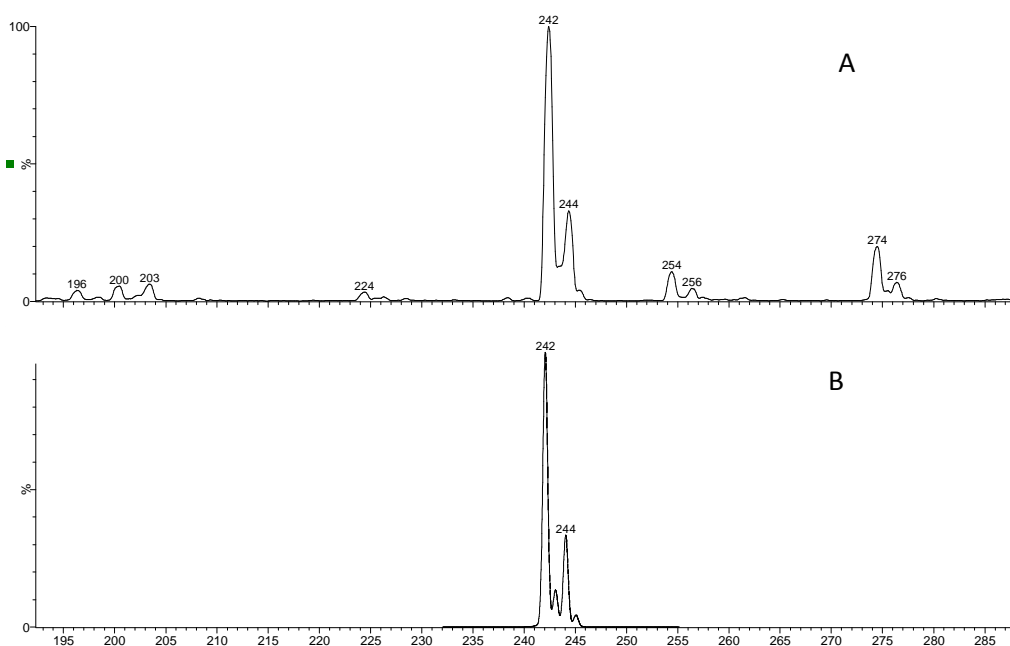


FIGURA 4.51 - Espectro de massas do produto N-acetilado produzido (A) e espectro gerado no software do equipamento para  $C_{11}H_{11}NO_3Cl$  (B).

Quando se compara o espectro de massas gerado pelo equipamento que apresenta o modelo isotópico sugerido pelo software (Figura 4.51B) com o

espectro de massas do produto de biotransformação produzido pelo fungo a partir do aminoácido halogenado (Figura 4.51A), observa-se que o composto produzido apresenta o modelo isotópico sugerido pelo software do equipamento, indicando a *N*-acetilação do aminoácido bromado adicionado ao meio de cultura do fungo, o mesmo resultado é visualizado nas análises do 4-cloro-fenilalanina-*N*-acetilado.

Em seguida, aplicaram-se metodologias de análise para posterior purificação em escala preparativa dos produtos de biotransformação de interesse. Dessa forma, foram desenvolvidos sistemas de separação utilizando-se uma coluna Synergi com eluição isocrática de MeOH e água e detecção por UV (211 nm) para as análises das frações referentes ao cultivo do fungo *P. brasilianum* em meio líquido suplementado com 4-bromo-fenilalanina e 4-cloro-fenilalanina. Os sistemas foram desenvolvidos visando-se a melhor resolução cromatográfica das misturas, no menor tempo de análise em um sistema com reprodutibilidade.

Os cromatogramas obtidos a partir das análises em HPLC preparativo para as os extratos são mostrados nas figuras 4.52 e 4.53 abaixo.

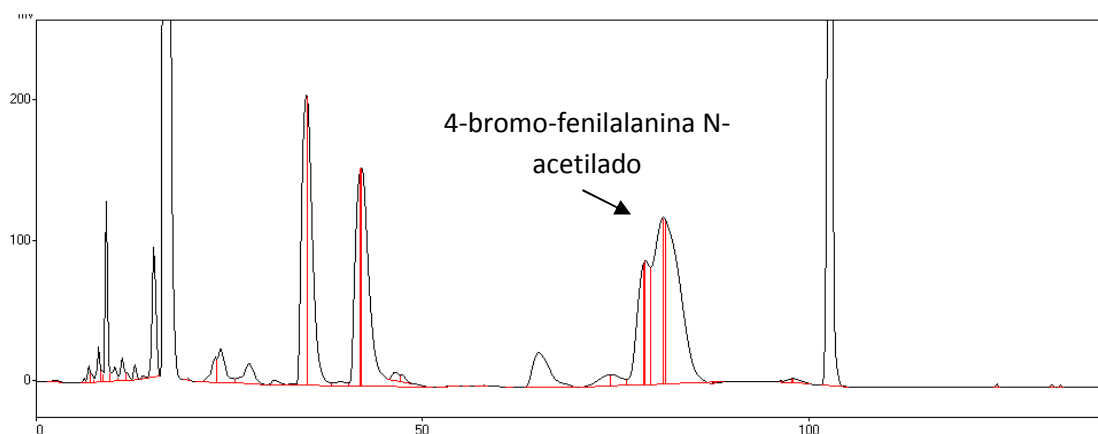


FIGURA 4.52 - Cromatograma obtido para as análises em HPLC preparativo referente ao cultivo do fungo *P. brasilianum* com a adição de 4-bromo-fenilalanina.

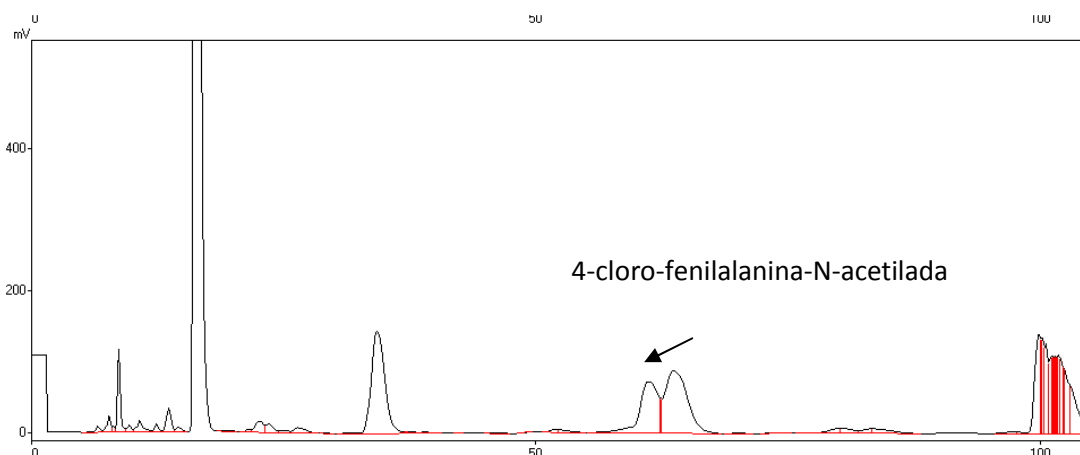


FIGURA 4.53 - Cromatograma obtido para as análises em HPLC preparativo referente ao cultivo do fungo *P. brasilianum* com a adição de 4-cloro-fenilalanina.

Visualizam-se nos cromatogramas dos extratos o isolamento dos metabólitos de interesse, conforme assinalado nos cromatogramas apresentados (Figura 4.52 e 4.53). A caracterização estrutural destas moléculas é descrita a seguir, a partir dos experimentos de RMN 1D e 2D apresentados abaixo.

Depois de purificada em HPLC preparativo, como visualizado acima, a substância 4-bromo-fenilalanina-*N*-acetilada produzida pelo fungo, foi submetida às análises por RMN 1D e 2D para caracterização e confirmação das propostas baseadas em espectrometria de massas. Na tabela 4.11, visualiza-se a atribuição dos sinais dos espectros de RMN.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  visualizam-se sinais em  $\delta$  7,12 e  $\delta$  7,41 (dubletos) referentes aos H-5 e H-9 e H-6 e H-8 respectivamente, com constantes de acoplamento de 8,4 características de acoplamento orto entre os hidrogênios aromáticos e, portanto, a substituição do anel aromático é simétrica e, o anel é para substituído. Os valores de integrais também são característicos de substituição para.

O sinal em  $\delta$  4,47 é referente ao H-2 que apresentou valor de integral igual a um, coerente então com a atribuição realizada. Este hidrogênio acopla com os dois hidrogênios H-3a e H-3b,  $\delta$  3,15 e  $\delta$  3,11 respectivamente,

que são hidrogênios diastereotópicos, uma vez que são vizinhos ao centro assimétrico em 2.

Finalmente, a atribuição do sinal referente ao H-11 não foi trivial e foi realizada com base em algumas discussões descritas na literatura. A substância brasiliamida B apresenta, como indicado na figura 4.54 abaixo, quatro confôrmeros rotacionais devido à rápida isomerização da ligação C-N (FUJITA et al., 2002). Os pesquisadores atribuíram este fato as medidas de NOE diferencial, onde visualizaram que os valores de deslocamento químico para os prótons do anel apresentavam mudanças de acordo com a direção do grupo carbonila na acetamida indicada.

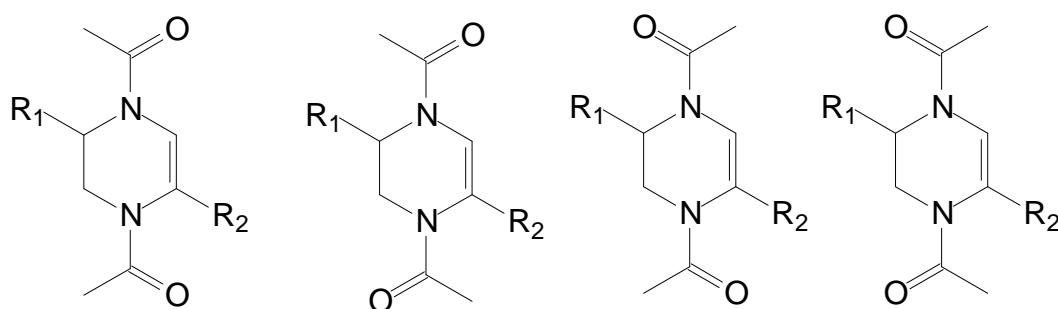


FIGURA 4.54 - Confôrmeros rotacionais da brasiliamida B.

Neste sentido, foi visualizado que o composto, produto da *N*-acetilação do aminoácido 4-bromo-fenilalanina, pode apresentar dois confôrmeros rotacionais em CDCl<sub>3</sub> devido à rotação da ligação C-N, conforme visualizado na figura 4.55 abaixo.

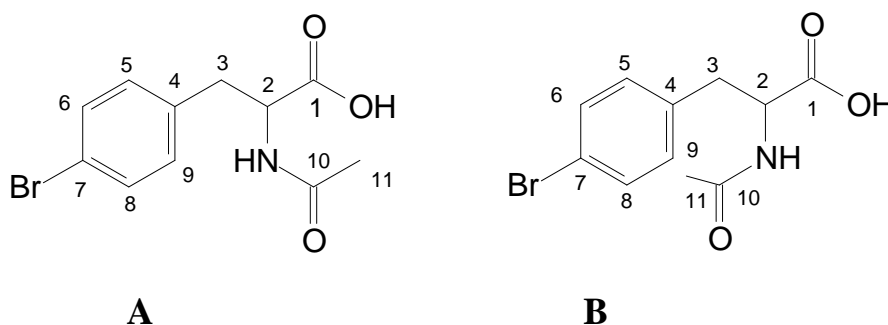


FIGURA 4.55 - Rotâmeros encontrados em solução para a substância 4-bromo-fenilalanina *N*-acetilada.



Foram visualizados, dessa maneira, sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  dos dois corfômeros rotacionais em temperatura ambiente para a substância 4-bromo-fenilalanina *N*-acetilada. O primeiro sinal em  $\delta$  1,99 referente aos H-11 do rotâmero A, enquanto o sinal em  $\delta$  1,23 é referente ao H-11 no rotâmero B, uma vez que os hidrogênios estão blindados devido ao plano nodal do anel aromático. Com a diminuição da temperatura, a rotação tende a ser menor e os espectros poderiam ser obtidos com melhor resolução.

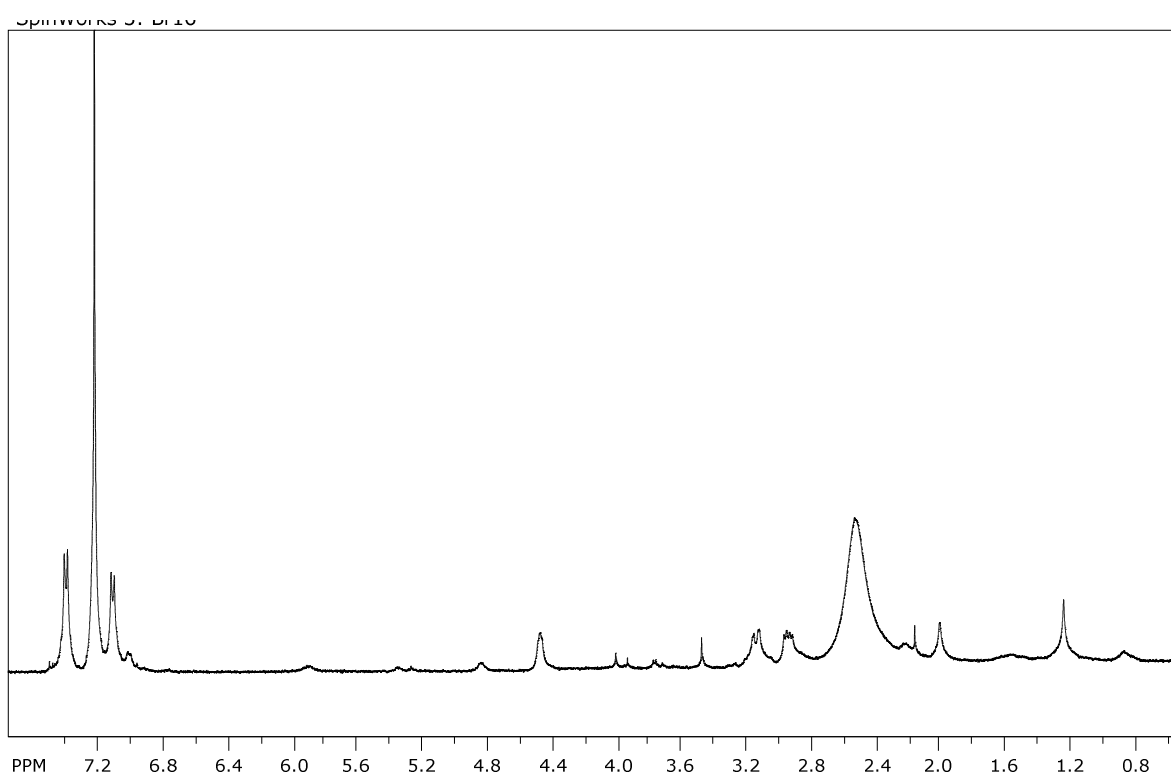


FIGURA 4.56 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do produto 4-bromo-fenilalanina-*N*-acetilado ( $\text{CDCl}_3$ -400 MHz).

TABELA 4.11 - Atribuição dos sinais de RMN  $^1\text{H}$  a molécula 4-bromo-fenilalanina *N*-acetilada, *J* (Hz).

Posição	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	HMBC
1	-	158,3	-
2	4,47 dd	70,5	-
3	A: 3,15 dd B: 3,11 dd	39,4	-
4	-	121,2	H-5; H-9
5	7,11 d (8,4)	131,2	H-6
6	7,41 d (8,4)	131,6	H-5
7	-	134,6	H-6; H-8
8	7,41 d (8,4)	131,6	H-9
9	7,11 d (8,4)	131,2	H-8
10	-	150,2	-----
11 A	1,99 s	23,1	-----
11 B	1,23 s	29,6	-----

A molécula de 4-cloro-fenilalanina-*N*-acetilada também foi analisada via RMN  $^1\text{H}$ , mas não foram realizados experimentos de 2D. Entretanto, com os dados de RMN  $^1\text{H}$ , e os dados obtidos anteriormente para a molécula de 4-bromo-fenilalanina-*N*-acetilada, a proposta anterior baseada nos dados de espectrometria de massas foi confirmada e os dados da atribuição dos sinais podem ser visualizados na tabela 4.12. Na molécula descrita abaixo, assim como na molécula de 4-bromo-fenilalanina-*N*-acetilada, visualiza-se a presença de dois confôrmeros rotacionais (Figura 4.57), como descrito anteriormente.

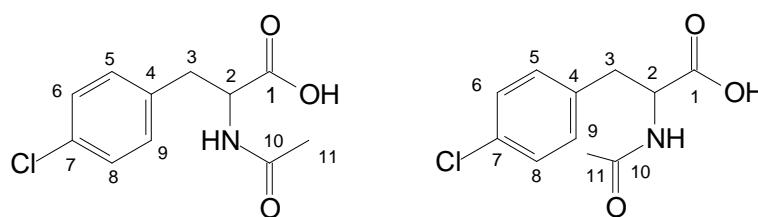


FIGURA 4.57 - Confôrmeros rotacionais para a molécula de 4-cloro-fenilalanina-*N*-acetilada.

TABELA 4.12 - Atribuições dos sinais de RMN  $^1\text{H}$  para a molécula apresentada  $J$  (Hz).

Posição	$^1\text{H}$
1	-
2	4,61 dd
3	A: 3,33 dd B: 3,09 dd
4	-
5	7,23 d (8,4)
6	7,52 d (8,4)
7	-
8	7,52 d (8,4)
9	7,23 d (8,4)
10	-
11 A	2,14 s
11 B	1,38 s

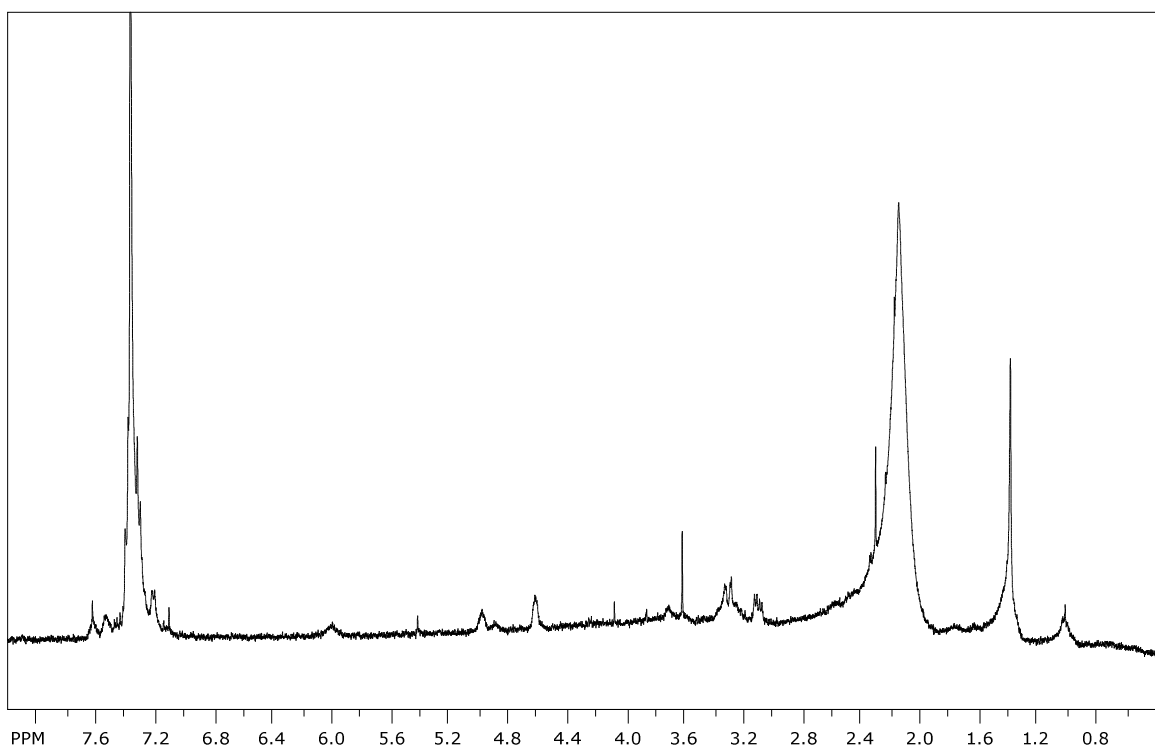


FIGURA 4.58 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do produto 4-cloro-fenilalanina-*N*-acetilado ( $\text{CDCl}_3$  400 MHz).

No intuito de verificar outras possíveis modificações no substrato adicionado e a verificação da produção de possíveis metabólitos secundários halogenados, o fungo *P. brasilianum* foi cultivado em meio líquido Czapeck suplementado com os aminoácidos halogenados estudados sob agitação de 120 rpm. Os extratos gerados foram analisados nas mesmas condições cromatográficas e nas mesmas condições de ionização e verificou-se a produção do mesmo produto *N*-acetilado e, portanto, neste caso, o fungo foi apto a *N*-acetilação no substrato.

Finalmente, no intuito de investigar a produção de metabólitos fluorados produzidos pelo micro-organismo, o fungo *P. brasilianum* foi cultivado em meio líquido Czapeck suplementado com 15mg de 4-fluor-fenilalanina.

O comportamento do micro-organismo difere com relação aos outros aminoácidos halogenados adicionados, principalmente com relação ao crescimento e morfologia do fungo. Na figura 4.59 abaixo, observa-se tal comportamento. Nota-se que o micro-organismo tem seu crescimento inibido pela adição de 4-fluor-fenilalanina no meio de cultivo.

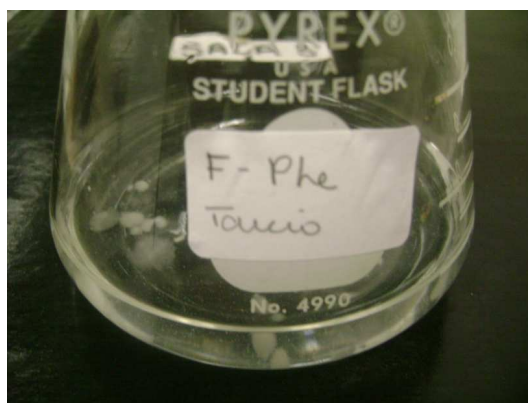


FIGURA 4.59 - Cultivo do fungo *P. brasilianum* em meio líquido suplementado com 4-fluor-fenilalanina.

Em seguida, os extratos de menor massa obtidos (crescimento inibido pelo aminoácido fluorado) foram analisados via HPLC/UV-MS, de acordo com as condições descritas anteriormente no item 3.4.20.

O cromatograma referente ao cultivo do fungo em meio líquido com a adição de 4-fluor-fenilalanina pode ser visualizado na figura 4.60 abaixo.

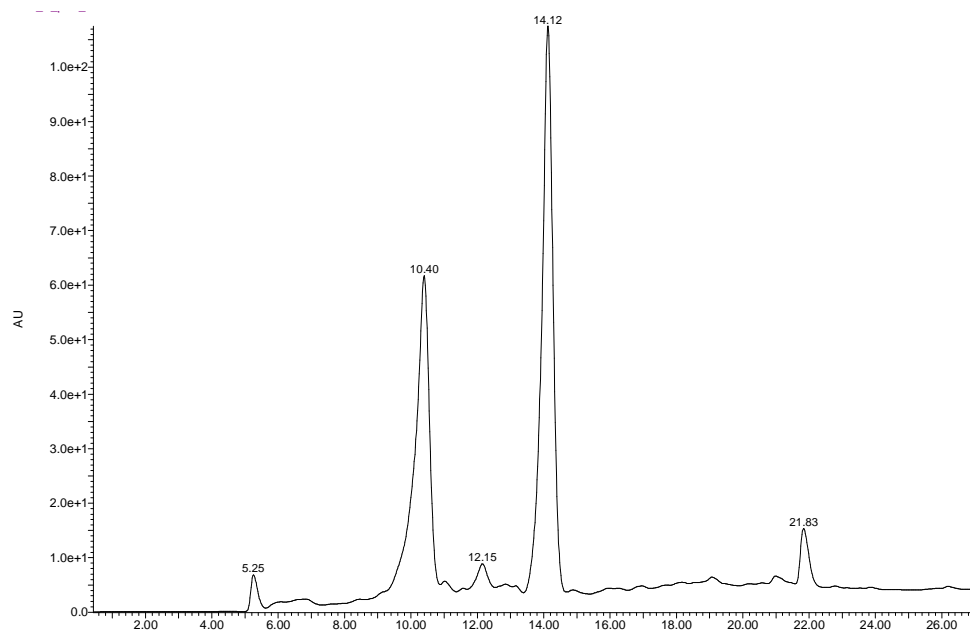


FIGURA 4.60 - Cromatograma obtido para o extrato referente ao cultivo do fungo com a adição de 4-fluor-fenilalanina.

O espectro de massas (*full scan*) processado a partir da banda cromatográfica que aparece no TIC em 14 minutos apresenta uma relação  $m/z$  226 que não é verificada nos espectros referentes ao controle, indicando, possivelmente que o fungo possa ter *N*-acetilado o padrão adicionado (MM 183), uma vez que foi verificada uma relação  $m/z$  226 que representa 42 unidades de massa deslocadas do padrão adicionado.

Em seguida, foram realizados experimentos de íons produtos do íon com relação  $m/z$  226, o espectro pode ser visualizado na figura 4.61 abaixo. Verifica-se perfil de fragmentação semelhante aos encontrados para os produtos 4-bromo-fenilalanina *N*-acetilado e 4-cloro-fenilalanina *N*-acetilado, indicando que o aminoácido fluorado adicionado foi *N*-acetilado.

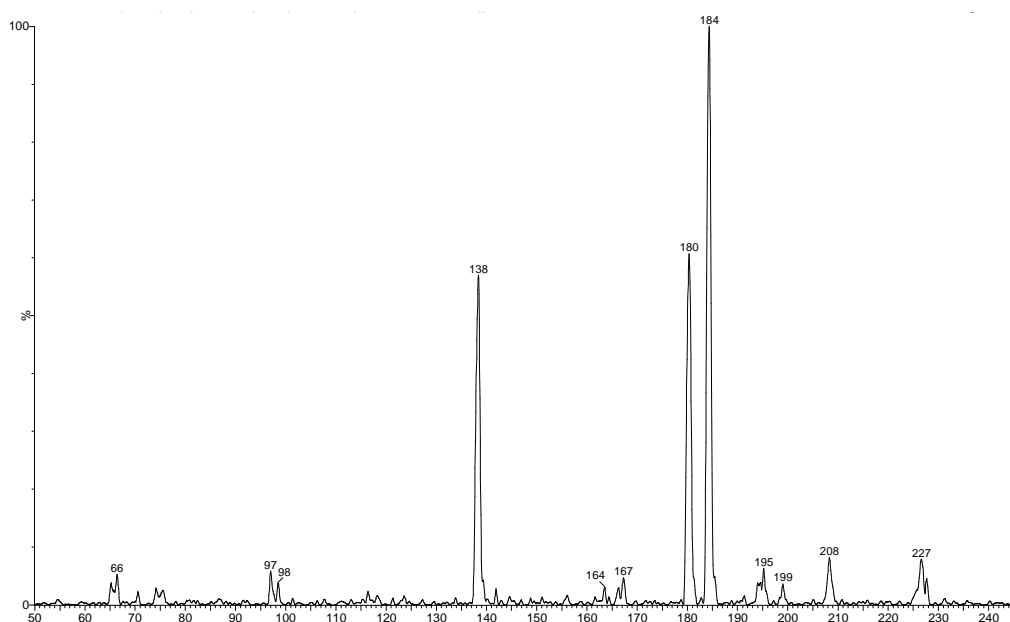


FIGURA 4.61 - Espectro de íons produtos para a substância 4-fluor-fenilalanina-*N*-acetilada.

Uma vez que o fungo teve seu desenvolvimento inibido na presença do aminoácido halogenado adicionado no meio de cultivo, não foi possível a purificação do produto *N*-acetilado devido à baixa massa dos extratos.

Os experimentos *in vivo* com a adição de potenciais substratos para a enzima PAL ao meio de cultivo do fungo *P. brasilianum* indicaram a *N*-acetilação dos substratos testados a qual parece ser um importante passo biossintético na rota de formação das brasiliamidas, uma vez que todas as estruturas de brasiliamidas isoladas são *N*-acetiladas (Figura 4.62), entretanto em nenhum experimento detectou-se a formação de brasiliamidas com estruturas modificadas e halogenadas.

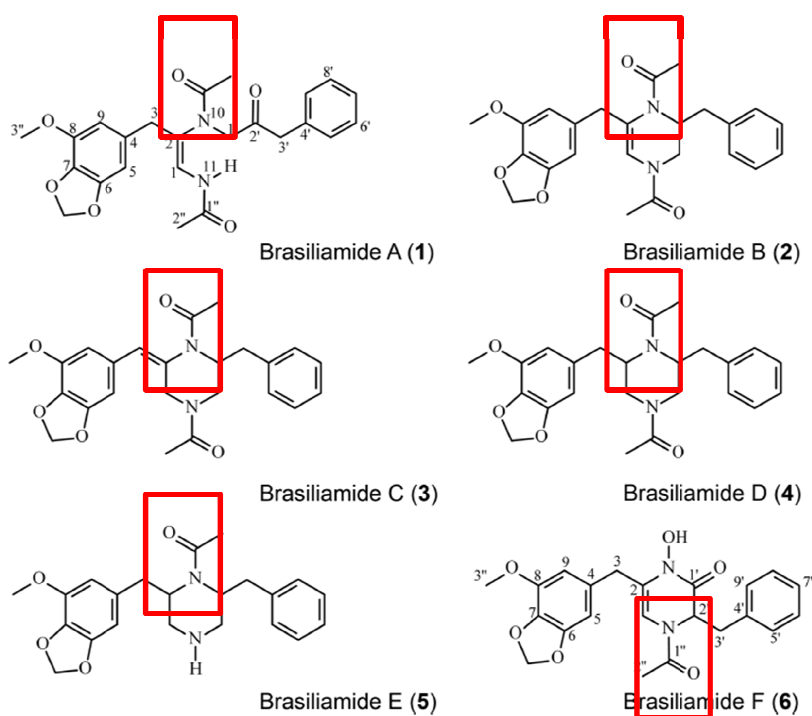


FIGURA 4.62 - Estruturas moleculares das brasiliamidas A-F. Em vermelho as *N*-acetilações apresentadas pelas moléculas.

Derivados de aminoácidos enantiomericamente puros são de grande interesse devido à versatilidade como blocos construtores para a descoberta de novas drogas nas mais diversas áreas terapêuticas. Na literatura, é descrito que fenilalanina-metoxi-substituídas são elementos chave em uma classe de inibidores proteasômicos para uma nova abordagem para tratamentos de câncer. Derivados de aminoácidos apresentam diversas outras aplicações como blocos construtores de inibidores de proteases, são muitas vezes utilizados como aditivos em alimentos, agroquímicos, detergentes, agentes quelantes (BELLER et al., 2008) e aplicações em abordagens combinatoriais para a descoberta de novos potenciais fármacos. Ainda, os derivados de aminoácidos são muito importantes em química orgânica sintética como materiais de partida e auxiliares quirais, não-racêmicos. Uma grande vantagem da produção de derivados de aminoácidos por micro-organismos é que os produtos de biotransformação apresentam elevada enantiosseletividade.

Dessa maneira, o fungo *P. brasilianum* se mostrou um possível produtor de fenilpropanóides e de enzimas envolvidas na produção destes compostos, uma maneira de provar o envolvimento da enzima PAL na rota biossintética das brasiliamidas seria o estudo de inibidores desta enzima que posteriormente adicionados ao cultivo, poderiam alterar a produção destes metabólitos secundários. Com este objetivo, buscamos possíveis inibidores da enzima Fenilalanina amônia-liase produzida pelo fungo *P. brasilianum* através da adição de diferentes compostos ao extrato enzimático obtido a partir das células do micro-organismo. Os compostos testados como inibidores enzimáticos nesta etapa do projeto estão descritos na literatura e apresentam alguma porcentagem de inibição para a enzima PAL obtida a partir de diferentes fontes enzimáticas (<http://www.brenda-enzymes.info/>). Em seguida, foram realizados ensaios de atividade quantitativos para determinar a porcentagem de inibição de cada um dos compostos adicionados ao extrato enzimático.

A partir da comparação das áreas geradas para o produto da reação, ácido cinâmico, tanto no controle (sem a adição de inibidores) quanto nos experimentos de inibição, pode-se determinar a porcentagem de inibição de cada um dos compostos testados. A tabela 4.13 abaixo apresenta as áreas encontradas, assim como a porcentagem de inibição dos compostos testados.

TABELA 4.13 - Porcentagem de inibição encontrada para cada um dos compostos testados

<b>Inibidor testado</b>	<b>Área do ácido cinâmico</b>	<b>Inibição da enzima PAL (%)</b>
Controle	13509795	-
MgCl <sub>2</sub>	13579094	0%
KCl	13159843	0%
FeCl <sub>3</sub>	10307399	23,7%
CaCl <sub>2</sub>	11859926	12,3%
<b>CuCl<sub>2</sub></b>	<b>21592</b>	<b>99,9%</b>
CoCl <sub>2</sub>	4400240	67,4%



Verifica-se que os sais inorgânicos  $\text{CuCl}_2$  e  $\text{CoCl}_2$  apresentaram as maiores inibições da enzima PAL produzida por *P. brasilianum*. Estas informações são importantes para entender o comportamento da enzima estudada, principalmente, devido às diferentes aplicações comerciais apresentadas pela enzima. As enzimas catalisam virtualmente todos os processos que acontecem nas células e não deve ser surpreendente que os inibidores enzimáticos estão entre os mais importantes agentes farmacêuticos conhecidos. O estudo de inibidores enzimáticos também fornece valiosa informação a respeito dos mecanismos enzimáticos e tem ajudado a definir algumas vias metabólicas. A enzima PAL por estar extensamente presente em plantas e ausente em animais, apresenta-se um alvo promissor para o desenvolvimento de herbicidas e alguns inibidores de crescimento vegetal já vêm sendo desenvolvidos (RITTER & SCHULZ, 2004). A busca por inibidores da enzima PAL poderiam contribuir para a busca de herbicidas comerciais.

Com o conhecimento de que o composto  $\text{CuCl}_2$  inibe a enzima PAL expressa por *P. brasilianum*, estudos metabólicos foram realizados através da adição deste sal inorgânico ao meio de cultivo de *P. brasilianum*, no intuito de estudar *in vivo* o comportamento deste sal frente a rota biossintética das brasiliamidas e possível inibição da biossíntese destes metabólitos.

As análises por LC-MS dos extratos referentes ao cultivo de *P. brasilianum* em meio Czapeck suplementado com  $\text{CuCl}_2$  foram qualitativamente comparadas as análises do cultivo controle (*P. brasilianum* cultivado em Czapeck) e são observadas na figura 4.63. Verifica-se que nos experimentos controle, a substância brasiliamida A ( $m/z$  439) foi produzida com sucesso, conforme esperado, entretanto, o sal inorgânico  $\text{CuCl}_2$  adicionado no cultivo levou a completa abolição da produção deste metabólito secundário, como indicado em vermelho. A inibição da produção de brasiliamidas poderia indicar a formação destes metabólitos via a enzima PAL, no entanto, os experimentos apesar de indicativos não são comprobatórios, principalmente pelo fato dos ions

$\text{Cu}^{2+}$  terem inibido a biossíntese de outros metabólitos secundários do micro-organismo. Além de relatos confirmarem a atividade antifúngica e tóxica deste íon. Dessa maneira futuros experimentos envolvendo deleção gênica são essenciais.

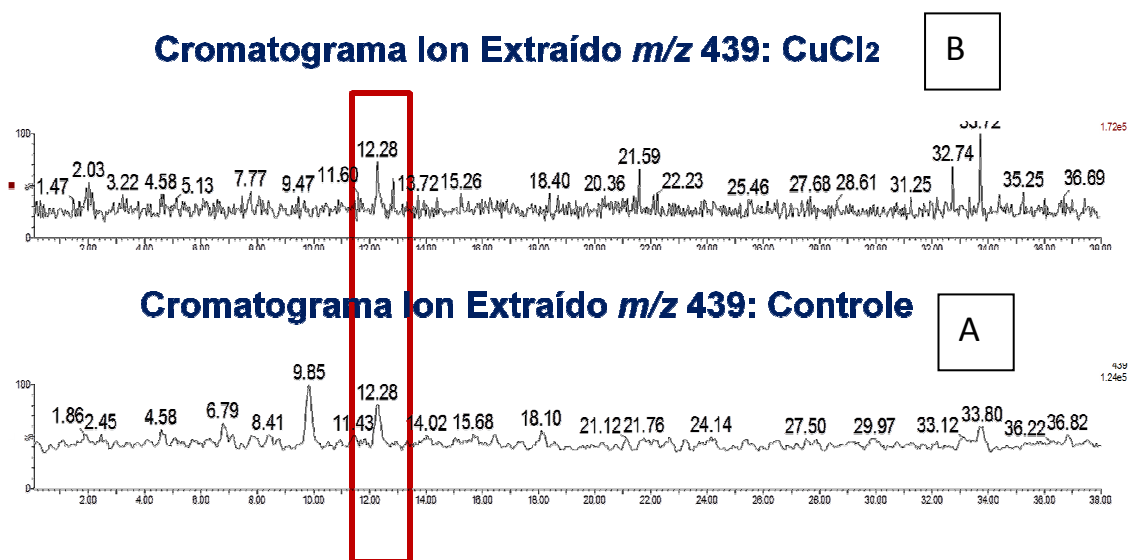


FIGURA 4.63 - Cromatograma de íons extraídos de  $m/z$  439 obtido a partir das análises do controle (A) e do fungo cultivado na presença de  $\text{CuCl}_2$  (B).

### 4.3 Obtenção do enzima PAL recombinante

Nos estudos anteriores, a atividade da enzima PAL, primeira enzima da rota biossintética dos fenilpropanóides foi avaliada através de ensaios enzimáticos com o extrato proteico bruto gerado a partir das células do micro-organismo, onde se visualizou a formação do intermediário biossintético, ácido cinâmico a partir do aminoácido Phe através de monitoramento por HPLC/UV-MS. As condições da produção da enzima PAL em *P. brasilianum* foram otimizadas (meio de cultivo e indução da produção de PAL ao adicionar Phe no cultivo), assim como as condições de incubação da reação enzimática, como a temperatura, pH e tempo de incubação. A especificidade da enzima PAL nativa também pode ser estudada, verificando-se que a enzima apresentou atividade nos substratos testados, inclusive atuando como TAL (tirosina amônia-liase).

Entretanto, a purificação da enzima PAL nativa não foi obtida com êxito e os passos posteriores pareceram indicar que a concentração da enzima nativa não seria suficiente para futuros estudos de caracterização cinéticos. Desta maneira, verificou-se a possibilidade de obter a enzima PAL recombinante, o que seria de grande interesse, no intuito de gerar maior conhecimento com relação à atuação desta enzima no metabolismo do fungo *P. brasilianum*.

Neste sentido, seria de grande interesse estudos iniciais das enzimas envolvidas na biossíntese das brasiliamidas (PAL, CAH e OMT) no fungo *P. brasilianum*, visando um maior entendimento da associação a nível genético entre fungo e seu hospedeiro. Devido às interessantes aplicações comerciais da enzima PAL também seria de grande interesse o estudo visando um sistema de expressão heterólogo para o gene que codifica a enzima PAL, no intuito de obter a enzima recombinante expressa em grandes concentrações.

O estudo visando a prospecção de genes inicia com a construção de uma ou mais bibliotecas de cDNA (coleção de fragmentos de cDNA, que caracterizam-se por ser moléculas de DNA complementares a um mRNA e representam as sequencias expressas em um organismo sob influência de uma determinada condição do ambiente, em um determinado momento). A geração de uma biblioteca de cDNA inclui, primeiramente, a extração de mRNA do organismo de interesse, a síntese de cDNA a partir do mRNA, seguida da clonagem das moléculas de cDNA em um vetor de clonagem e a incorporação do vetor em uma bactéria para a sua multiplicação (transformação bacteriana). Uma vez a biblioteca construída, o próximo passo seria a busca de sequencias por homologia dos genes de interesse, nos bancos de dados públicos. Em seguida, através da informação obtida pode-se desenhar *primers* degenerados para triagem das bibliotecas de cDNA, analisadas para a localização de um ou mais genes de interesse, utilizando estratégias de amplificação por PCR (MALONE et al., 2006). O crescente avanço da bioinformática, aliado à

capacidade computacional e velocidade de acesso a Internet, facilitam muito a busca de genes de interesse.

Visando estudos de clonagem e expressão da enzima PAL, uma parceria foi estabelecida com o Prof. Dr. Peter Leadlay da Universidade de Cambridge, Inglaterra, especialista em pesquisa de biossíntese de produtos naturais e biossíntese combinatória. A idéia inicial para a obtenção do gene que codificasse a enzima PAL para posterior clonagem e expressão em organismos heterólogos era a construção da biblioteca de cDNA. Com esta idéia em mente, o primeiro passo foi obter um *probe*, ou seja, parte do gene que codifica a enzima PAL que nos guiasse dentro da biblioteca, uma vez que estivesse construída e facilitasse a busca do gene desejado por hibridização ao *probe* obtido. Neste sentido, foram realizados inúmeros alinhamentos (programa *Clustal-X*) da sequência de proteínas fenilalanina amônia-liase putativas em organismos similares à *P. brasilianum* (*P. chrysogenum* e *P. marneffeii*) em busca de regiões conservadas na sequência proteica para o desenho de oligonucleotídeos degenerados. O alinhamento utilizado no desenho destes oligonucleotídeos pode ser observado na figura 4.64. Assinaladas em colorido estão às regiões as quais foram utilizadas para a construção dos oligonucleotídeos degenerados, em vermelho e roxo estão as regiões utilizadas para o desenho de oligonucleotídeos sense e em azul claro, azul escuro e verde as regiões conservadas utilizadas na construção dos oligonucleotídeos antisense.

```

gi|210072396|gb|EEA26485.1|      ----MVNQSPQLAKAVELW-KLLQIRKKSGTYTLDGNSLTIADVATSLY 45
gi|212533751|ref|XP_002147032.  ----MVNQSPQLAKAVELW-KLLQIRKKSGTYTLDGNSLTIADVATSLY 45
gi|211585349|emb|CAP93037.1|    MTLKRHSQSAHMNATLQLLGRVRLKNNKRSIVLNGNDLDIASTVAVARH 50
                                     **.:.:. .:.* : : : :. : : .:.* * * : :

gi|210072396|gb|EEA26485.1|      GCKPLLSQDPKINKDIQDSINVLFDHLAQGWYVYGVNTGFGGSADSRTEQ 95
gi|212533751|ref|XP_002147032.  GCKPLLSQDPKINKDIQDSINVLFDHLAQGWYVYGVNTGFGGSADSRTEQ 95
gi|211585349|emb|CAP93037.1|    GVEPTISTDECLAKRLEISVDTLADVISRKCVIYGVNTGFGGSADTRTNE 100
                                     * : * * * * : * : : : . * * : : : ***** : : : :

gi|210072396|gb|EEA26485.1|      VTMLQASLMQHTQSGIISKAGNG-----GTPDHVMPRAWVRAAMVIRCN 139
gi|212533751|ref|XP_002147032.  VTMLQASLMQHTQSGIISKAGNG-----GTPDHVMPRAWVRAAMVIRCN 139
gi|211585349|emb|CAP93037.1|    LIDLQTHLLQFIQSGIITADKDPASNSEREPESHVMPLAWRAAIVARTN 150
                                     : * : * : * * : * : : * * : * : * * * * * * * * * *

gi|210072396|gb|EEA26485.1|      STMRGHSAVSFVVVKAMAEFLGHDLTPIVPLRGSVSAASGDLMPLSYVAGG 189
gi|212533751|ref|XP_002147032.  STMRGHSAVSFVVVKAMAEFLGHDLTPIVPLRGSVSAASGDLMPLSYVAGG 189
gi|211585349|emb|CAP93037.1|    QNLRGHSALRKKVLSLIDLLHNDITPLIPLRGTISASGDLMPMAYIAGA 200
                                     . : * * * * : * : * : : * : * * * : * * * * : * * * *

gi|210072396|gb|EEA26485.1|      LEGNPDILIQN---KEGTVLSAPEALKEAGLEPVILGPKEGLGLINGTSS 236
gi|212533751|ref|XP_002147032.  LEGNPDILIQN---KEGTVLSAPEALKEAGLEPVILGPKEGLGLINGTSS 236
gi|211585349|emb|CAP93037.1|    IMGNDPVFVQVKGGAQAIVMPSEALKMSGLSPSGLGPKEGLGLINGTAP 250
                                     : * * * : * * : . * : . : * * * : * * * * * * * * : .

gi|210072396|gb|EEA26485.1|      SAGVGALVLNANHMLAFLTQLLTGSAVEALCGSSESFPFFIAETRPHPGQ 286
gi|212533751|ref|XP_002147032.  SAGVGALVLNANHMLAFLTQLLTGSAVEALCGSSESFPFFIAETRPHPGQ 286
gi|211585349|emb|CAP93037.1|    SAALASLALYNTQQLALLSQMLTAFASECLAGNVWAHPFVHATRPHAGQ 300
                                     * : . : * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|210072396|gb|EEA26485.1|      IECARNVYSFLRGSHLARDVLAPKNRRREDLVQDRYSLSAPQWIGPQLE 336
gi|212533751|ref|XP_002147032.  IECARNVYSFLRGSHLARDVLAPKNRRREDLVQDRYSLSAPQWIGPQLE 336
gi|211585349|emb|CAP93037.1|    IEVANSIRRFKLGSKFVVG-LESQEAASGDLQDRYSTRTAPQWIGPYIE 349
                                     ** * * : * * * * : . * : : : . * * * * * * * * * * *

gi|210072396|gb|EEA26485.1|      DLMLADQQLNIEINSSCDNPLIDS-----ASNDIYYGANFQAASVTSAM 380
gi|212533751|ref|XP_002147032.  DLMLADQQLNIEINSSCDNPLIDS-----ASNDIYYGANFQAASVTSAM 380
gi|211585349|emb|CAP93037.1|    DLLLAQHQLVEVLNSTSDNPLVDTSKQEDGSSGKVVYSGGNFQAASVTSAM 399
                                     * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|210072396|gb|EEA26485.1|      EKIRLVLQMFQKILFSQSFEMIDPNLSGGLPANLAADDP SLSFMMKGV DV 430
gi|212533751|ref|XP_002147032.  EKIRLVLQMFQKILFSQSFEMIDPNLSGGLPANLAADDP SLSFMMKGV DV 430
gi|211585349|emb|CAP93037.1|    DKARLAIQMIQMLWVSVTEMINPATNNGLEANLNAT-AQENFTMKGIDI 448
                                     : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|210072396|gb|EEA26485.1|      NMAAYMAELAYLANPMSHVQAAEMHNQSVNSMALASARMSADAVDVLMK 480
gi|212533751|ref|XP_002147032.  NMAAYMAELAYLANPMSHVQAAEMHNQSVNSMALASARMSADAVDVLMK 480
gi|211585349|emb|CAP93037.1|    NMSAYMSELAALVHPVAHVMSAEMHNQGINSLALISARRTMEADLLAH 498
                                     * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi|210072396|gb|EEA26485.1|      MCACHIVVQCQALDLRALHLGFYIKKVTMIGDLTQK--LFS-ELASQDLQ 527
gi|212533751|ref|XP_002147032.  MCACHIVVQCQALDLRALHLGFYIKKVTMIGDLTQK--LFS-ELASQDLQ 527
gi|211585349|emb|CAP93037.1|    MSACHIVVQCQVEIRANHLRFLSTLRKMKDFTANGALYGLGLDSDSLE 548
                                     * . * * * * * * . : * * * * * * . : * * * * * * :

gi|210072396|gb|EEA26485.1|      TLQDTLGAHIGPSWSSTGKMDLEARCKSLINAITPILLDHIQGG-----I 572
gi|212533751|ref|XP_002147032.  TLQDTLGAHIGPSWSSTGKMDLEARCKSLINAITPILLDHIQGG-----I 572
gi|211585349|emb|CAP93037.1|    TLCISLLPQSSWYRANSNTWKDRVLSVVDVAVALAVNEFVASHSPDCSV 598
                                     ** * * . : . * * * : . * * * * * * : : : . : :

```

FIGURA 4.64 - Alinhamento das seqüências de proteínas putativas PAL de organismos similares à *P. brasilianum*. As duas primeiras sequencias são homólogas de PAL do fungo *P.marneffeii*, a terceira sequencia é referente a proteína PAL de *P. chrysogenum*.

A partir dos oligonucleotídeos degenerados desenhados, cada um baseado em uma região conservada da sequência proteica, foram realizadas seis diferentes combinações de reações de PCR, conforme visualiza-se na figura 4.65.

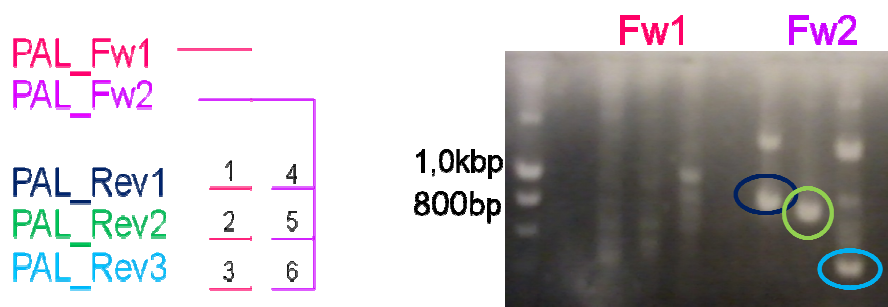


FIGURA 4.65 - Combinações de oligonucleotídeos degenerados utilizados nas reações de PCR, assim como resultados obtidos a partir das reações 4,5 e 6 respectivamente.

Em seguida, com o objetivo de verificar a amplificação dos fragmentos de PCR, efetuou-se um gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e revelado em transiluminador UV. Conforme se observa na figura 4.65 acima, houveram amplificações quando utilizado o oligonucleotídeo PAL\_Fw2 sense, que foi desenhado baseado na região conservada do sítio ativo da enzima com todas as combinações de oligonucleotídeos anti-sense. As amplificações de parte do gene da PAL a partir de DNA genômico utilizado como *template* foram realizadas com sucesso. A Figura 4.66 mostra uma banda em torno de 900 pb; 800 bp e 500 bp respectivamente, que são os tamanhos aproximados dos fragmentos do gene que codifica a PAL nas diferentes reações de PCR realizadas. O maior fragmento (900 bp), ou seja, o produto de PCR com maior informação da enzima PAL foi purificado e sequenciado.

A sequência obtida a partir dos resultados de sequenciamento foi submetida à análises de *blast*, isso significa que foi possível realizar uma comparação da sequência em estudo obtida através de amplificação por PCR com a base de dados do NCBI. O resultado do *blast* indicou uma alta similaridade com a enzima PAL de diferentes organismos, conforme se observa na figura 4.66 abaixo.

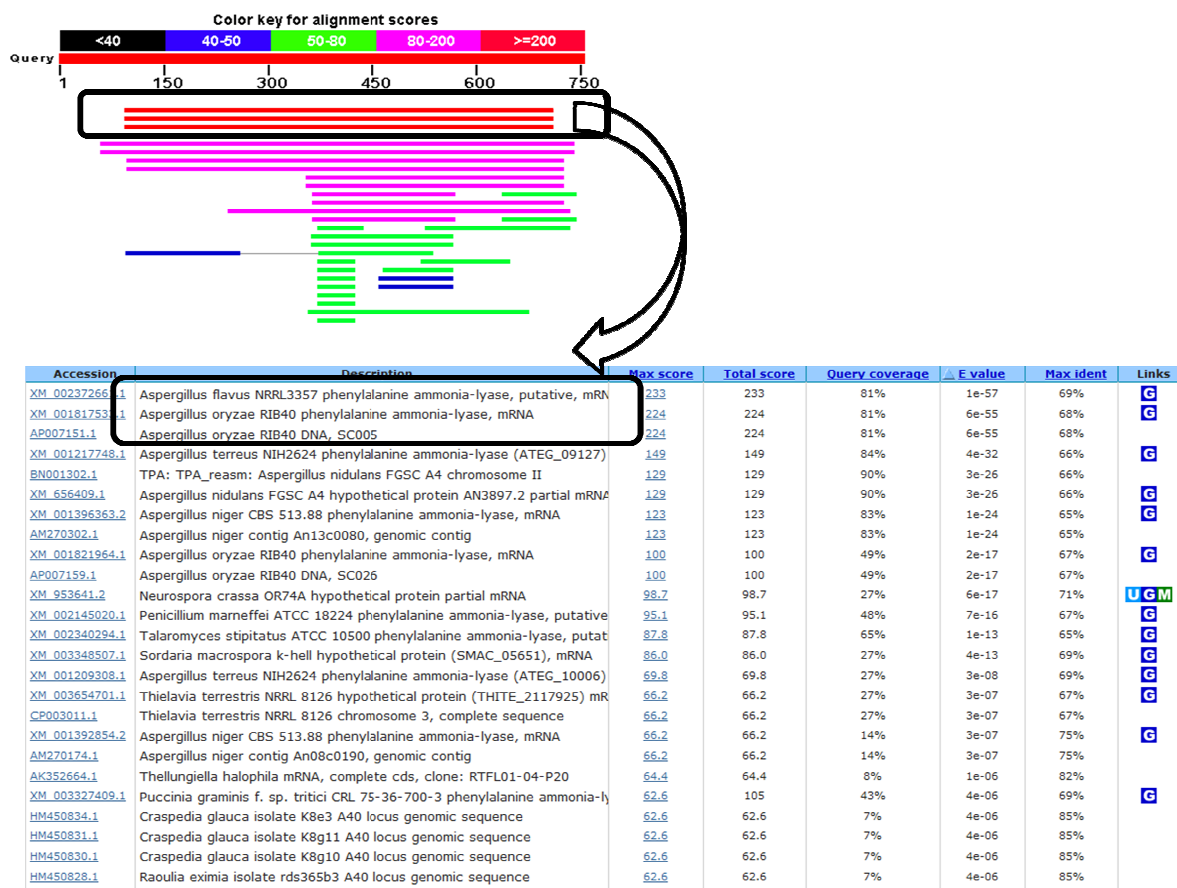


FIGURA 4.66 - Resultado do *blast* do fragmento de PCR obtido no estudo mostrando a amplificação de parte do gene que codifica a PAL.

Baseado nos resultados obtidos pode-se afirmar que o fungo *P. brasilianum* apresenta ao menos um gene que codifique a enzima PAL no seu genoma e foi possível então partir para os próximos passos para obtenção do gene completo para posterior clonagem, expressão e estudos de atividade e cinética enzimática visando um maior entendimento da função da enzima PAL no metabolismo do micro-organismo.

O procedimento para a construção da biblioteca de cDNA demandaria tempo e um investimento alto. Nesta etapa do trabalho avaliou-se então a possibilidade de sequenciamento do genoma completo de *P. brasilianum*, o qual geraria informação a respeito do gene que codifica a PAL conforme o objetivo do estudo e ainda geraria muitas outras informações importantes no estudo deste micro-organismo. O fungo endófito *Penicillium brasilianum* vêm sendo estudado no laboratório LaBioMMi há 16 anos e

representa uma potencial fonte de metabólitos secundários bioativos. Devido ao vasto metabolismo deste organismo e a produção de interessantes metabólitos bioativos, uma parceria foi estabelecida com a facilidade de sequenciamento da Universidade de Cambridge, com o objetivo de sequenciamento do genoma do micro-organismo visando maior entendimento da biossíntese dos metabólitos secundários já identificados, assim como, o estudo de genes biossintéticos e suas funções, regulação destes genes e expressão de enzimas relacionadas. O sequenciamento do genoma do micro-organismo poderia ainda revelar informações a respeito de potenciais clusters biossintéticos de metabólitos secundários silenciados que não são produzidos em condições padrão de fermentação.

Desta maneira, o genoma do fungo *P. brasilianum* foi sequenciado. O processo de *assembly* do genoma foi realizado em parceria com o Dr. Makiyan Samborsky, especialista em bioinformática do grupo de Biossíntese de Policetideos Antibióticos, no Departamento de Bioquímica da Universidade de Cambridge. A partir do *assembly* inicial, determinou-se o tamanho do genoma em aproximadamente 32,690,287bp e o número de *contigs* total em 5263.

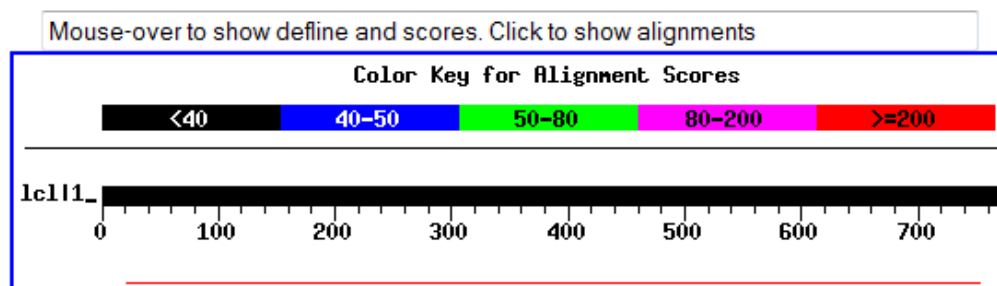
O auxílio do especialista Dr. Makiyan Samborsky nas análises e anotação inicial do genoma nos possibilitou realizar uma busca através de um site de *blast* interno da Universidade que apresentava toda a informação do genoma de *P. brasilianum* recém sequenciado. Isso possibilitou a comparação da parte do gene da PAL obtido anteriormente a partir das ampliações utilizando *primers* degenerados (900 bp) com toda a sequência do genoma de *P. brasilianum*, facilitando a busca do gene de interesse.

O resultado das pesquisas de *blast*, conforme observado na figura 4.67 indicou a presença do gene completo que codifica a enzima PAL, sua localização no *contig*, assim como se pode verificar um único *hit*, indicando a existência de apenas um homólogo do gene que codifica a enzima PAL no



genoma de *P. brasilianum*, diferente de organismos como o fungo *P. marneffeii* que apresenta dois genes que codificam enzimas PAL no seu genoma. A sequência obtida foi traduzida e a sequência de aminoácidos obtida como observada na figura 4.67 abaixo. A partir da sequência de aminoácidos da enzima PAL pode-se prever o tamanho dos monômeros da proteína PAL de *P. brasilianum* em 59 kDa, tamanho relativamente pequeno quando comparado a outras enzimas PALs isoladas de diferentes fungos descritas na literatura.

### Distribution of 1 Blast Hits on the Query Sequence



>VIRT3125

```

MLVRCNSLLRGHSAVRQQVIEYICNFLQNSFTPVVPLRSISASGDLMPLAYIAGALQGN
PDISVHKLNGDIIRADQALKELNLKPLVYGPKEGLGLLNGTAFSCGAASLILFEANQLLL
LSQVLTAMGTEAMLGMICNYHPFIAATRPHEGQVEAAKNI FDFLLDSKLAI PASSGQDGL
AQDRYALRTSSQWIGPQIENMRLALQQVQTELNSTTDNPLINLEDGNIYHGGNFQAVAIT
SAMEKTLSTMQMIKMFVFSQCSELLNPTLSNGLPPNLCMEDP SLSFAFKGIDINMAAYTS
ELGYLNHPISNHVQSAEMHNQALNSLAFIGCRYAGDAVEIILSLMTATYLYVLCQAVDLRA
LHAEFVKVARPMVDELTASACSKEHVHLESTKSVIWEELMQHWLKNSTRDLCDCRATSAN
RSAGVLLDNLPPEGTGISQEGVIRQWKSSVSGVLQRTYETTRNKFLSSSTTKKYLCTSSQK
LYKEVREDLNPAYSEFGLNSPLCQDDYEGKETIGSQISKIY TALREERFRD TLLSCW

```

FIGURA 4.67 - Resultado das análises no site de *blast* interno contendo o genoma de *P. brasilianum* em comparação ao amplicom obtido anteriormente (fragmento do gene PAL). Abaixo, a sequência de aminoácidos da enzima PAL de *P. brasilianum*.

Alinhamentos da sequência de nucleotídeos da proteína PAL de *P. brasilianum* obtida neste estudo em comparação a outras proteínas PAL de organismos similares, indicaram a possibilidade de o gene apresentar introns, ou seja, regiões que não codificam para a síntese da proteína e são removidas no processo de *splicing* em organismos eucariotos. O *splicing* é um processo que remove os íntrons e junta os éxons depois da transcrição do RNA. Portanto, o

RNA mensageiro é o intermediário chave na expressão gênica e atua na tradução do DNA em aminoácidos para a síntese das proteínas. Desta maneira, diante da possibilidade de o gene que codifica a enzima PAL apresentar introns, fez-se necessário iniciar os experimentos a partir do mRNA como *template* para a amplificação do gene que codifica a PAL para os posteriores estudos de clonagem e expressão gênica.

A extração de RNA total foi realizada a partir de massa fúngica congelada a -80 °C com auxílio do kit RNeasy Plant Mini seguindo as especificações do fabricante. Foram realizadas duas extrações de RNA total, partindo-se de uma média de 110-130 mg de micélio do fungo em estudo em cada extração. A quantidade de RNA total foi avaliada a partir de 1 µL de amostra por espectrofotometria, utilizando-se o aparelho NanoDrop ND-1000 (NanoDrop®). Os valores obtidos de A260/A280, A260/A230 bem como as concentrações das amostras de RNA total estão apresentados na Tabela 4.14.

TABELA 4.14 - Valores e médias de A260/A280, A260/A230 e concentrações das amostras de RNAtotal.

	<b>Tubo 1</b>	<b>Tubo 2</b>
<b>A260/280</b>	2.23	2.19
<b>A260/230</b>	2.49	2.43
<b>Concentração (ng.µL<sup>-1</sup>)</b>	902	403

A qualidade do RNA é analisada com base na relação da absorvância A260/A280 e A260/A230. Um RNA pode ser considerado puro, livre de proteínas, se  $A260/A280 \geq 1,8$  (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Também pode ser considerado livre de solventes orgânicos, se  $A260/A230 > 1,5$ . Conforme observado na tabela 4.14 acima, para os RNAs totais extraídos, a média da razão A260/A280 foi de 2,21, indicando alta pureza e qualidade dos

RNAs obtidos. O rendimento de RNA a partir de uma média de 120mg de tecido teve média de 652 ng.µL<sup>-1</sup>. Os valores obtidos das razões A260/A280 e A260/A230 indicam que os RNAs totais extraídos podem ser considerados puros, encontrando-se livres de proteínas, e que o método de extração utilizando-se o kit RNeasy Plant Mini foi eficiente para o isolamento dos RNAs e para a manutenção da integridade dos mesmos.

A confirmação da integridade e da qualidade das amostras foi feita por fluorimetria em um equipamento Agilent 2100 Bioanalyser, e pôde-se verificar a qualidade do RNA no eletroferograma apresentado na figura 4.68 abaixo. As extrações de RNA total resultaram em produtos íntegros, onde podem ser observadas as bandas correspondentes às frações de RNA ribossômico 28S e 18S indicando que os RNAs são de qualidade e não estão degradados.

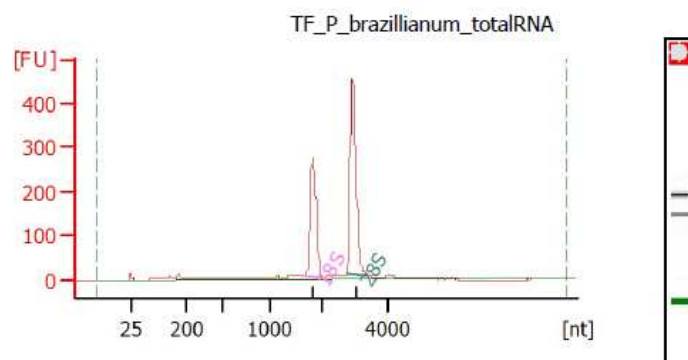


FIGURA 4.68 - Eletroferograma do RNA total extraído de *P. brasilianum*.

O padrão de eletroforese sugere não haver excesso de sal ou proteína. O cuidado na aquisição das amostras, a purificação correta, bem como uma boa qualidade do RNA são considerados muito importantes na continuação do trabalho, já que muitos dos problemas que podem afetar o experimento podem começar nestas etapas.

O próximo passo do estudo foi então a transcrição reversa associada à reação de PCR, RT-PCR. Esta técnica se baseia na síntese de cDNA sobre um

molde de mRNA realizada pela enzima transcriptase reversa, seguida de amplificação por meio de PCR. Na reação de RT-PCR, RNA molde é duplicado com a geração de uma fita de DNA complementar (cDNA). A sequência de cDNA de interesse é então amplificada exponencialmente usando PCR.

A construção do cDNA que codifica a enzima PAL foi realizada com auxílio do kit cDNA synthesis da Roche seguindo as instruções do fabricante. Uma vez obtido o cDNA, este foi amplificado usando PCR. Os oligonucleotídeos usados na amplificação da PAL, por reação de polimerase em cadeia (PCR), foram: PAL\_Fw\_pet28Ntag sense 5'-AGC TGA GGA TCC tta gtg cga tgc aac tct -3' e PAL\_Rev\_pet28Ntag anti-sense 5'-AGC TGA AAG CTT cta cca gca act gag caa-3'.

Os sítios para as endonucleases de restrição estão sublinhados nas sequências acima sendo que, as enzimas utilizadas foram *Bam HI* (G↓GATCC) e *Hind III* (A↓AGCTT). A detecção dos produtos de PCR foi realizada através de gel de agarose, conforme visualizados na figura 4.69 abaixo.

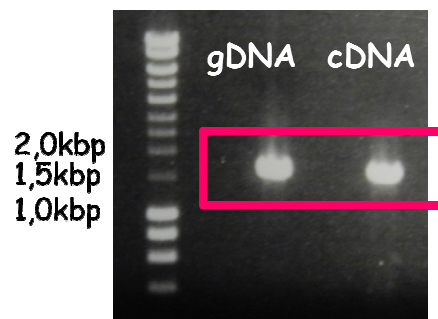


FIGURA 4.69 - Gel de agarose 1% das reações de RT-PCR em comparação à reação de PCR com o DNA genômico. Marcador 1Kb plus (Fermentas).

A amplificação do gene da PAL a partir do cDNA obtido foi realizada com sucesso, conforme se observa na figura acima. A Figura 4.69 mostra uma banda em torno de 1500 pb, que é o tamanho aproximado do gene que codifica a enzima PAL. Após a digestão de ambos o inserto (produto de PCR) e o vetor, o gene da PAL foi então clonado nos vetores de expressão pET28a e pETSUMO e ambos os plasmídeos confirmados por sequenciamento.

Após a confirmação do plasmídeo correto carregando o gene que codifica a enzima PAL, este foi transformado em duas cepas de *E.coli*, C41 e BL21(DE3), para dar início aos estudos de expressão da proteína em estudo. Inicialmente, a indução da expressão foi feita com 0,4 M de IPTG a 25 °C durante 16 h. Inicialmente, realizaram-se experimentos utilizando o vetor pET 28a. A utilização do vetor pET28a permite a expressão da proteína de interesse em fusão com uma cauda de seis moléculas de histidina, permitindo o auxílio da cromatografia de afinidade nos processos de purificação. A massa celular bacteriana obtida nos processos de expressão foram ressuspensas em tampão de sonicação e sonicadas em amplitude 20 mA durante 5 minutos. As frações solúveis e insolúveis do produto lisado foram separadas por centrifugação e as amostras obtidas foram analisadas em SDS-PAGE 15%.

Em seguida, os sobrenadantes foram purificados por cromatografia de afinidade em uma coluna contendo resina de níquel. Primeiramente, o sobrenadante foi adicionado à coluna e recolhido (eluato). Em seguida, foram aplicados cinco volumes de tampão de sonicação e a fração recolhida foi denominada eluato 1. Após esse processo, foi adicionado o tampão de sonicação acrescido com concentrações crescentes de imidazol: 40 mM, 80 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM e 500 mM. As frações obtidas na purificação foram analisadas em SDS-PAGE 15%.

A figura 4.70 mostra os géis de poliacrilamida do processo de indução à 25 °C da expressão da proteína PAL nas cepas C41 e BL21(DE3) de *E.coli* respectivamente, assim como as frações obtidas a partir do aumento crescente de imidazol no processo de purificação.

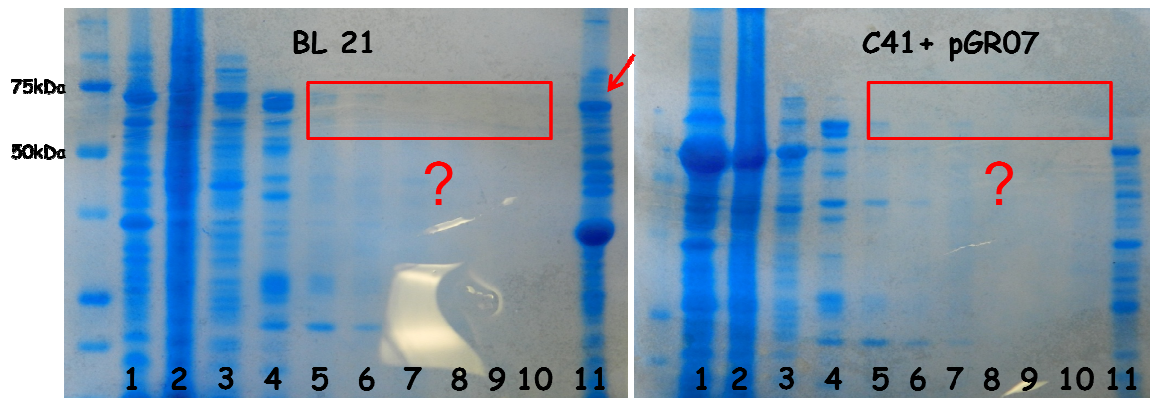


FIGURA 4.70 - Gel de SDS-PAGE do processo de purificação dos extratos da expressão nas cepas C41 e BL21(DE3) de *E.coli* respectivamente. Os números indicam: 1- Total; 2-Eluato; 3-Eluato 1; 4-40 mM; 5- 80 mM; 6-100 mM; 7-150 mM; 8-200 mM; 9- 250 mM; 10- 500 mM; 11-precipitado.

Os géis de SDS mostrados na figura indicam que a proteína não foi expressa de forma solúvel em ambas as cepas de *E. coli* testadas para a expressão, isso pode ser verificado pela ausência de uma banda proteica com massa molecular de aproximadamente 60 kDa, tamanho esperado para a proteína PAL fusionada com uma cauda de histidina. A visualização do gel na figura 4.70 acima indica ainda a presença de uma banda proteica com tamanho esperado da PAL na fração do precipitado obtido na expressão de PAL na cepa BL21 (DE3), indicando que a proteína pode ter sido expressa na forma insolúvel.

Uma possível alternativa para o problema de insolubilidade da enzima PAL foi a expressão da enzima na cepa BL21 (DE3) com indução durante 16 h a temperatura de 15 °C, uma vez que existem relatos que a menor temperatura de indução poderia facilitar o processo de enovelamento da proteína e consequentemente resultar em incrementos de solubilidade.

A figura 4.71 mostra o gel de poliácridamida obtido no processo de indução à 15 °C da expressão da proteína PAL na cepa BL21 (DE3) de *E.coli*, assim como as frações obtidas a partir do aumento crescente de imidazol no processo de purificação.

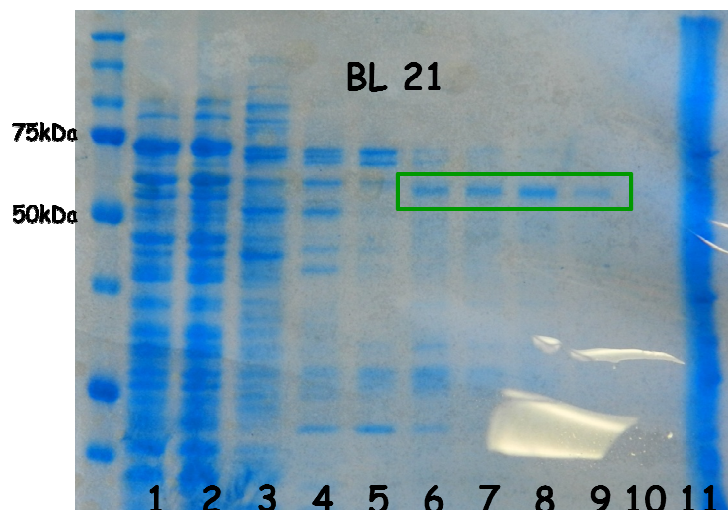


FIGURA 4.71 - Gel de SDS-PAGE do processo de purificação dos extratos da expressão na cepas BL21(DE3) de *E.coli* a 15°C. Os números indicam: 1- Total; 2-Eluato; 3-Eluato 1; 4-40 mM; 5- 80 mM; 6-100 mM; 7-150 mM; 8-200 mM; 9- 250 mM; 10- 500 mM; 11-precipitado.

De acordo com o gel de poliacrilamida mostrado na figura 4.69, verifica-se que uma proteína com tamanho aproximado à enzima PAL foi expressa de forma solúvel sob as condições de indução à 15 °C de temperatura, conforme comprovado pela presença de uma banda proteica com tamanho esperado de 60 kDa. As frações 6, 7, 8 e 9 foram reunidas e concentradas. A concentração final da proteína foi avaliada pelo método de Bradford (1976) e verificou-se uma concentração de 0,7 mg.mL<sup>-1</sup> num volume final de 100 µL.

Os resultados indicam que a enzima em estudo foi expressa e que o processo de purificação foi eficiente com o auxílio da cromatografia de afinidade. Entretanto, a concentração final proteica alcançada foi muito baixa, impossibilitando os posteriores estudos de atividade enzimática. Avaliou-se dessa maneira a utilização do vetor pETSUMO que possibilita a expressão da enzima em estudo fusionada à uma proteína SUMO, o que poderia resultar no aumento da solubilidade de proteínas parcialmente solúveis expressas em *E. coli*. O gene que codifica a enzima PAL foi então clonado no vetor pETSUMO e posteriormente, o plasmídeo foi expresso em BL21 (DE3), cepa que apresentou



melhores resultados de expressão conforme verificado anteriormente. A temperatura de indução utilizada foi de 15 °C conforme otimizada nos estudos anteriores. A figura 4.72 mostra o gel de poliacrilamida obtido no processo de indução à 15 °C da expressão do plasmideo pETSUMO\_PAL na cepa BL21(DE3) de *E.coli*, assim como as frações obtidas a partir do aumento crescente de imidazol no processo de purificação.

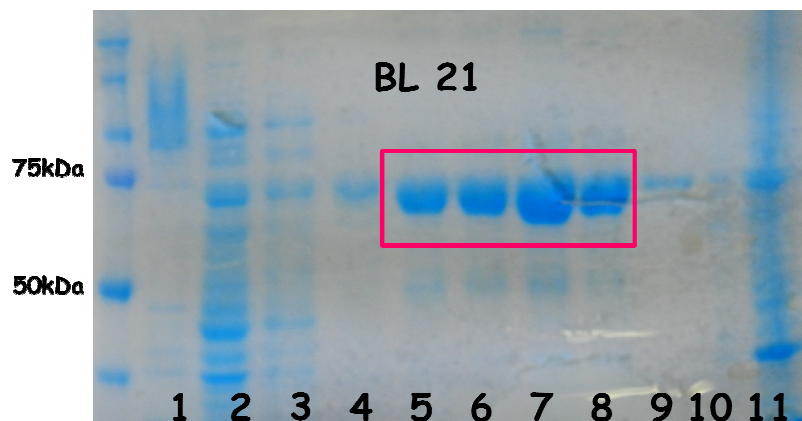


FIGURA 4.72 - Gel de SDS-PAGE do processo de purificação do extrato da expressão na cepa BL21(DE3) de *E.coli* a 15°C. Os números indicam: 1- Total; 2-Eluato; 3-Eluato 1; 4-40 mM; 5- 80 mM; 6-100 mM; 7-150 mM; 8-200 mM; 9- 250 mM; 10- 500 mM; 11-precipitado.

O gel de poliacrilamida mostrado na figura 4.72 indica melhora nos níveis de expressão da enzima PAL quando fusionada a uma proteína SUMO. O aumento da solubilidade da proteína estudada é visível no gel conforme observamos no aumento da intensidade da banda proteica referente à enzima PAL, agora com massa molecular de aproximadamente 71 kDa devido a fusão com a proteína SUMO (~11 kDa).

As frações 5 à 9 obtidas foram reunidas e concentradas. A concentração final da proteína foi avaliada pelo método de Bradford (1976) e verificou-se uma concentração de 6 mg.mL<sup>-1</sup> num volume final de 500 µL, a proteína apresentou alto grau de pureza indicando grande eficiência da coluna de níquel no processo de purificação. Portanto, verificou-se grande aumento nos



níveis de expressão da enzima recombinante e foi possível prosseguir com os estudos de atividade e caracterização enzimática.

A enzima PAL recombinante pura foi avaliada através de análises por LC-MS num equipamento com analisador íon trap e ESI como fonte de ionização, utilizando uma coluna C4 e um gradiente de água e acetonitrila. A figura 4.73 abaixo apresenta o cromatograma obtido, indicando o alto grau de pureza da enzima, e o espectro obtido por deconvolução, indicando a massa molecular da enzima isolada (~71 kDa).

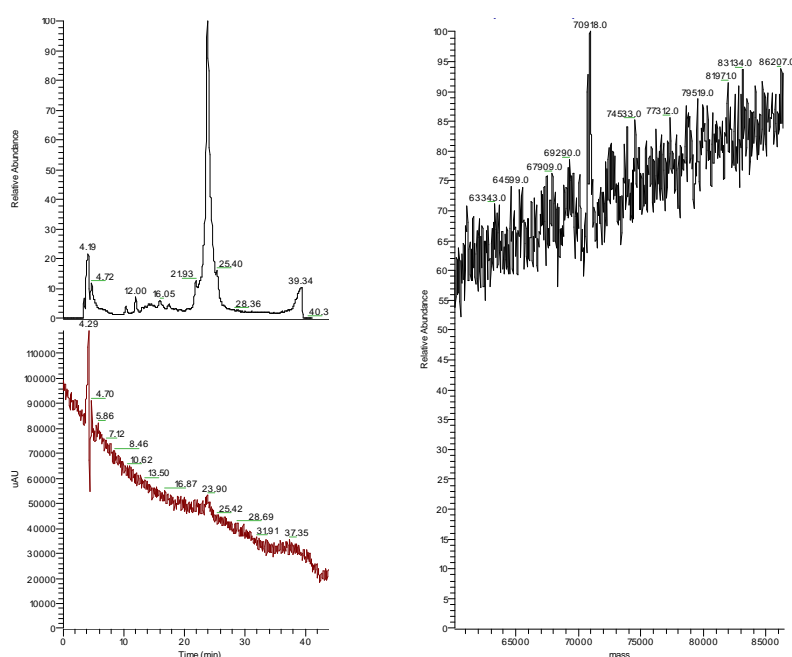


FIGURA 4.73 - Cromatograma e espectro obtido por deconvolução da proteína PAL recombinante isolada, respectivamente.

O espectro de massas observado na figura 4.73 indica que a proteína analisada apresenta MM de aproximadamente 70.918Da, o que está de acordo com a massa molecular teórica calculada no ExPASy (71.019). Desta maneira, a enzima recombinante foi expressa de maneira satisfatória, em altas concentrações e purificada com apenas um passo de purificação, obtendo alto grau de pureza. Os estudos de atividade foram então iniciados.

Os ensaios de atividade preliminares da enzima PAL recombinante fusionada a uma proteína SUMO e purificada por gradiente de imidazol por cromatografia de afinidade em níquel, foram analisados via LC-MS visando detecção do produto de reação, entretanto, não foi possível detectar atividade para a enzima recombinante pura. Os extratos brutos também foram avaliados com relação à atividade da enzima, entretanto os resultados preliminares também indicaram a ausência de atividade. As proporções de proteína, substrato e tampão foram modificadas, assim como a temperatura e o pH da reação, porém nenhuma atividade foi detectada.

Outros tampões de sonicação foram testados com a adição de diferentes agentes redutores (5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 1 mM TCEP, 5 mM TCEP, 1 mM TCEP + Phe), já descritos para enzimas PAL recombinantes de outros organismos (POPPE & RETEY, 2005), porém, as análises indicaram a ausência de produção do produto da reação enzimática e portanto, a inatividade da enzima recombinante estudada.

Uma possível causa para a falta de atividade verificada nos ensaios enzimáticos poderia ser o mau enovelamento da proteína expressa em *E. coli*. Dessa maneira, o tamanho correto e o estado oligomérico da enzima recombinante poderia apresentar indícios da correta formação da estrutura quaternária da enzima em estudo. Estes parâmetros foram avaliados através de análises por filtração em gel utilizando uma coluna S200 com eluição isocrática com tampão Tris pH 8.0 e 0.2 mM NaCl (Figura 4.74). Uma vez que o volume de eluição da proteína na cromatografia de exclusão é determinado pelo tamanho da proteína, pode-se a partir de uma curva de calibração (curva padrão) utilizando várias proteínas de massa conhecida determinar o tamanho da proteína de interesse.

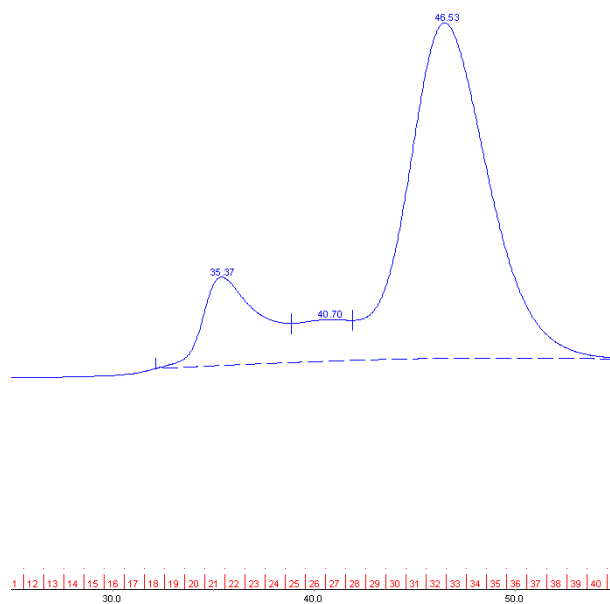


FIGURA 4.74 - Cromatograma obtido a partir de análises da proteína PAL recombinante por filtração em gel.

A partir do volume de eluição observado nas análises e com o auxílio da curva de calibração construída a partir de proteínas de diferentes tamanhos, pode-se determinar que a enzima recombinante isolada apresenta tamanho >200 kDa. Descrições da enzima PAL na literatura produzida por diferentes organismos evidenciam a estrutura da enzima como um tetrâmero, e portanto, os resultados parecem indicar que a proteína PAL recombinante expressa apresenta-se na forma de tetrâmero. Dessa forma, indicando que a estrutura terciária da enzima foi aparentemente enovelada de maneira correta.

Excluída a dúvida com relação ao mau enovelamento da enzima PAL em estudo, verificou-se a possibilidade da cauda de histidina e a proteína SUMO ligadas ao N-terminal da enzima PAL recombinante estarem de alguma forma interferindo na atividade enzimática. Verificou-se esta hipótese através do desenvolvimento de duas novas construções no vetor pET24(+), que possibilitassem a expressão da enzima PAL recombinante fusionada a cauda de histidina no C-terminal da proteína em estudo e ainda, uma segunda construção que possibilitasse a expressão da enzima recombinante sem nenhuma fusão através da adição de um codon terminador no *primer* reverso utilizado na amplificação do gene em estudo. O mapa do vetor pET24(+) utilizado nas duas

novas construções pode ser observado na figura 4.75, os sítios de restrição utilizados neste caso foram *BamHI* e *HindIII*. Ambas as construções foram transformadas em BL21 (DE3), cepa bacteriana que apresentou melhor rendimento da expressão de PAL recombinante na forma solúvel. Posteriormente, os extratos brutos gerados, foram submetidos a ensaios enzimáticos. Mais uma vez os extratos resultantes dos ensaios enzimáticos utilizando como fonte enzimática os extratos brutos obtidos a partir das expressões em BL21 (DE3) das construções com fusão de cauda de histidina no C-terminal e a construção sem fusão, não foram positivos com relação a produção de ácido cinâmico a partir do aminoácido Phe, indicando que as fusões não interferiam na atividade da enzima estudada.

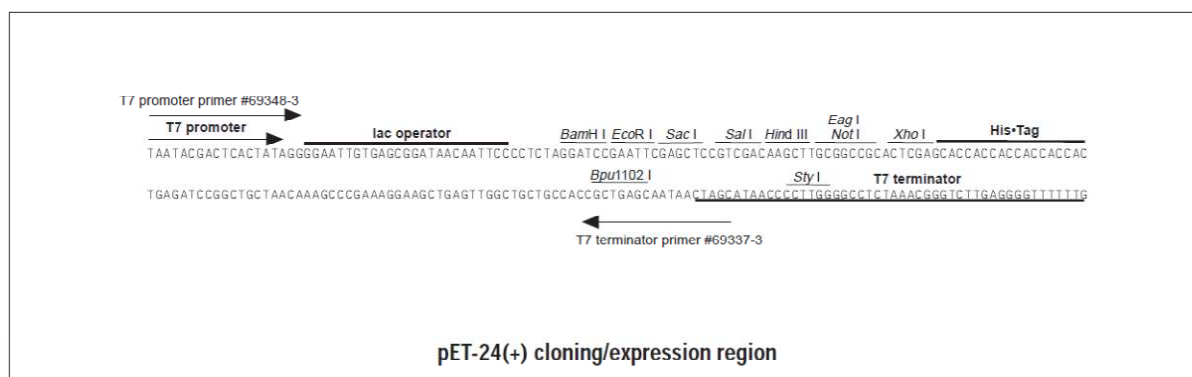


FIGURA - 4.75- Mapa do vetor pET24(+).

Diante do sucesso na obtenção de atividade nos estudos da enzima PAL nativa obtida das células de *P. brasilianum* conforme relatado anteriormente, e diante dos fracassos com relação a PAL recombinante, foi proposto um experimento onde a lise celular de células de *E. coli* BL21 (DE3) ocorreu exatamente no mesmo tampão utilizado na lise celular das células do fungo *P. brasilianum* composto por 50 mL de tampão tris-HCl 25 mM, pH 8,8; EDTA 1 mM; sacarose 250 mM ; DTT 15 mM; PVPP 2 g e ácido ascórbico 40 mM. O extrato proteico bruto de *P. brasilianum* também foi gerado como forma de controle das condições de lise e ensaios enzimáticos. Em seguida, os extratos

brutos gerados foram submetidos a ensaios enzimáticos conforme descritos no item 3.4.13 e analisados por LC-MS.

A figura 4.76 abaixo apresenta as análises obtidas via LC-MS dos ensaios enzimáticos utilizando como fonte proteica os extratos brutos gerados a partir da expressão das construções com a fusão poli-his no N-terminal da enzima PAL recombinante (Figura 4.76A); poli-his no C-terminal da PAL (Figura 4.76B) e a enzima PAL sem fusão (Figura 4.76C). Verifica-se ainda na figura 4.76D os resultados das reações enzimáticas com o extrato proteico bruto obtido a partir das células de *P. brasilianum* (PAL nativa), utilizado como controle positivo da reação, assim como verifica-se as análises do padrão de ácido cinâmico indicando o tempo de retenção do composto afim de se determinar a produção do produto de reação enzimática por comparação (Figura 4.76E). Observa-se na figura ainda a reação enzimática controle (extrato bruto + tampão sem a adição do substrato enzimático-Phe), afim de garantir que a conversão em ácido cinâmico era de cunho enzimático (Figura 4.76F). Conforme visualizado na figura 4.76 abaixo, as análises de detecção seletiva por LC-MS do ácido cinâmico, produto da reação enzimática, indicaram atividade dos extratos brutos no caso de todos os experimentos propostos, indicando que o tampão de lise baseado no tampão de extração da enzima nativa funcionou de maneira satisfatória, indicando que as concentrações altas de agentes redutores, no caso 15 mM de DTT, são primordiais afim de obter atividade da enzima PAL recombinante, conforme alguns pesquisadores já haviam reportado (POPPE & RETEY, 2005).

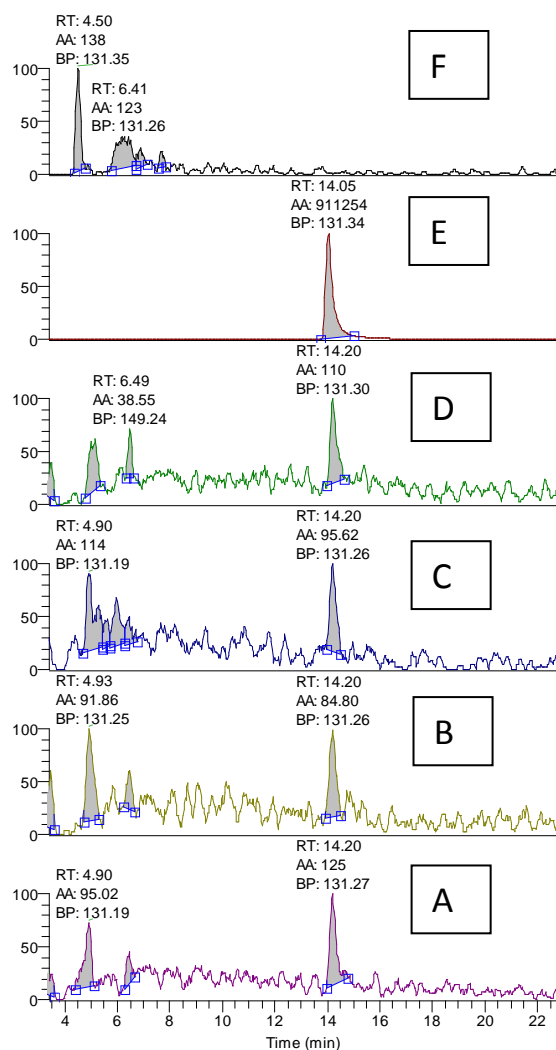


FIGURA 4.76 - Análises por LC-MS das reações enzimáticas obtidas a partir da expressão das diferentes construções obtidas (A) Reação enzimática utilizando o extrato bruto obtido a partir da expressão da construção com SUMO e poli-his N-terminal da enzima PAL recombinante, (B) Reação enzimática utilizando o extrato bruto obtido a partir da expressão da construção com poli-his C-terminal da enzima PAL recombinante, (C) Reação enzimática utilizando o extrato bruto obtido a partir da expressão da construção com a enzima PAL recombinante sem fusão, (D) Reação enzimática utilizando o extrato bruto proteico obtido a partir das células de *P. brasilianum*, (E) Ácido cinâmico padrão e (F) Reação controle.

Uma vez obtidos os extratos brutos ativos com relação a enzima PAL em todos os experimentos preliminares de expressão das construções plasmidiais apresentadas, optou-se por trabalhar com a construção em pETSUMO, caracterizada pela cauda de histidina e a proteína SUMO fusionadas ao N-terminal da enzima PAL, devido as altas concentrações da enzima

recombinante expressa na forma solúvel. O passo posterior foi caracterizado pelas tentativas de purificação visando a obtenção da enzima PAL recombinante pura e ativa para posteriores estudos de caracterização bioquímica, partindo-se dos extratos brutos que apresentaram atividade.

As purificações iniciais envolvendo a utilização da cromatografia de afinidade em resina de níquel e gradientes crescentes de imidazol, resultaram na proteína PAL recombinante com altos graus de pureza como desejado, entretanto, ensaios enzimáticos preliminares indicaram a ausência de atividade na enzima pura por esta metodologia de purificação estudada.

Inúmeras tentativas de purificação da enzima PAL recombinante foram realizadas, todas sem sucesso. Frente às dificuldades apresentadas, buscas na literatura relacionadas ao mecanismo de ação da enzima indicaram que a reação enzimática ocorre via uma reação do tipo Fiedel Crafts (Figura 4.77) a qual o mecanismo de ação é muito similar à enzimas HAL (Histidina amoniolase), onde a reação ocorre via um grupo prostético, o 3,5-dihidro-5-metildieno-4H-imidazol-4-one (MIO) que é formado pela ciclização e eliminação de duas moléculas de água do tripeptídeo Ala-Ser-Gly. Devido a grande similaridade estrutural entre o grupo prostético de PAL e o imidazol, utilizado na purificação em resina de níquel, questionou-se a possibilidade do imidazol estar inibindo a formação do grupo prostético e inibindo conseqüentemente, a atividade da enzima estudada, mesmo após consecutivas diálises na tentativa de retirar este composto do tampão enzimático. A hipótese foi testada avaliando-se o potencial de inibição deste composto a partir da adição de 40 mM de imidazol nas reações enzimáticas utilizando como fonte enzimática os extratos brutos resultantes da expressão de SUMO-PAL recombinante em BL21 (DE3). As análises do controle (reação padrão, sem adição de inibidor) e das reações com adição de imidazol indicaram a partir da comparação das áreas encontradas em ambas as reações (111408 e 52185 respectivamente), que o imidazol é realmente um

inibidor da atividade enzimática. Verifica-se aproximadamente 50% de inibição ao adicionar 40 mM de imidazol na reação.

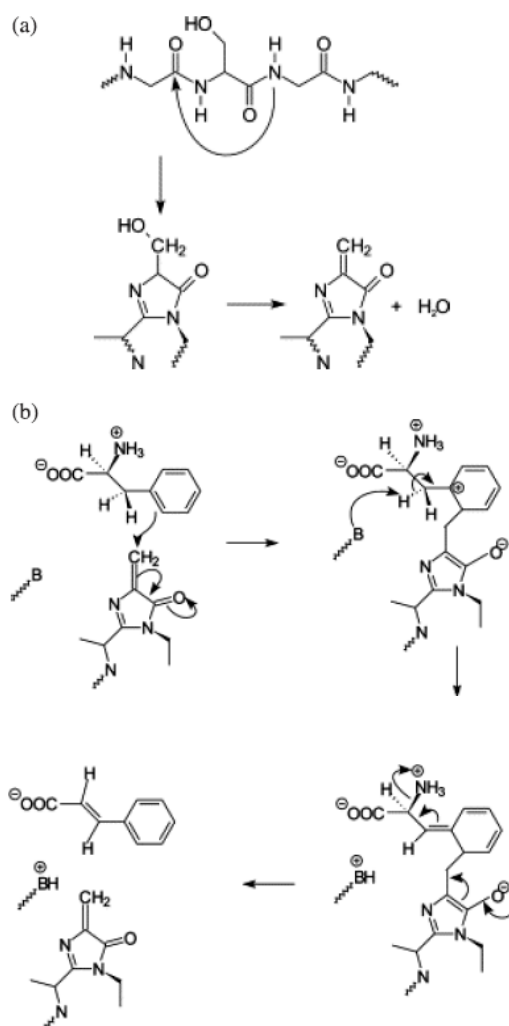


FIGURA 4.77 - Mecanismo de ação da enzima PAL (Extraído de POPPE & RETEY, 2005).

Uma vez determinado que o imidazol é um forte inibidor da atividade da enzima estudada, mesmo após consecutivas diálises, foram propostos experimentos alternativos no intuito de purificação da enzima PAL recombinante. Inicialmente, avaliou-se a purificação da enzima PAL utilizando-se a purificação baseada no gradiente de histidina, composto que também compete pela cauda de histidina da enzima estudada e conseqüentemente, a purificação também é baseada em cromatografia de afinidade com resina de



níquel. Como esperado, a histidina também inibe a atividade da enzima PAL recombinante, devido a sua grande similaridade com o grupo prostético responsável pela reação enzimática e, portanto, os ensaios enzimáticos quando analisados por LC-MS foram negativos com relação a produção do produto da reação enzimática, ácido cinâmico.

A expressão de proteínas pelo vetor pETSUMO está associada à fusão de uma cauda na porção N-terminal, contendo a proteína SUMO e uma cauda poli-His que promovem maior solubilidade à proteína recombinante e facilitam a purificação, respectivamente, além de um sítio de clivagem reconhecido pela proteína SUMO protease que remove a cauda na porção N-terminal. Dessa maneira, uma alternativa à purificação por afinidade com gradiente de imidazol foi a clivagem utilizando a enzima SUMO protease. A purificação baseada na clivagem com a protease iniciou com a adição do extrato proteico bruto obtido da expressão em BL21 (DE3) à resina de níquel, e conseqüentemente, a enzima recombinante expressa com a cauda poli-his no N-terminal, por afinidade se liga a resina de níquel e as outras proteínas que não são de interesse e não apresentam interação pela fase estacionária, são eluídas em tampão de lavagem. A SUMO protease gentilmente cedida pela Prof. Dulce Helena Ferreira de Souza foi então adicionada à coluna contendo resina de níquel junto ao extrato previamente eluído, e a reação se estendeu por aproximadamente 16 horas em tampão Tris pH 8.8, para a clivagem no sítio de clivagem específico. Posteriormente, a proteína foi eluída em tampão e coletada pura e sem fusão, enquanto a cauda poli-his ligada a proteína SUMO clivada da proteína recombinante, ficou ainda ligada na resina de níquel por afinidade e foi posteriormente eluída em altas concentrações de imidazol no tampão. A proteína PAL recombinante sem fusão obtida em tampão tris pH 8.8 foi utilizada como fonte enzimática nos ensaios para aferir a atividade da enzima obtida diante da estratégia de purificação na ausência de imidazol. Verificou-se nos ensaios de atividade que o ácido cinâmico, produto da reação enzimática com o aminoácido

Phe, foi produzido com sucesso, obtendo-se desta forma uma estratégia bem sucedida afim de obter a enzima PAL recombinante pura e ativa.

Embora a estratégia de clivagem da cauda poli-his combinada a adição da proteína SUMO protease tenha tido sucesso na obtenção da enzima PAL recombinante pura e ativa, a dependência de grandes concentrações da protease para clivagem na etapa de purificação nos fez questionar a eficiência do processo e testar uma outra abordagem baseada na purificação da enzima recombinante pela diferença de pH. Esta purificação se baseia no princípio de que em valores altos de pH a histidina apresenta grande interação pelo níquel da resina, entretanto, valores baixos de pH, aproximadamente 4, a histidina se torna protonada e deixa de apresentar afinidade pelo níquel e portanto, a proteína fusionada a cauda poli-his é eluída.

Esta abordagem alternativa de purificação baseada no gradiente de pH, foi testada adicionando-se tampão tris pH 4,0 à coluna contendo resina de níquel junto ao extrato obtido da expressão da enzima SUMO-PAL recombinante em BL21 (DE3) previamente eluído. A análise por SDS-PAGE da fração eluída com tampão com baixo valor de pH pode ser observada na figura 4.78 abaixo. Visualiza-se no gel uma banda proteica pura em aproximadamente 70 kDa relacionada a enzima PAL recombinante fusionada a cauda poli-his e a proteína SUMO, indicando que o protocolo de purificação a partir de gradiente de pH teve êxito. A fração da enzima PAL em pH 4,0 obtida foi posteriormente concentrada e dialisada contra tampão tris pH 8.8. Os ensaios enzimáticos utilizando-se a enzima PAL purificada através desta metodologia indicaram a produção do ácido cinâmico a partir do aminoácido Phe e conseqüentemente, a enzima foi purificada com sucesso e manteve sua atividade depois de purificada. Observam-se, na tabela 4.15, os resultados obtidos com a purificação da enzima PAL recombinante a partir do extrato do extrato enzimático da expressão em BL21 (DE3). O fator de purificação neste processo faz com que a proteína total se reduza, removendo o máximo possível de proteínas inespecíficas, sendo que a

perda desta proteína é muito maior que a perda de atividade; portanto, a atividade específica aumenta mesmo que diminua a atividade total (LEHNINGER, 1977).

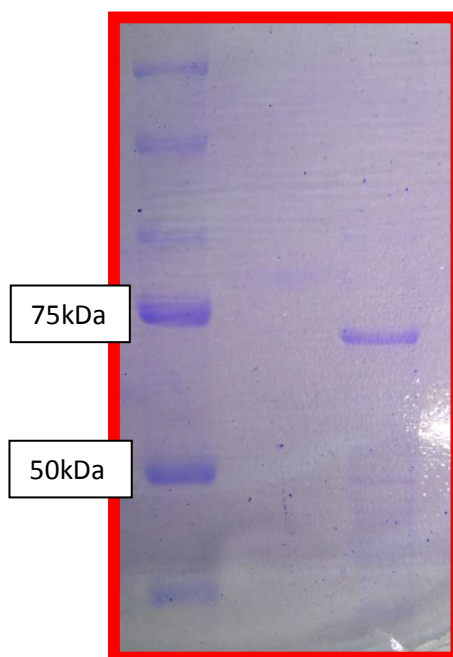


FIGURA 4.78 - Gel de SDS-PAGE obtido a partir da purificação da enzima PAL recombinante com gradiente de pH.

TABELA 4.15: Processo de Purificação da PAL

Passos de purificação	Volume final (mL)	Teor de proteína (mg.mL <sup>-1</sup> )	Atividade Total (U)	Atividade Específica (U.mg <sup>-1</sup> )	Rendimento (%)
Extrato bruto	25	5,444	0,198	0,0015	100
PAL purificada en níquel por pH	0,4	0,5261	0,006	0,029	3

Uma vez obtida a enzima PAL recombinante pura e ativa, estudos visando a otimização das condições de incubação da reação enzimática, assim como a caracterização bioquímica foram iniciados. Avaliou-se a princípio o tempo ótimo da reação enzimática, parâmetro avaliado em relação ao pH para máxima produção do produto da reação enzimática e determinação do pH ótimo da reação.

A ação catalítica de uma reação enzimática é alcançada dentro de limites muito estreitos de pH. Cada reação tem um pH ótimo que, para a maioria das enzimas se situa entre 4,5 e 8,0 e no qual a enzima apresenta a sua atividade máxima. No caso da enzima PAL isolada de diferentes fontes este valor restringe-se à faixa 8.2 - 9.0. Os ensaios enzimáticos visando a otimização de tais parâmetros na reação com a enzima recombinante foram conduzidos em duplicata onde testaram-se 5 diferentes tempos de reação enzimática (30 minutos, 1, 3, 6 e 24 h) em função da variação dos valores de pH. Os valores de pH avaliados no estudo foram 8,0, 8.8 e 9.5. Posteriormente as reações foram avaliadas por HPLC/UV utilizando o padrão de ácido cinâmico para comparação do tempo de retenção e espectro de UV e consequente comprovação da identidade do produto formado. Na tabela 4.16 abaixo visualizam-se as áreas encontradas no experimento referentes as banda cromatográficas do ácido cinâmico nas diferentes reações.

TABELA 4.16 - Valores de áreas encontradas para o ácido cinâmico quando a reação enzimática foi submetida a variações na temperatura e pH.

Tempo	pH	A	B	Média
30'	8.0	562939	539399	551169
30'	8,8	558627	669333	613980
30'	9.5	684158	691566	687862
1h	8.0	606735	675726	641230
1h	8,8	676779	849632	763205
1h	9.5	716253		716253
3h	8.0	694711	796627	745669
3h	8,8	892634	987373	940003
3h	9.5	0	0	0
6h	8.0	0	0	0
6h	8,8	0	0	0
6h	9.5	0	0	0
24h	8.0	0	0	0
24h	8,8	0	0	0
24h	9.5	0	0	0

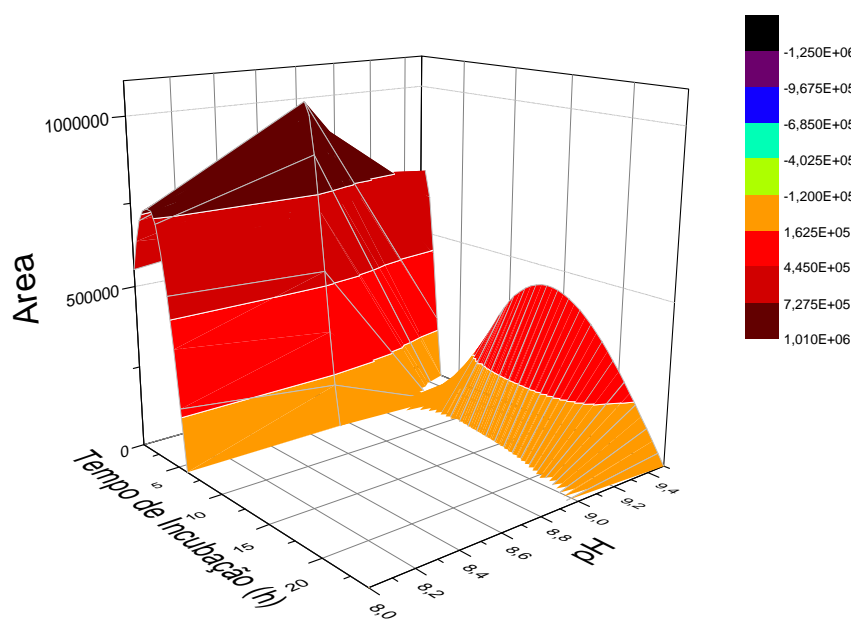


FIGURA 4.79 - Gráfico do pH e tempo de incubação ótimos da enzima PAL recombinante.

A partir dos valores de áreas referentes as bandas cromatográficas do ácido cinâmico avaliada nos cromatogramas dos ensaios com diferentes condições reacionais, determinaram-se as condições ótimas de pH e tempo de reação enzimática com a PAL recombinante, conforme observado no gráfico

tridimensional apresentado na figura 4.79 que reflete os valores de pH em função do tempo de reação, em função da área de ácido cinâmico produzido nas reações. As condições ótimas de pH e tempo de reação foram avaliadas encontrando-se um valor de pH ótimo em 8.8 e máximo rendimento de ácido cinâmico em 3 h de reação.

A temperatura exerce uma grande influência na atividade e estabilidade das enzimas. Um aumento desta, causa maior energia cinética das moléculas dos reagentes ocasionando maior número de colisões produtivas por unidades de tempo. No entanto, o aumento da temperatura acima de um determinado valor afeta consideravelmente a estrutura terciária da enzima, bem como a estabilidade do complexo enzima-substrato. A temperatura ótima enzimática da PAL recombinante foi obtida através do gráfico gerado a partir das respostas da produção de ácido cinâmico nos ensaios quando avaliadas as diferentes temperaturas de 40, 45, 50 e 55 °C. A temperatura ótima da enzima PAL recombinante, conforme observado no gráfico apresentado na figura 4.80, fica então estabelecida em 45 °C.

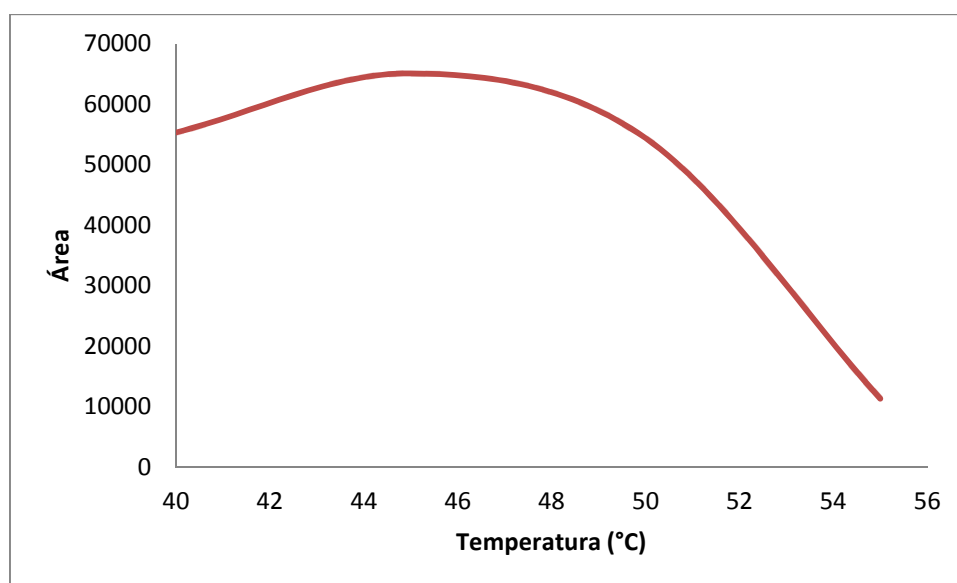


FIGURA 4.80 - Gráfico da temperatura ótima da enzima PAL recombinante.

Um dos fatores que afetam a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima é a concentração do substrato presente [S] (concentração do substrato). Dessa maneira, com o intuito de calcular os parâmetros cinéticos da enzima PAL recombinante e caracterizá-la bioquimicamente, foram realizados ensaios enzimáticos variando-se a concentração de substrato, no caso em estudo o aminoácido L-fenilalanina, e mantendo fixa a concentração da enzima. Os ensaios foram conduzidos nas condições ótimas de pH, temperatura e tempo de reação determinados no estudo.

A partir das respostas geradas nas reações enzimáticas obtidas na forma de áreas relacionadas às bandas cromatográficas do produto ácido cinâmico, somada a construção de uma curva de calibração deste composto padrão (Figura 4.81), foi possível gerar uma equação de reta, a partir da qual, determinou-se as concentrações de ácido cinâmico produzido em cada uma das reações enzimáticas com diferentes concentrações de substrato, durante 3 h de reação. Determinou-se, portanto, a velocidade de reação de cada ponto testado.

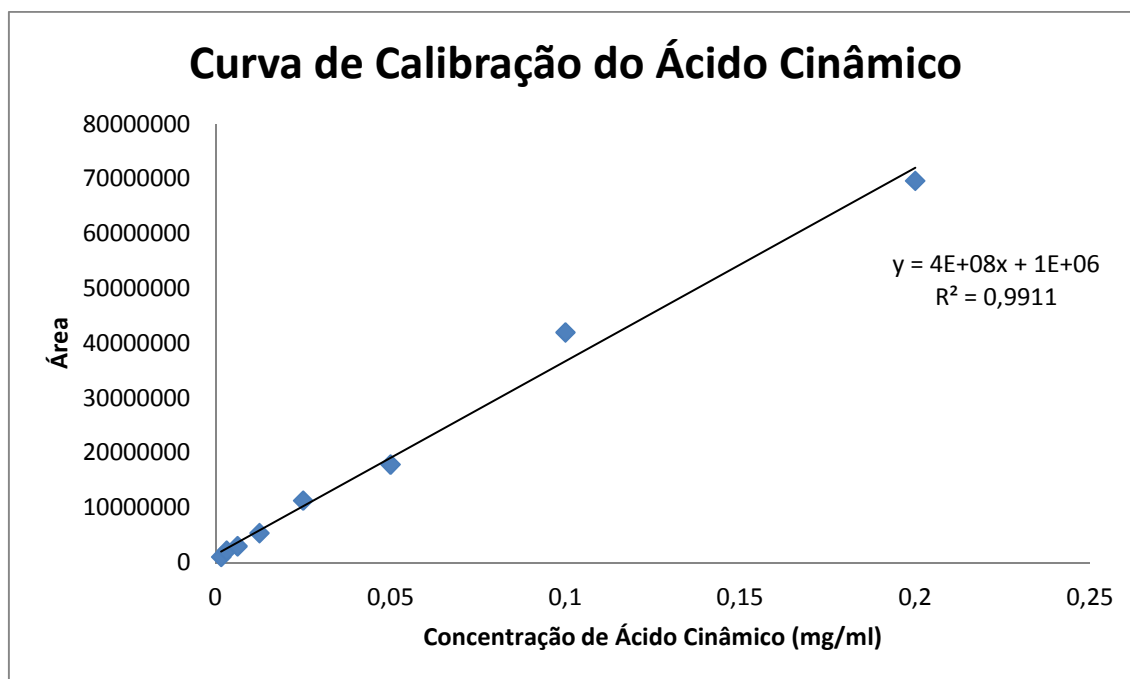


FIGURA 4.81 - Curva de calibração obtida para o ácido cinâmico.

O efeito provocado em  $V_0$  (velocidade inicial) pela variação da  $[S]$ , quando a concentração de enzima é mantida constante está mostrado na Figura 4.82.

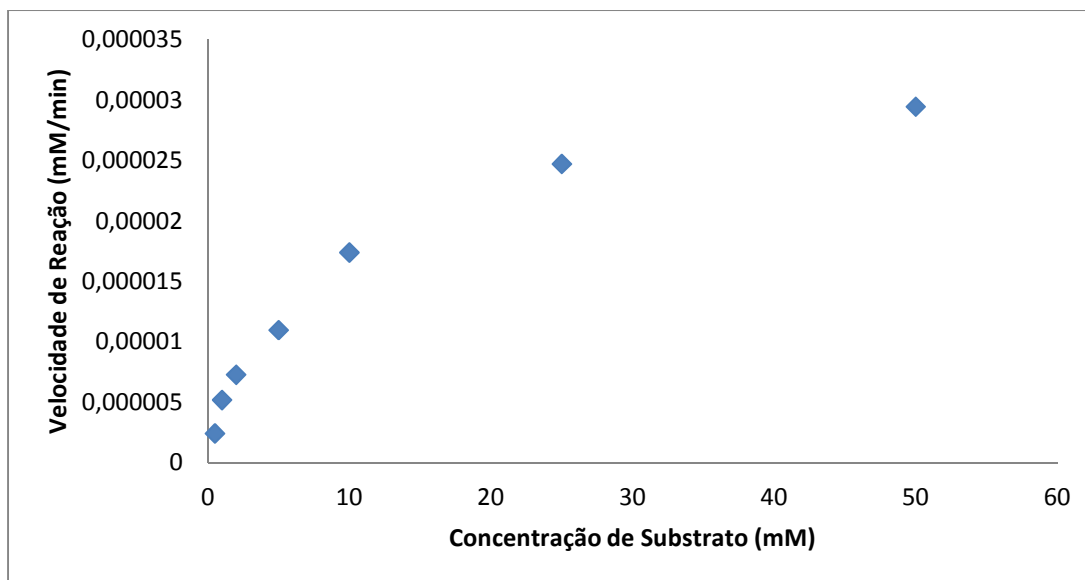


FIGURA 4.82 - Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima.

Visualiza-se no gráfico obtido que em concentrações pequenas do substrato,  $V_0$  aumenta quase linearmente com os aumentos de  $[S]$ . Em concentrações maiores de substrato  $V_0$  aumenta por incrementos menores em respostas aos aumentos da  $[S]$ . Finalmente, é alcançado um ponto acima do qual ocorrem apenas aumentos insignificantes em  $V_0$ , mesmo diante de aumentos em  $[S]$ , sendo este ponto chamado de velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ). Assim, à medida que a concentração do substrato começa a crescer, entretanto, o aumento na velocidade de reação começa a diminuir até que, com uma grande concentração de substrato, nenhuma mudança posterior na velocidade é observada.

A equação matemática que define a relação quantitativa entre a velocidade de uma reação enzimática e a concentração do substrato, é a equação de Michaelis-Menten (Figura 4.83). É uma expressão da relação quantitativa entre a velocidade inicial  $V_0$ , a velocidade inicial máxima  $V_{m\acute{a}x}$ , e a concentração



inicial de substrato [S], todas relacionadas através da constante de Michaelis-Menten,  $K_m$ . O  $K_m$  é definido como a concentração de substrato necessária para que a velocidade da reação enzimática seja a metade da máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) e indica a “afinidade” de uma enzima pelo seu substrato. O valor de  $K_m$  varia, consideravelmente, de uma enzima para outra e em uma enzima particular com diferentes substratos. Em alguns casos, mudanças nas condições de reação, como pH ou temperatura, podem ter influencia no valor de  $K_m$ .

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

FIGURA 4.83 - Equação de Michaelis-Menten.

Através da equação de Michaelis-Menten é possível a transformação em gráfico dos duplos recíprocos ou Lineweaver-Burke, o gráfico de  $1/V_0$  versus  $1/[S]$  é representado por uma linha reta. Essa linha tem uma inclinação de  $K_m/V_{m\acute{a}x}$ , um intercepto de  $1/K_m$  no eixo de  $1/[S]$ . A partir da construção do gráfico dos duplos recíprocos (Figura 4.84) pode-se determinar os parâmetros enzimáticos.

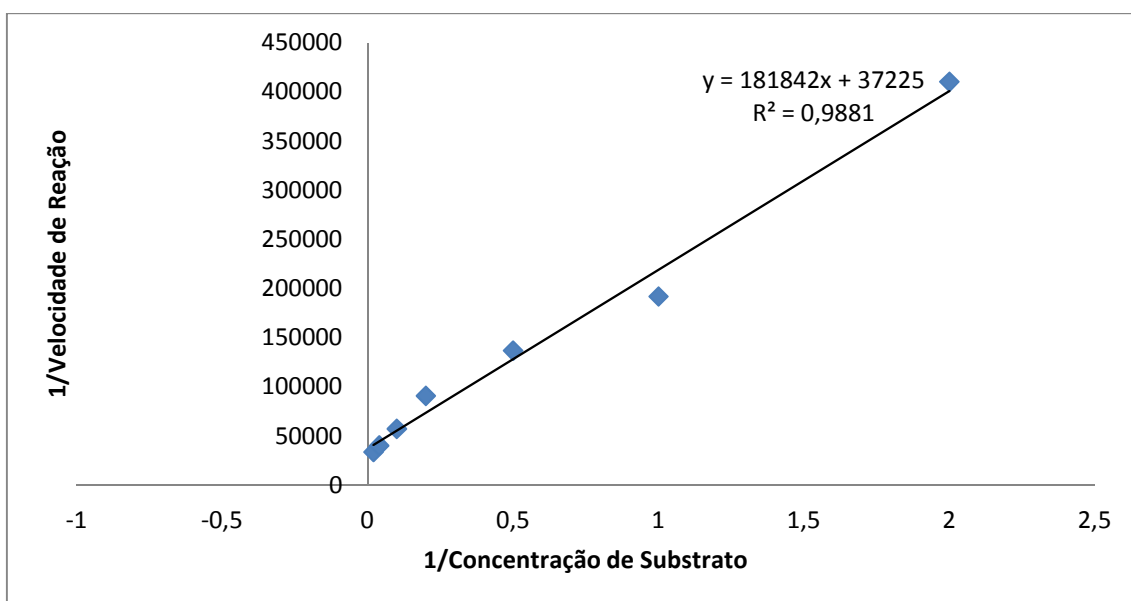


FIGURA 4.84 - Gráfico dos duplos recíprocos ou Lineweaver-Burke para a enzima PAL recombinante.

Observando-se o comportamento da atividade enzimática em relação ao aumento da concentração do substrato, pode-se afirmar que a enzima PAL obedece à cinética michaeliana. Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  foram estimados utilizando fenilalanina como substrato em pH 8.8 a 45 °C. A enzima PAL recombinante obtida apresentou cinética michaeliana típica com  $K_m$  4,88 mM e  $V_{max} = 2,68 \cdot 10^{-5}$  mM. min<sup>-1</sup> (Figura 4.82). PAL obtida de outras fontes apresentam  $K_m$  entre 15 e 1,05 mM de *Rhodotorula glutinis* e *Ustilago maydis* respectivamente, estando os valores de PAL obtida a partir de *P. brasilianum* dentro dos valores relatados na literatura.

Outras enzimas da rota biossintética dos fenilpropanóides foram investigadas através de análises de similaridade de proteínas de interesse, neste caso, cinamato 4-hidroxilase e ácido p-cumárico Coa ligase dos organismos *Arabidopsis thaliana* e *Aspergillus oryzae*, respectivamente, no site interno de blast desenvolvido contendo o genoma do *P. brasilianum*. As figuras 4.85 e 4.86 indicam a presença de homólogos destas enzimas no genoma de *P. brasilianum*, indicando que o organismo apresenta potencial genético para produção de metabólitos secundários via esta rota biossintética.

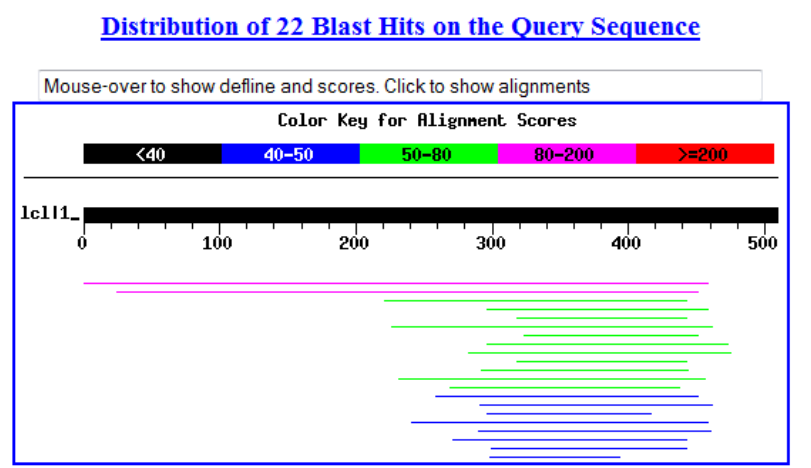


FIGURA 4.85 - Distribuição dos *hits* gerados através de análises de *tblastn* da enzima cinamato 4-hidroxilase de *Arabidopsis thaliana* contra o genoma de *Penicillium brasilianum*.

### Distribution of 33 Blast Hits on the Query Sequence

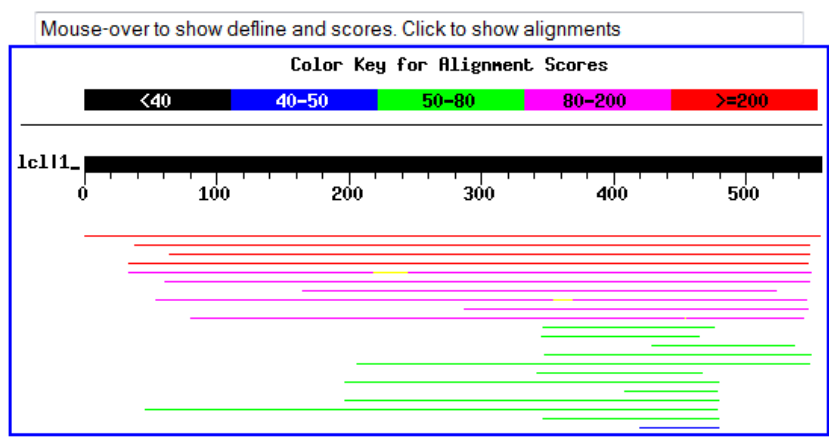


FIGURA 4.86 - Distribuição dos hits gerados através de análises de *tblastn* da enzima ácido p-cumárico-CoA ligase (4CL) de *Aspergillus oryzae* contra o genoma de *Penicillium brasilianum*.

#### **4.4 - Avaliação da atividade da enzima PAL produzida por diferentes espécies de fungos.**

A busca na literatura por metabólitos secundários formados via a rota biossintética dos fenilpropanóides é muito incomum em micro-organismos (FILL et al., 2010). Dessa maneira, diferentes fungos do gênero *Penicillium*, *Aspergillus* e uma espécie de fungo do gênero *Xylaria* foram estudados no sentido de se avaliar a produção da enzima fenilalanina amônia-liase por estes diferentes micro-organismos.

Os micro-organismos estudados foram cultivados seguindo mesmo procedimento experimental que o fungo estudado no presente trabalho. Após cinco dias de cultivo, o micélio dos micro-organismos foi colocado em tampão tris-HCl 25 mM pH 8.8, e a reação enzimática foi realizada adicionando-se o aminoácido L-fenilalanina às células ressuspensas em tampão. Após 10 minutos, período de incubação ótimo da reação, adicionou-se HCl e o produto da reação, ácido cinâmico foi extraído com AcOEt. Os micro-organismos testados foram

cultivados em quadruplicata e dois Erlenmeyers foram mantidos como controle, sem a adição de fenilalanina.

Inicialmente, foi analisado o padrão de ácido cinâmico, como verificado na figura 4.87 abaixo. Depois de verificadas as condições de ionização para este composto, avaliou-se os extratos dos outros microorganismos estudados.

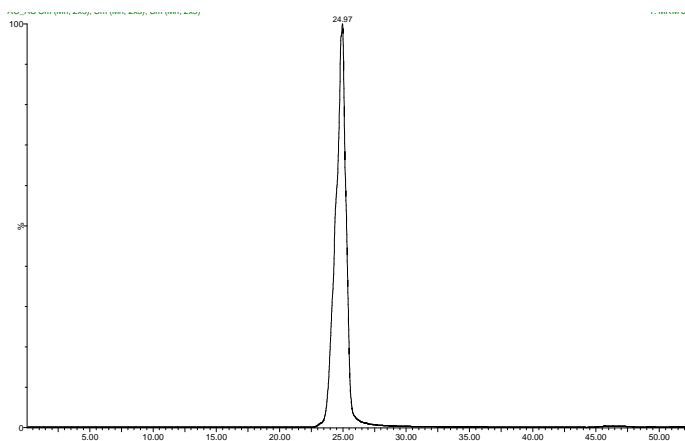


FIGURA 4.87 - TIC obtido para o ácido cinâmico após otimização das condições cromatográficas.

O primeiro fungo estudado foi o *P. brasilianum*, como controle positivo, com o objetivo de verificar se as condições de cultivo eram favoráveis à produção da enzima PAL. Foram realizados experimentos de SRM, uma vez que esta é uma técnica sensível e seletiva para detecção de ácido cinâmico. A transição para a realização dos experimentos foi 147 → 102 determinada de acordo com os espectros de íons produtos apresentados anteriormente. O cromatograma de íons totais de SRM obtido para o ácido cinâmico, produto da reação enzimática com PAL pelo fungo *P. brasilianum*, pode ser observado na figura 4.88 abaixo, onde visualiza-se a produção de ácido cinâmico com tempo de retenção 25 minutos. Os controles de cada experimento (sem a adição de fenilalanina na reação) também foram analisados e são comparados com cada análise das reações enzimáticas.

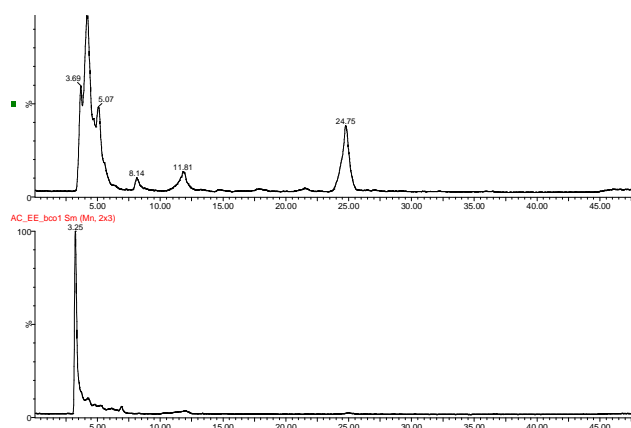
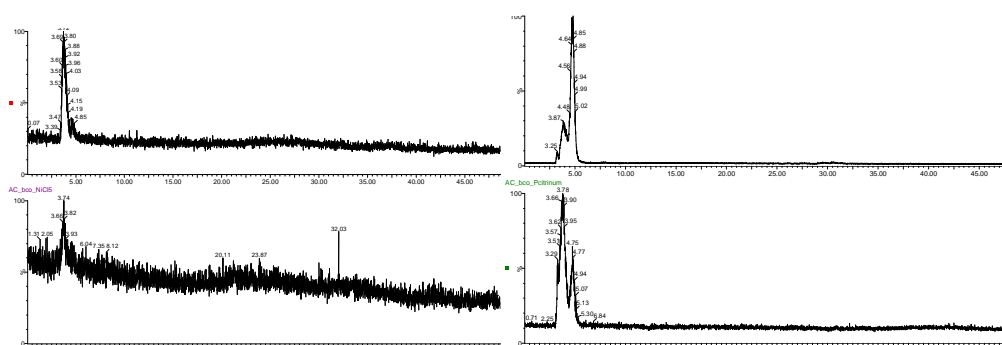


FIGURA 4.88 - TIC obtido para a análise do extrato da reação enzimática com as células do fungo *P. brasilianum* acima e abaixo visualiza-se o cromatograma referente ao controle.

Os cromatogramas de SRM para o ácido cinâmico obtidos a partir das reações enzimáticas com Phe e as células de cada um dos fungos estudados em tampão são observados abaixo. Estudou-se especialmente fungos do gênero *Penicillium*, mesmo gênero do fungo em estudo, no intuito de determinar alguma similaridade entre os metabolismos. Todos os fungos testados foram isolados no grupo LaBioMMi como endofíticos de plantas da família Meliaceae e estão depositados na micoteca do laboratório. Nos cromatogramas abaixo, visualizam-se os micro-organismos que apresentaram a produção de PAL.



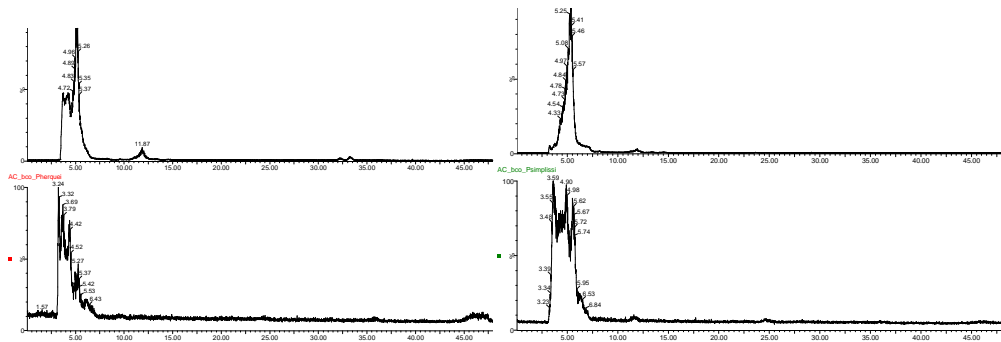


FIGURA 4.90 - TIC obtidos para as análises dos extratos das reações enzimáticas com as células do fungo *P. herquei*. e *P. simplissimum* respectivamente.

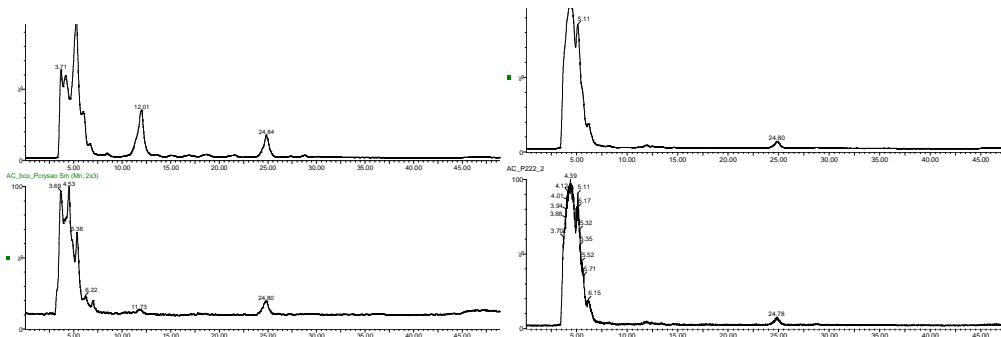


FIGURA 4.91 - TIC obtidos para as análises dos extratos das reações enzimáticas com as células do fungo *P. chrysogenum*. e *Penicillium sp. (LaBioMMi 222)*, respectivamente.

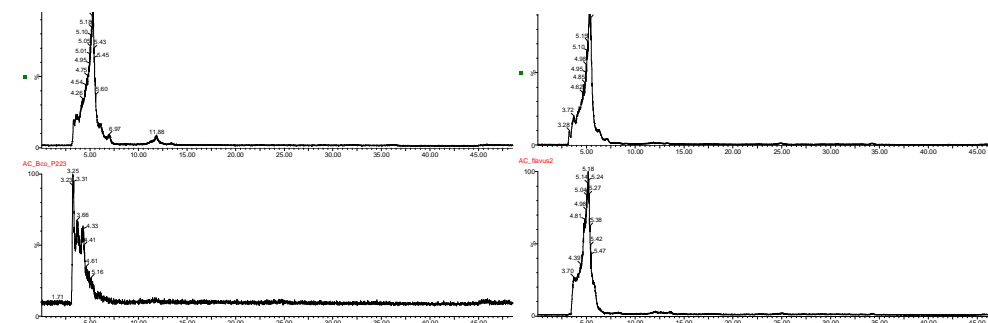


FIGURA 4.92 - TIC obtidos para as análises dos extratos das reações enzimáticas com as células do fungo *Penicillium sp. (LaBioMMi 223)* e *A. flavus*, respectivamente.

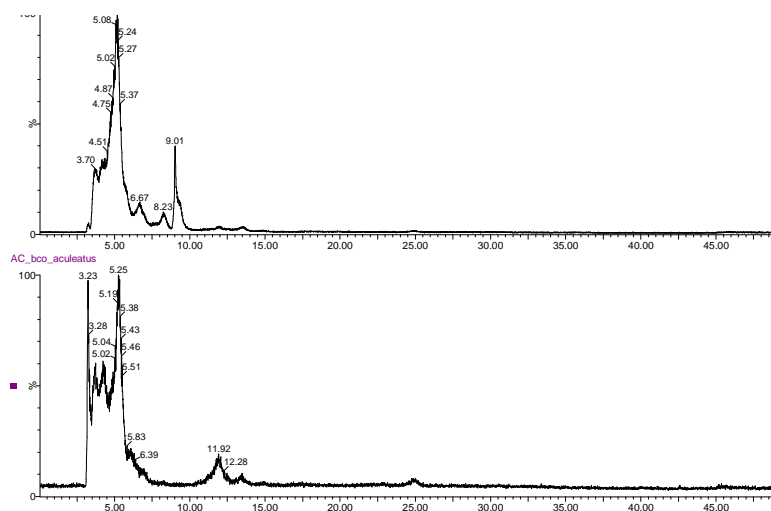


FIGURA 4.93 - TIC obtido para a análise do extrato da reação enzimática com as células do fungo *A. aculeatus*.

A partir das observações dos dados encontrados nos cromatogramas de íons totais apresentados para as análises das reações enzimáticas com diferentes micro-organismos, conclui-se que a grande maioria dos fungos estudados não produz a enzima fenilalanina amônia-liase no seu metabolismo nas condições de cultivo avaliadas, indicando possivelmente, que o fungo *P. brasilianum* se difere pela produção das amidas bis-fenilpropanoídicas. Entretanto, dois micro-organismos, *Penicillium* sp. (LaBioMMi 222) e *P. chrysogenum* produziram ácido cinâmico a partir da reação enzimática, indicando a expressão desta enzima no metabolismo destes fungos, embora não sejam produtores de fenilpropanóides. O fungo do gênero *Xyllaria* também não se mostrou produtor da enzima PAL.

#### 4.5 - Estudo dos precursores da biossíntese das brasiliamidas

A rota biossintética das brasiliamidas parece ocorrer através do caminho geral dos fenilpropanóides, os quais contêm boa parte das enzimas caracterizadas. O primeiro passo como descrito, seria a formação do ácido cinâmico a partir do aminoácido L-fenilalanina via a ação da enzima

fenilalanina-amônioliase (PAL). Os passos posteriores, apresentados na proposta abaixo (Figura 4.94), seriam a hidroxilação na posição 4 do anel aromático formando o ácido p-cumárico via a ação da enzima CAH (cinamato 4-hidroxilase), seguido de outra hidroxilação na posição 3 do anel aromático, levando ao composto conhecido como ácido cafeico. Em seguida, haveria a formação do ácido ferúlico, como mostrado na figura 4.94 abaixo pela ação da enzima O-metiltransferase. O passo que precede a formação do precursor ácido sináptico seria a formação do ácido 5-hidroxi-ferúlico e finalmente, ocorre a formação do ácido sináptico.

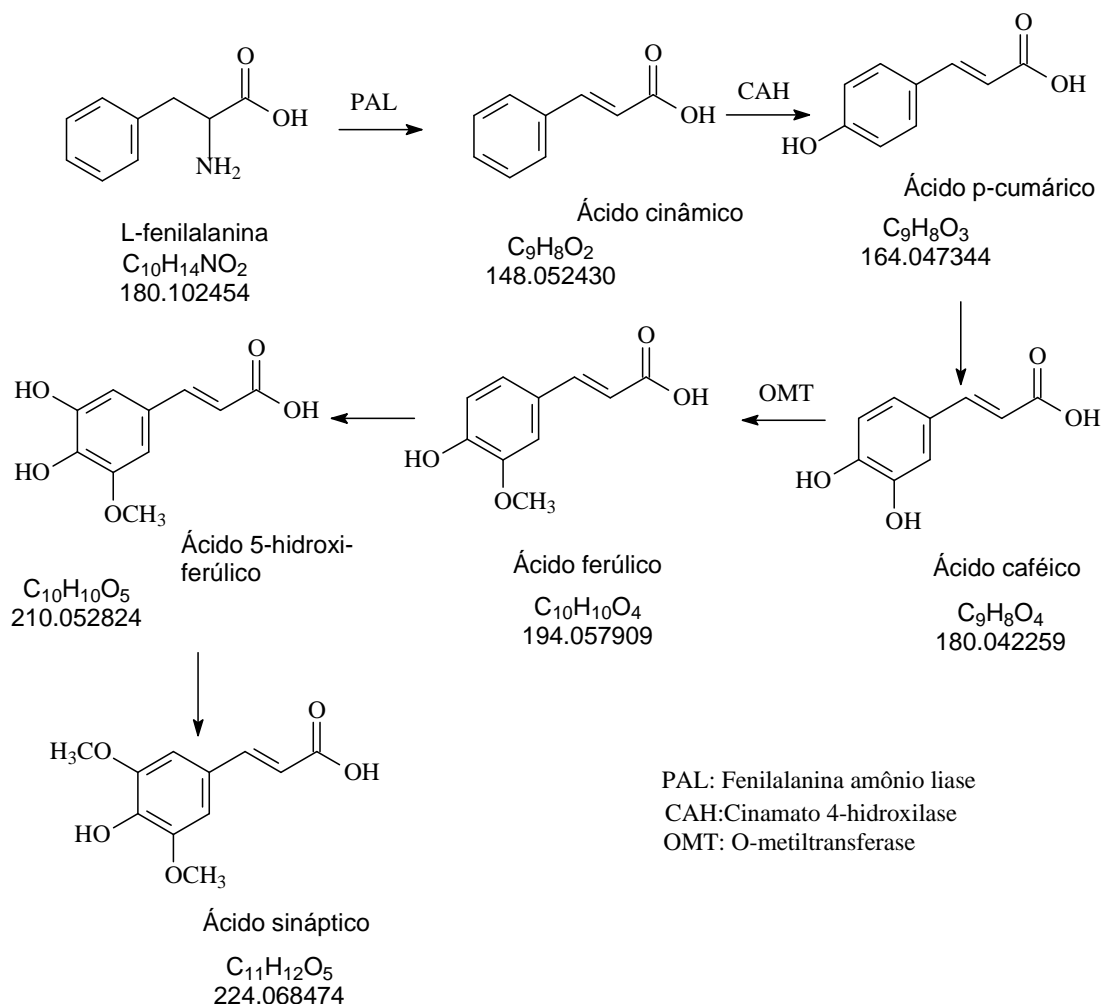


FIGURA 4.94 - Formação dos precursores das brasiliamidas.

No intuito de verificar a produção dos intermediários biossintéticos das brasiliamidas foram realizadas análises de HRMS (espectrometria de massas



de alta resolução) dos extratos gerados a partir dos ensaios enzimáticos realizados com dois diferentes tempos de reação enzimática (2h e 12h), utilizando-se Phe e [2-<sup>13</sup>C]-Phe como substratos para a reação. As análises por HRMS visaram à detecção e confirmação dos intermediários biossintéticos formados, assim como os intermediários isotopicamente marcados formados a partir da incorporação do aminoácido [2-<sup>13</sup>C]-Phe marcado. Os extratos, obtidos a partir da reação enzimática com fenilalanina (controle) e os extratos referentes à reação utilizando o substrato isotopicamente enriquecido com as células ressuspensas de *P. brasilianum*, descritos anteriormente, foram analisados no modo *full scan* de aquisição com ionização por ESI no modo negativo. Os experimentos foram realizados nas condições de ionização otimizadas para o padrão de ácido cinâmico.

Na figura 4.95 a seguir visualiza-se o cromatograma de ions selecionados para cada um dos intermediários biossintéticos das brasiliamidas obtidos nas análises de HRMS. Como observado na figura, verifica-se no experimento controle, a formação dos compostos, ácido cinâmico, ácido p-cumárico ( $m/z$  163.0396  $\Delta=4.0$  ppm), ácido caféico ( $m/z$  179.0344  $\Delta=3.3$  ppm), ácido ferúlico ( $m/z$  193.0501  $\Delta=2.9$  ppm), e ácido sináptico ( $m/z$  223.0605  $\Delta=1.9$  ppm) através da observação da massa experimental com erros menores que 4 ppm quando comparados às massas teóricas, o que é aceitável e deixa comprovado a formação dos intermediários biossintéticos e consequente biossíntese das brasiliamidas via o mesmo caminho dos fenilpropanóides encontrados em plantas.

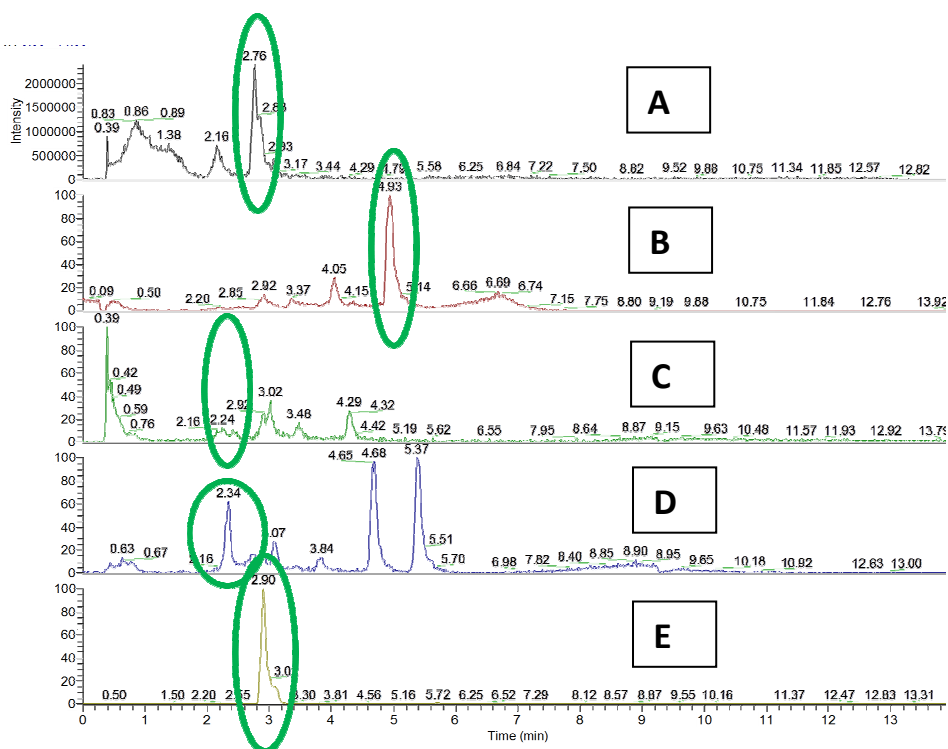


FIGURA 4.95 - Cromatograma de íons extraídos dos intermediários biossintéticos (A) ácido cinâmico, (B) ácido p-cumárico, (C) ácido cafeico, (D) ácido ferúlico e (E) ácido sináptico.

Em seguida, foram realizados experimentos de íons produtos de cada um dos intermediários para determinação e comprovação estrutural. As fragmentações características de ácidos carboxílicos, com perdas de 44 unidades de massa correspondente a saída de uma molécula de  $\text{CO}_2$ , observadas em todos os experimentos de MS/MS deixam claro a formação de cada um dos intermediários biossintéticos. Os experimentos foram realizados nas condições de ionização otimizados para o ácido cinâmico e os espectros de íons produtos obtidos para cada íon selecionado, citados anteriormente, podem ser observados abaixo (Figuras 4.96 - 4.99).

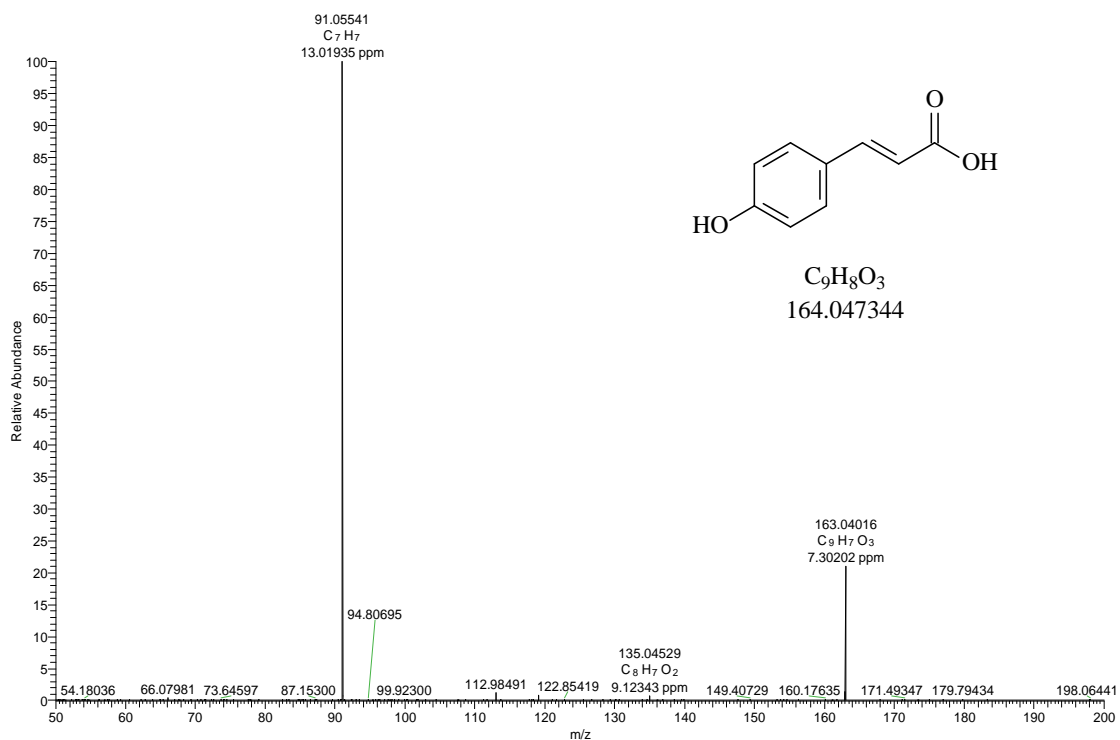


FIGURA 4.96 - Espectro de íons produtos do íon com relação  $m/z$  163.

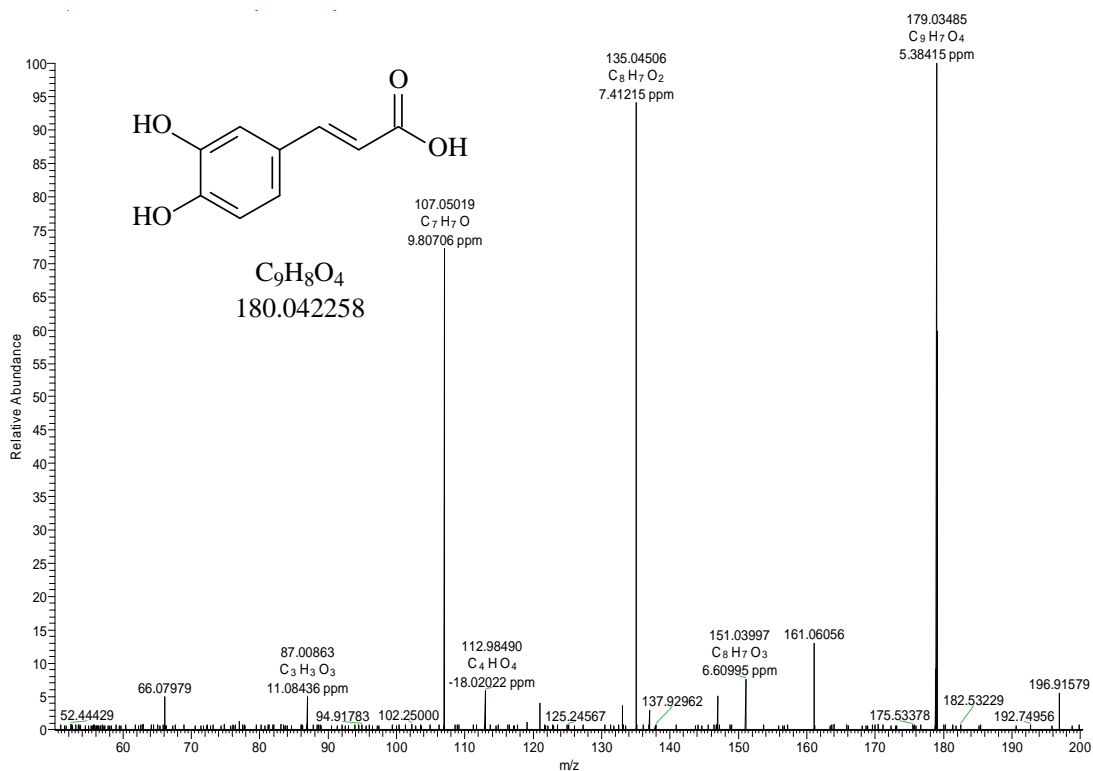


FIGURA 4.97 - Espectro de íons produtos do íon com relação  $m/z$  179.

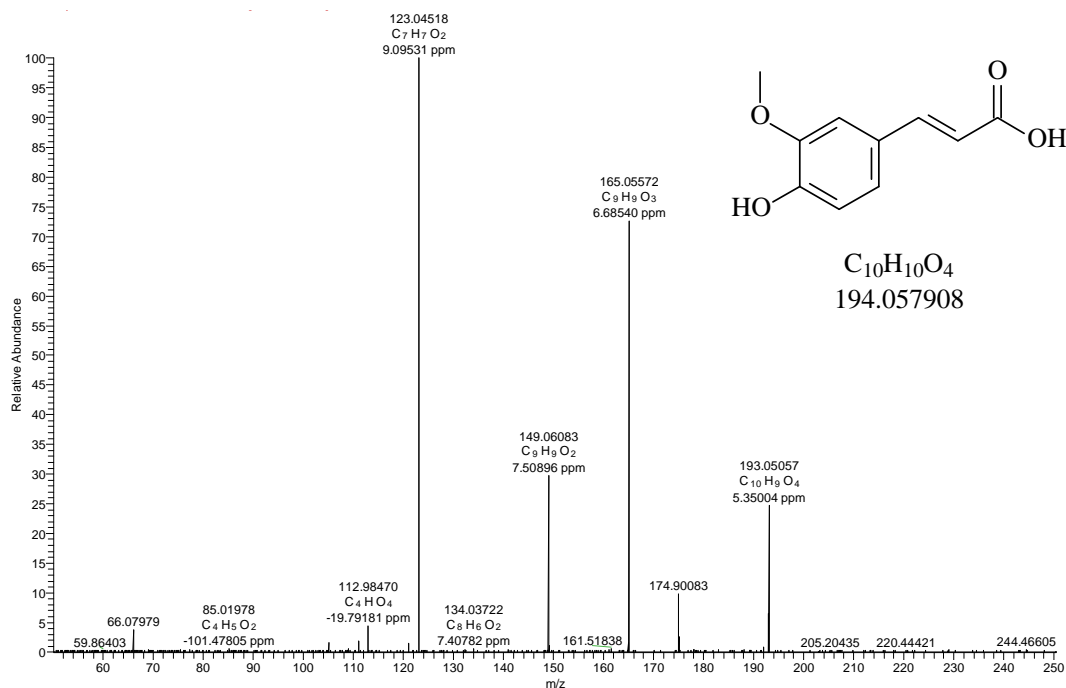


FIGURA 4.98 - Espectro de íons produtos do íon com relação  $m/z$  193.

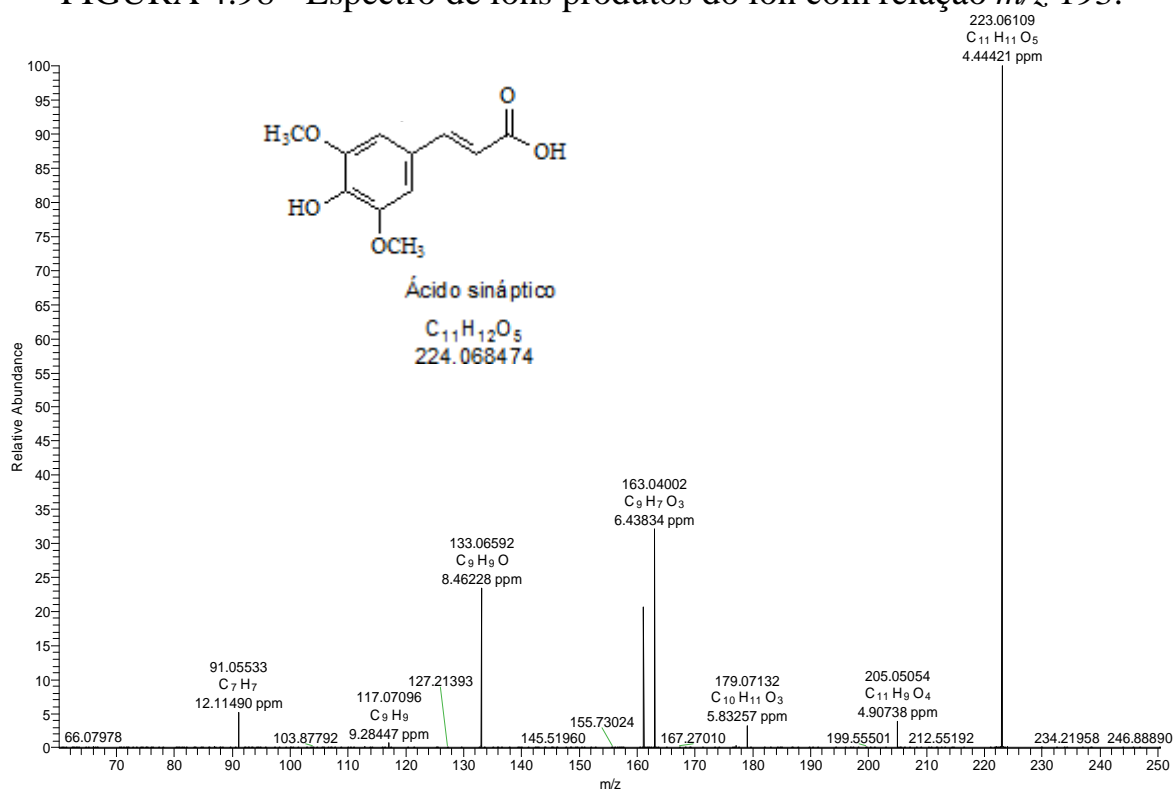


FIGURA 4.99 - Espectro de íons produtos do íon com relação  $m/z$  222.

As análises dos experimentos dos extratos referentes à reação utilizando o substrato isotopicamente enriquecido com as células ressuspensas de *P. brasilianum* indicaram a incorporação da [2-<sup>13</sup>C]-Phe na estrutura

molecular dos dois primeiros intermediários biossintéticos, o ácido cinâmico e o ácido p-cumárico, assim como do ácido sináptico, o último derivado de ácido cinâmico produzido, como visualizado através da incorporação de uma unidade de massa observada nos espectros quando comparado aos espectros do experimento controle (Células + fenilalanina) como verificado na figura 4.100, 4.101 e 4.102 a seguir.

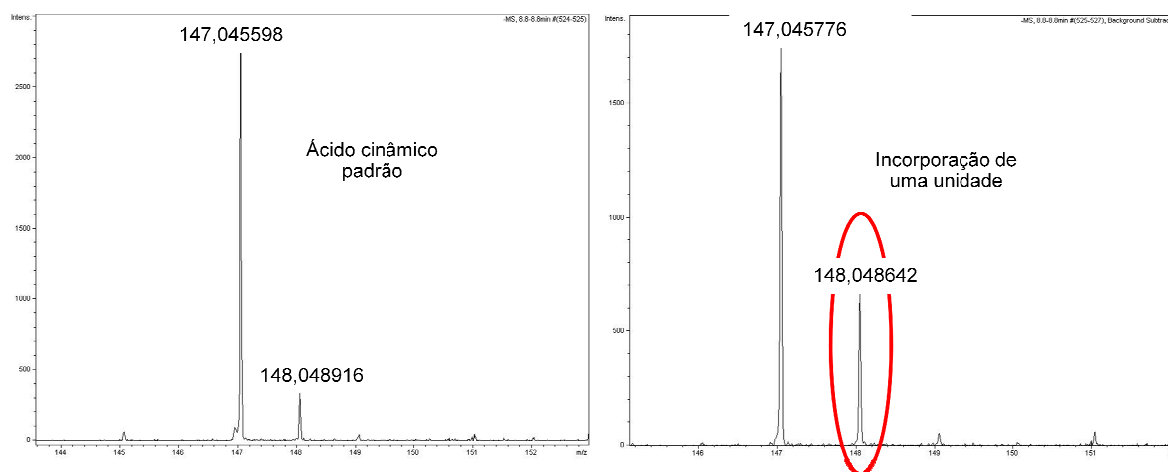


FIGURA 4.100 - Espectro de massas do ácido cinâmico padrão e ácido cinâmico formado a partir da reação das células de *P. brasilianum* com [2-<sup>13</sup>C]-Phe em tampão, respectivamente.

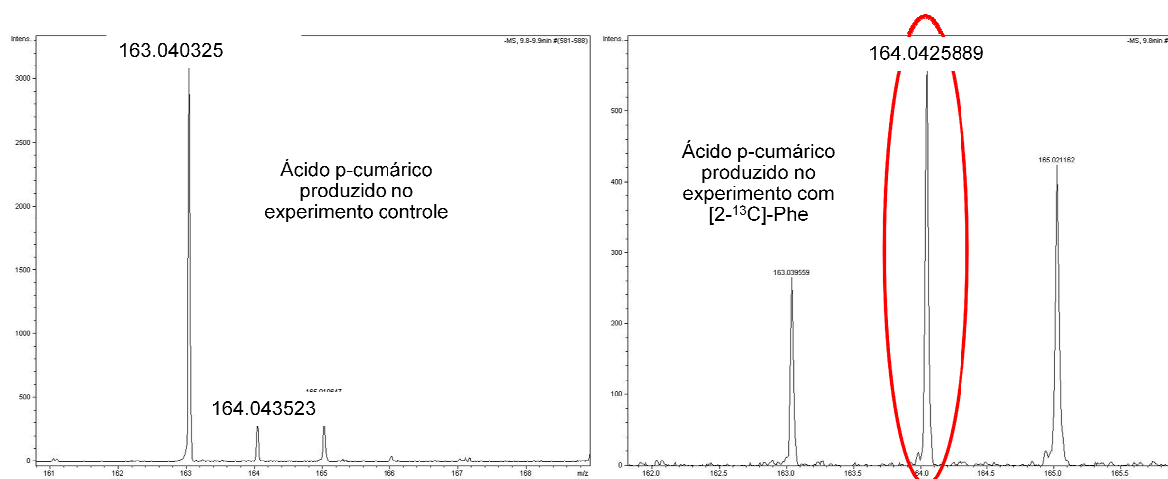


FIGURA 4.101 - Espectro de massas do ácido p-cumárico produzido no experimento controle (células+ Phe) e ácido p-cumárico formado a partir da reação das células de *P. brasilianum* com [2-<sup>13</sup>C]-Phe em tampão, respectivamente.

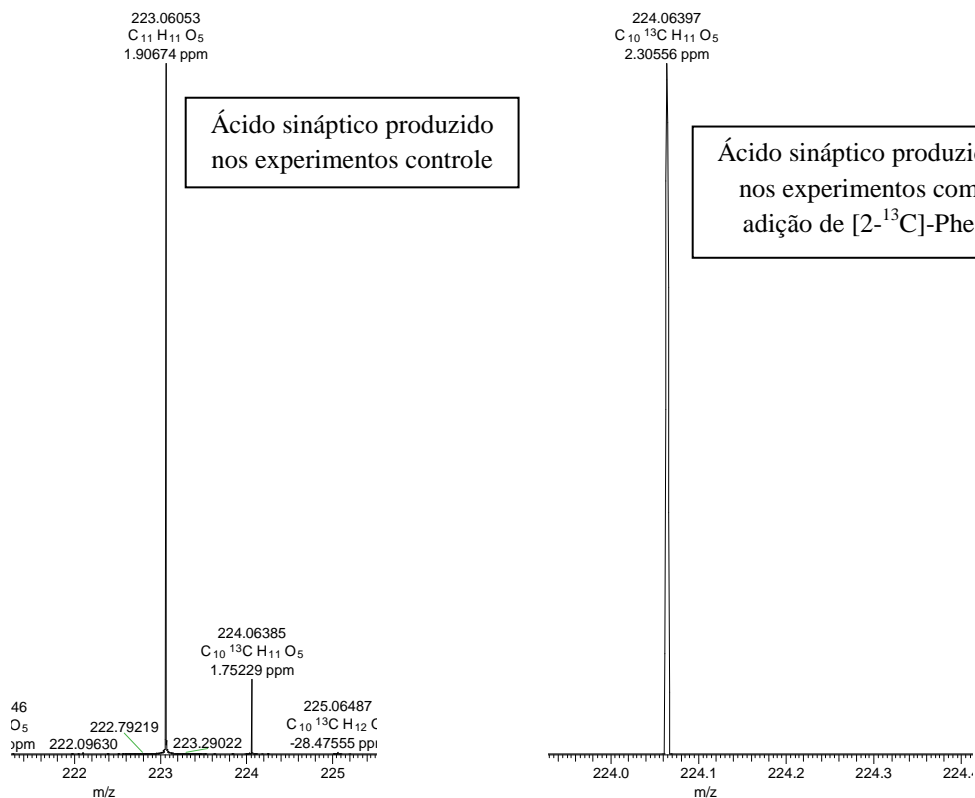


FIGURA 4.102 - Espectro de massas do ácido sináptico produzido no experimento controle (células+ Phe) e ácido p-cumárico formado a partir da reação das células de *P. brasiliense* com [2-<sup>13</sup>C]-Phe em tampão, respectivamente.

Os experimentos por HRMS se mostraram eficientes na visualização da formação de intermediários isotopicamente marcados nas reações com as células ressuspensas em tampão quando adicionado o aminoácido isotopicamente marcado. A partir dos experimentos realizados, visualizou-se a rota biossintética das brasiliamidas a partir de duas unidades do aminoácido L-fenilalanina. A incorporação do precursor Phe na estrutura química dos três intermediários biossintéticos das brasiliamidas comprova a biossíntese via fenilpropanóides. A produção destes compostos indica que as enzimas PAL, CAH e OMT estão ativas e agem no substrato adicionado. Dessa maneira, os resultados estão de acordo com os estudos biossintéticos das amidas bis-fenilpropanoídicas publicados por FILL et al. (2010).

A principal classe de metabólitos micromoleculares produzidos por plantas da família Meliaceae consiste em triterpenos modificados denominados limonóides, sendo a azadiractina a mais descrita devido as suas características inseticidas. Em *Melia azedarach* os limonóides estão concentrados nas raízes e parecem ser majoritários no metabolismo secundário da planta (SANTOS, 2003). Alguns compostos como  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -amirina, ácido ursólico, ácido benzóico, ácido 3,5dimetóxicbenzóico, triterpenos tirucalanos e esteróides foram recentemente isolados da planta *Melia azedarach* (SANTOS, 2003).

Neste sentido, a planta *Melia azedarach*, hospedeira deste fungo foi avaliada no intuito de se verificar a presença de enzimas relacionadas aos fenilpropanóides, principalmente a enzima PAL e verificar alguma possível correlação a nível enzimático entre estes organismos, o que poderia indicar uma possível interação genética entre eles.

A extração enzimática das folhas da planta *Melia azedarach* seguiu o procedimento descrito no item 3.4.40. Avaliou-se em seguida a produção da enzima PAL nas folhas de *Melia* através da realização de ensaios enzimáticos visando a produção de ácido cinâmico. Os cromatogramas obtidos para as análises dos ensaios enzimáticos utilizando o extrato bruto das folhas de *Melia azedarach* são observados na figura 4.103 abaixo.

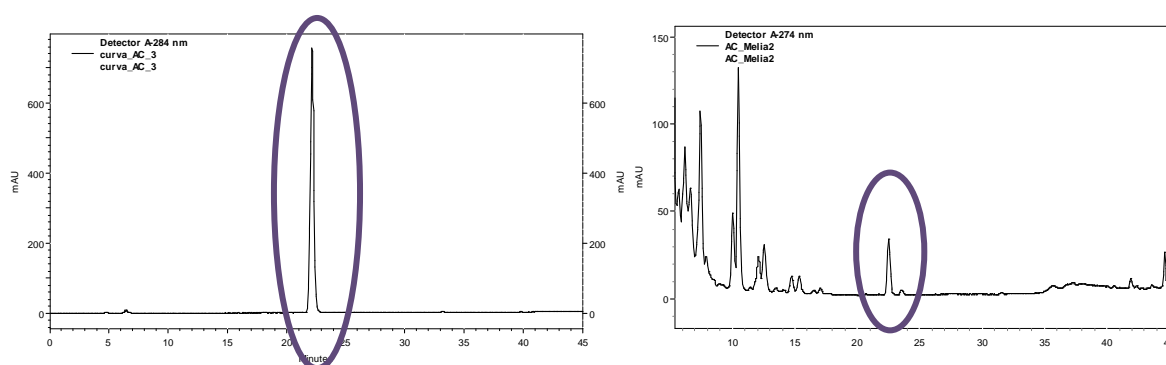


FIGURA 4.103 - Cromatogramas referentes ao padrão de ácido cinâmico e a reação enzimática com o extrato enzimático obtido das folhas de *Melia azedarach*.

Com base nos cromatogramas obtidos, visualiza-se a produção do ácido cinâmico (comparado ao ácido cinâmico padrão) e conseqüentemente comprovou-se a produção da enzima PAL pela planta. Na literatura não existem relatos da produção da enzima Fenilalanina amônia-liase (PAL) na planta *Melia azedarach* e, portanto, a descrição da enzima é inédita na literatura.

#### 4.6 - Estudo da produção de brasiliamidas sob a influência de fatores de estresse

A rota biossintética envolvendo a produção de fenilpropanóides é ativa em plantas superiores e está envolvida principalmente em mecanismos de defesa. A enzima PAL é a principal responsável pela resposta a estresses bióticos e abióticos nas plantas. A figura 4.104 resume os diferentes fenilpropanóides induzidos em plantas a partir de estresses bióticos e abióticos. Muitos fenilpropanóides induzidos são classificados como fitoalexinas, compostos antimicrobianos sintetizados em resposta ao ataque de um determinado patógeno. Entre as fitoalexinas são descritos pterocarpanas, isoflavanas, isoflavonóides prenilados, estilbenos, cumarinas, 3-deoxiantocianidinas, flavonols, e auronas (DIXON & PAIVA, 1995).

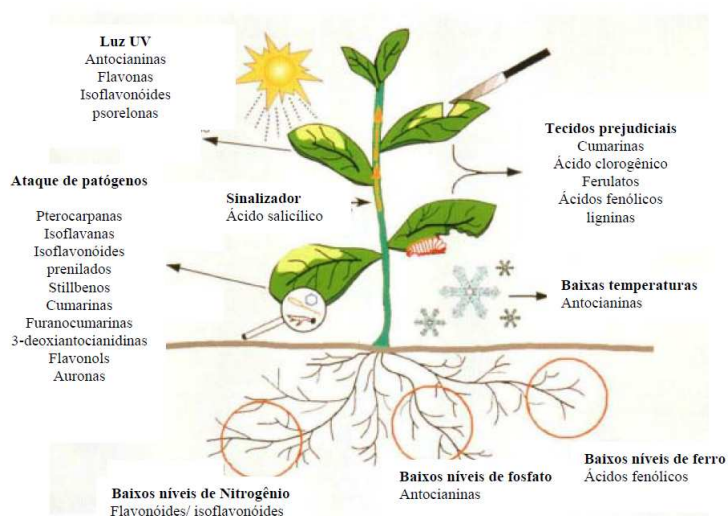


FIGURA 4.104 - Exemplo de fenilpropanóides produzidos pela planta como defesa dos estresses bióticos e abióticos mencionados (Adaptado de DIXON & PAIVA, 1995).



Baseado em todas estas observações e com o objetivo de avaliar a produção de brasiliamidas, fenilpropanóides produzidos por *P. brasilianum*, o fungo foi cultivado sob diferentes condições de estresse já relatados em plantas, visando entender um pouco melhor a produção de fenilpropanóides em fungos e sua relação com fatores de estresse. Os fatores de estresse ao fungo *P. brasilianum* avaliados no experimento foram exposição diária do fungo a luz UV (Fator 1); estresse mecânico (Fator 2); baixa concentração de íons  $\text{Fe}^{2+}$  (Fator 3) e baixa concentração de íons  $\text{PO}_4^{3-}$  (Fator 4), todos os fatores de estresse testados são relatados como estímulos à produção de fenilpropanóides descritos plantas.

Para este propósito, o fungo *P. brasilianum* foi cultivado em triplicata em meio sólido Czapeck com composições diferentes de acordo com o fator de estresse estudado e três frascos foram mantidos como controle para posterior comparação quantitativa. Em seguida, os extratos referentes ao experimento proposto foram analisados via HPLC/UV-MS/MS, cujas condições foram otimizadas em estudos anteriores e são descritas no item 3.4.4, para posterior avaliação quantitativa da produção de brasiliamidas quando o fungo foi submetido aos fatores de estresse em estudo. Os halos de crescimento também foram medidos e são levados em consideração nas análises.

Com o conhecimento dos íons selecionados na transição dos experimentos de SRM otimizados em estudos anteriores, analisaram-se cada um dos experimentos propostos no intuito de entender a relação entre produção de brasiliamidas e fatores de estresse impostos ao fungo. A partir dos valores de áreas gerados a partir da integração das bandas referentes à brasiliamida A nos extratos, construiu-se um gráfico de comparação entre a produção de brasiliamida A no experimento controle e quando nos experimentos submetidos a fatores de estresse conforme visualizado na figura 4.105 abaixo.

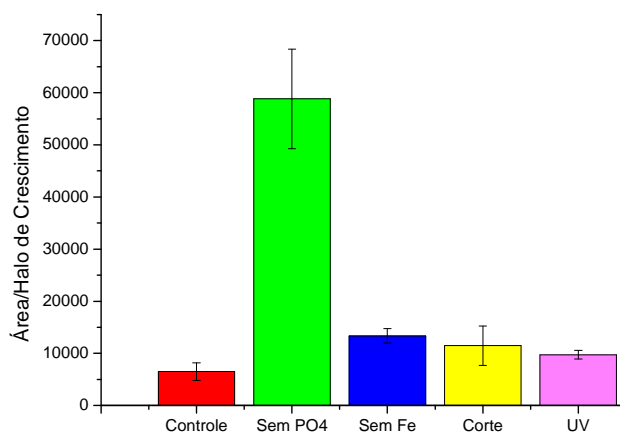


FIGURA 4.105 - Gráfico que indica a produção da substância brasiliamida A (área da banda cromatográfica/ halo de crescimento) quando o fungo foi submetido a fatores de estresse.

A partir dos valores avaliados nas triplicatas das áreas referentes à substância brasiliamida A nos experimentos com diferentes estímulos de estresse, em comparação à produção deste metabólito no experimento controle sob condições padrões de cultivo, determinou-se que todos os fatores de estresse testados exercem certa influência sobre a produção de brasiliamida A conforme visualizado na figura 4.105 acima.

O estresse mecânico ao fungo representado através de cortes ao fungo durante o seu desenvolvimento pareceu resultar em estímulo a produção de brasiliamida A, conforme se observa no gráfico a maior produção de brasiliamida A neste experimento quando comparado ao controle. A diminuição da concentração dos ions  $Fe^{2+}$  e  $PO_4^{3-}$  no meio de cultura também resultou em estímulo a produção de brasiliamida A pelo fungo *P. brasilianum* conforme observado na figura 4.105 acima. A presença de luz UV pareceu inibir o crescimento do fungo, entretanto, uma vez que os halos de crescimento foram considerados, visualiza-se incremento da produção de brasiliamida A nos experimentos de exposição à luz UV.

O experimento representou uma estimativa da produção de

brasiliamida A quando o fungo era submetido a fatores de estresse. É importante ressaltar que nenhum processo de validação foi realizado, e, portanto, os números apresentados representam apenas uma estimativa da produção de brasiliamida A.

Os resultados parecem deixar claro que exista uma relação entre a produção de brasiliamida A quando o fungo é submetido a situações de estresse. A presença de grande número de genes que codificam enzimas da rota dos fenilpropanóides em fungos, têm gerado muitas discussões entre os pesquisadores no intuito de identificar e caracterizar a função destes genes e ainda, determinar a função de possíveis fenilpropanóides fúngicos produzidos. Uma vez que fenilpropanóides sintetizados por plantas contribuem na resistência a patógenos e barreiras físicas (luz UV, baixas temperaturas, etc.), fenilpropanóides fúngicos também podem de alguma forma atuar na defesa destes organismos e ainda refletir um processo evolucionário.

#### **4.7 - Análises do genoma do fungo *P. brasilianum***

O genoma do micro-organismo em estudo foi inicialmente sequenciado utilizando a plataforma Solexa da Illumina. O processo de *assembly* do genoma foi realizado em parceria com o Dr. Makiyan Samborsky, especialista em bioinformática do grupo de Biossíntese de Policetídeos Antibióticos, no Departamento de Bioquímica da Universidade de Cambridge. A partir do *assembly* inicial, determinou-se o tamanho do genoma em aproximadamente 32,690,287 bp e o número de *contigs* final em 5263 com tamanhos que variavam entre 150 kbp - 1 bp. Embora os resultados obtidos tenham gerado informações relevantes, a utilização de outra plataforma de sequenciamento se fez necessária afim de reduzir o número total de *contigs* o que significaria, conseqüentemente, maior informação genética associada ao *contig*. Em estudos posteriores, o genoma do fungo *P. brasilianum* foi sequenciado utilizando a plataforma 454 FLX da Roche. Os dados obtidos a partir de ambos os sequenciamentos foram

submetidos a novo *assembly* agora em parceria com a pesquisadora Louise Cerdeira Teixeira do Instituto Fleury - São Paulo. O *assembly* final gerou 252 *supercontigs* com tamanhos entre 1,03 Mbp e 501 bp incluindo 105 *contigs* maiores do que 100 kbp e 98 *contigs* maiores do que 5 kbp satisfazendo com sucesso os objetivos propostos inicialmente com o sequenciamento do organismo.

Seguindo o pipeline descrito pelo Instituto US DOE Joint Genome para a anotação de genomas de organismos eucarióticos, o primeiro passo foi submeter os 252 *contigs* ao software RepeatMasker que busca elementos repetitivos no genoma. Em seguida, todos os *contigs* foram submetidos a softwares de predições de genes, como Augustus (<http://bioinf.uni-greifswald.de/webaugustus/index.gsp>) treinado com o genoma do fungo *Aspergillus nidulans* e FGENESH treinado com o genoma de *Penicillium chrysogenum*, ambos softwares desenhados para predição gênica de genomas de organismos eucarióticos. De acordo com as predições obtidas, foram detectadas 10.478 ORFs no genoma do fungo as quais foram submetidas a análises de *Blastp* (*score* > 50) contra uma base de dados não-redundante (NCBI) para anotação.

Os resultados referentes as análises de *Blastp* foram bastante satisfatórios conforme verificado nas estatísticas obtidas. No gráfico mostrado na figura 4.106 abaixo, visualiza-se que entre as 10.478 ORFs previstas no genoma de *P. brasilianum*, a grande maioria apresentou similaridade nas análises com proteínas de outros organismos, enquanto que aproximadamente 150 ORFs não indicaram resultados de *blastp* correspondentes. Sequências codificadoras de proteínas previstas pelas análises cobrem cerca de 98% do genoma do fungo estudado, e 70% dos resultados de similaridade obtidos pelas análises de *blastp* apresentaram comprimento médio das ORFs de 500 pb, conforme observado no gráfico apresentado na figura 4.107.

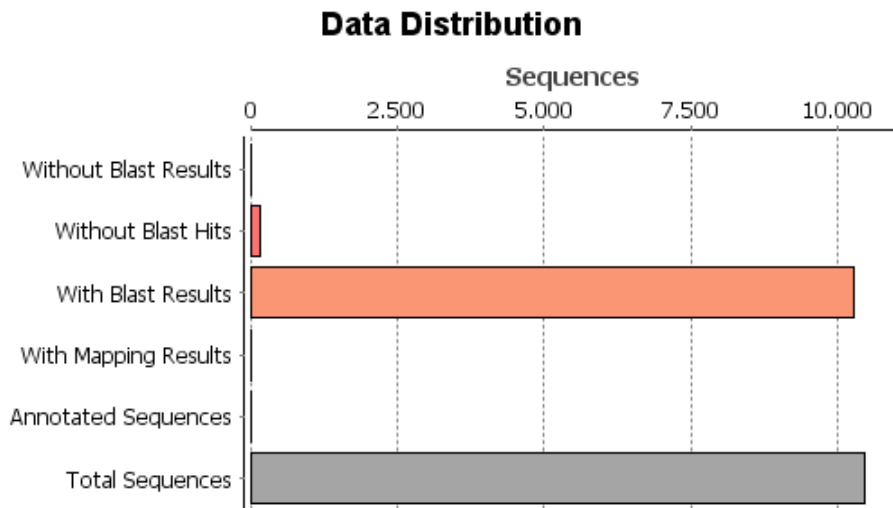


FIGURA 4.106 - Grafico indicando a distribuição dos resultados de *blastp*.

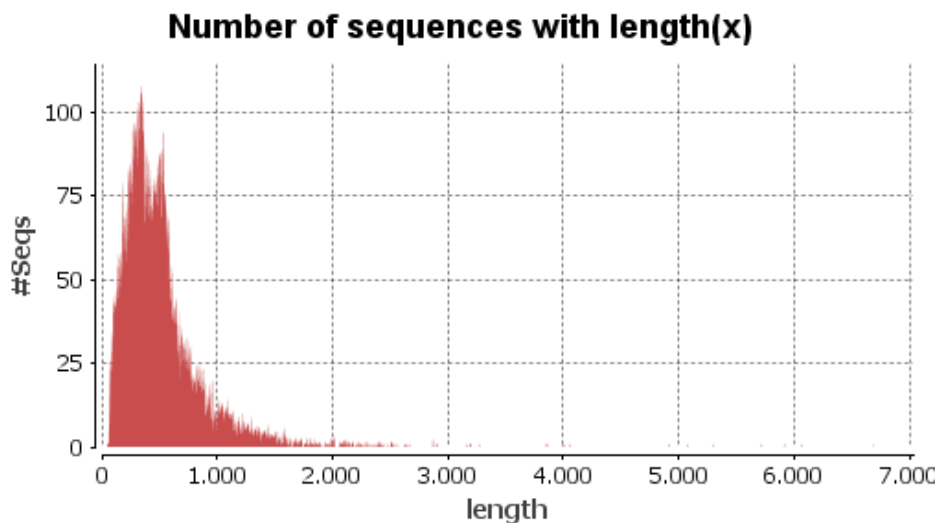


FIGURA 4.107- Gráfico indica o comprimento médio das sequencias com similaridade nas análises de *blastp*.

A partir das análises verificou-se a distribuição de similaridade dos *hits* obtidos nas análises de *blastp* (Figura 4.108), indicando que a maioria dos genes de *P. brasilianum* tiveram *hits* com alta similaridade, entre 70 e 90%, com proteínas de outros organismos. Assim como verificou-se que a distribuição da maioria dos *hits* de proteínas se deu com organismos do gênero *Penicillium*, em particular a maioria dos *hits* positivos foram com o fungo *P. oxalicum*, conforme visualizado na figura 4.109 abaixo.

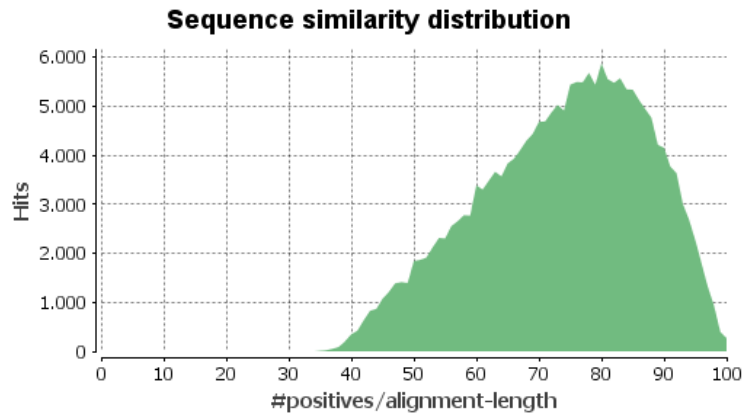


FIGURA 4.108 - Distribuição de similaridade nas sequencias nas análises de *blastp*.

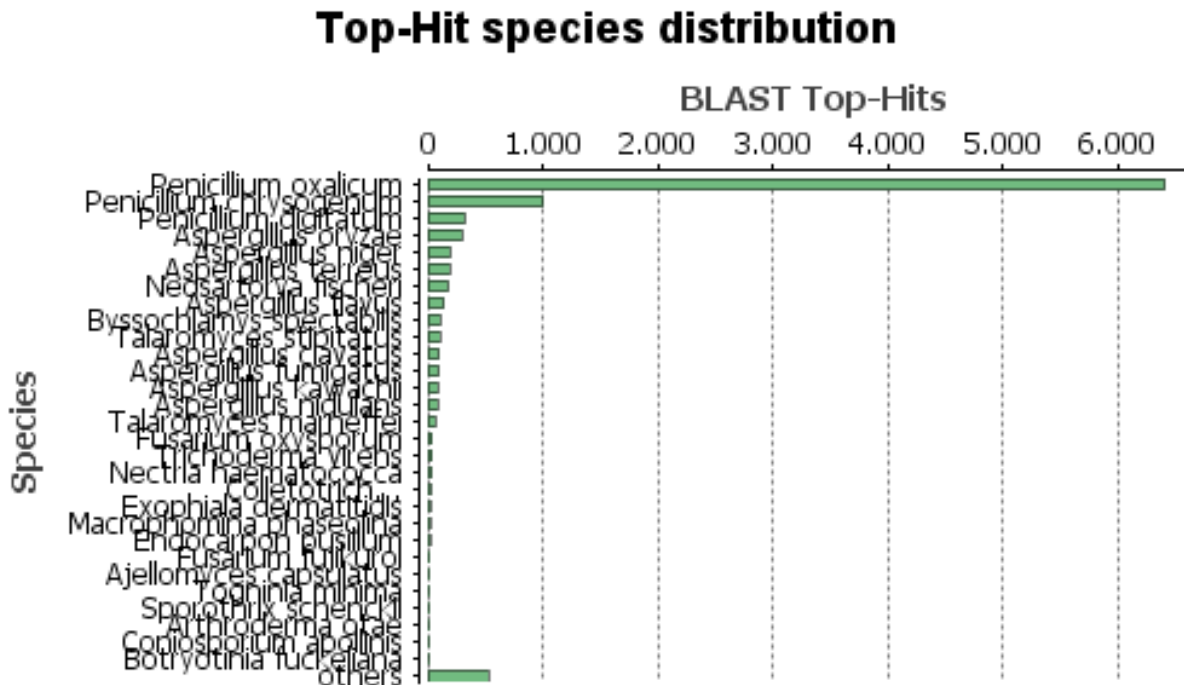


FIGURA 4.109 - Distribuição das espécies nos hits encontrados nas análises de *blastp*.

A anotação funcional foi realizada com o software Blast2go, onde foram anotadas aproximadamente 6500 sequencias codificadoras de proteínas das 10.478 ORFs submetidas a anotação previstas no genoma do fungo *P. brasilianum*, conforme visualizado na estatística apresentada no gráfico apresentado na figura 4.110 abaixo.

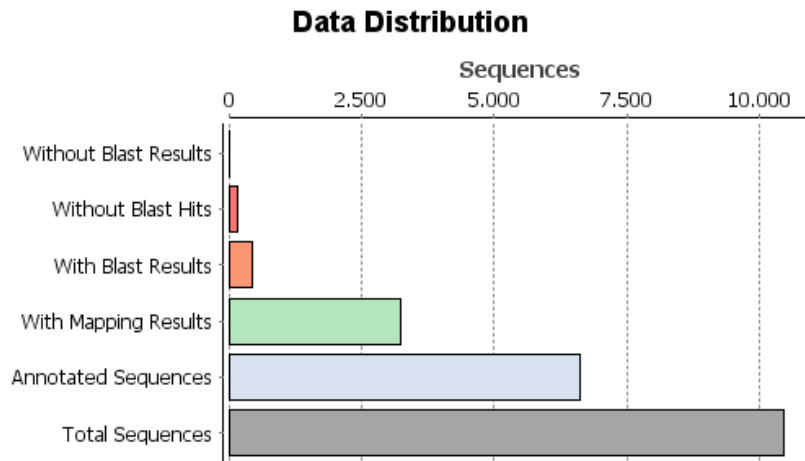


FIGURA 4.110 - Distribuição dos dados obtidos nas análises de *blastp* e anotação do genoma.

As sequencias codificadoras de proteínas encontradas no genoma do fungo puderam ser relacionadas à sua função, onde proteínas de ligação e atividade catalítica são os maiores subgrupos apresentados relacionados a função molecular dos proteínas avaliadas, conforme observado no gráfico 4.111 abaixo. Todas as ORFs anotadas pelo software Blast2go foram mapeadas utilizando o banco de dados KEGG afim de definir as vias metabólicas celulares envolvendo os genes anotados. Foram atribuídas 126 diferentes rotas metabólicas às ORFs anotadas no genoma de *P. brasilianum*.

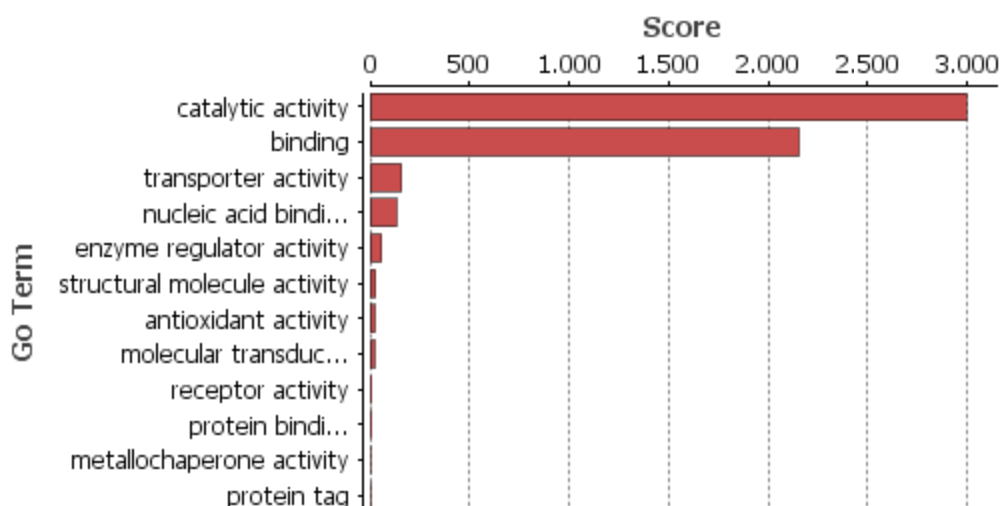


FIGURA 4.111 - Gráfico de distribuição das funções moleculares encontradas nas análises.

Analises das vias metabólicas envolvidas no metabolismo secundário de *P. brasilianum* baseadas na sequencia do genoma sequenciado também puderam ser realizadas. Os 252 *contigs* foram submetidos ao software antismash que permite uma rápida identificação, anotação e análise de clusteres biossintéticos de metabólitos secundários em genomas bacterianos e fungicos. Uma análise preliminar do genoma do fungo *P. brasilianum* indicou 69 possíveis clusteres biossintéticos, sendo 11 clusteres relacionados a biossíntese de compostos policetídeos via enzimas PKS tipo I; 12 diferentes clusteres envolvidos na produção de metabólitos secundários formados via enzimas do tipo NRPS. Foram detectados ainda, 6 clusteres biossintéticos híbridos, entre eles o híbrido NRPS-terpeno responsável pela biossíntese de alcalóides do tipo ergot como a verruculogenina e verruculogenina TR-2, metabólitos isolados e caracterizados em estudos anteriores (FILL, 2009), o que indica confiabilidade das análises genéticas. O cluster biossintético sugerido pelo software antismash para a produção de alcalóides do tipo ergot pode ser visualizado na figura 4.112, onde observa-se acima o cluster putativo em *Penicillium brasilianum*, assim como a descrição dos módulos da enzima NRPS presente no cluster. Abaixo, na mesma figura, observa-se os clusteres de genes homólogos descritos em outros organismos.



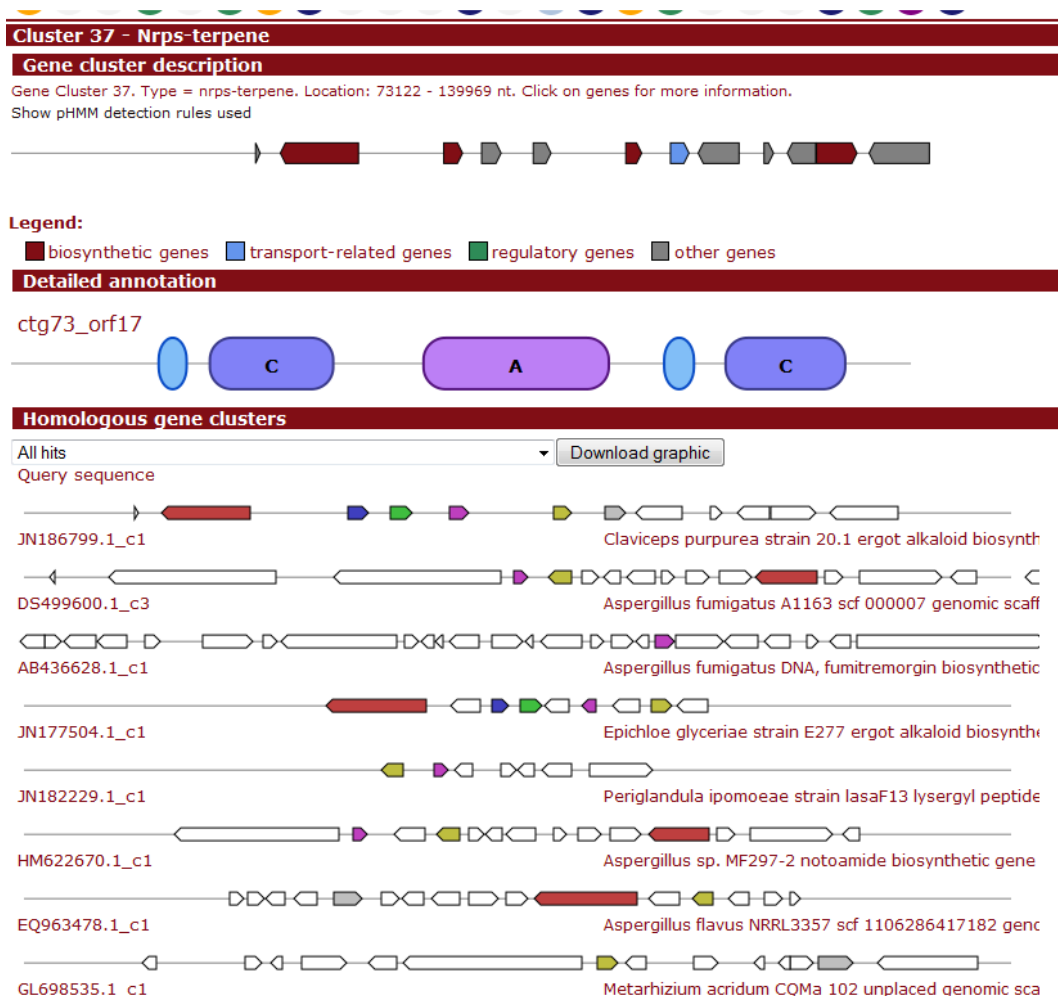


FIGURA 4.112 - Cluster biossintético putativo de alcalóides do tipo ergot dado pelo software antismash.

Outros potenciais clusters biossintéticos foram detectados no genoma do fungo *P. brasilianum*, sendo que alguns destes clusters parecem indicar a biossíntese de metabolitos secundários até então não descritos para esta espécie, sendo a investigação destes clusters muito interessante visando a descrição de novos produtos naturais potencialmente bioativos através da abordagem de *genome mining* (HERTWECK, C. & SCHERLACH, K., 2009). Neste sentido, observou-se a presença de um possível cluster híbrido terpeno-PKS tipo I que indicou a formação de compostos do tipo viridicatumtoxina, um policetídeo com interessantes atividades biológicas que se assemelha estruturalmente a tetraciclinas, compostos nunca descritos no fungo *Penicillium brasilianum* isolado no grupo LaBioMMi, conforme apresentado na figura 4.113 abaixo.

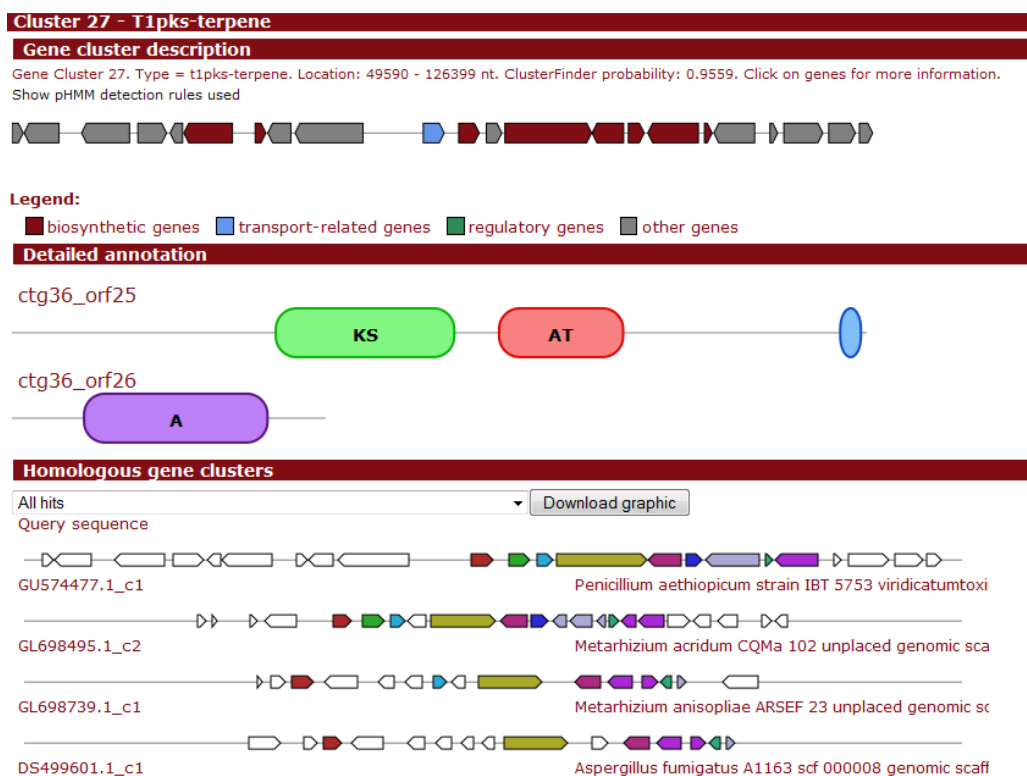


FIGURA 4.113 - Cluster biossintético putativo de viridicatumtoxina dado pelo software antismash.

Buscas na literatura interessantemente indicaram, que recentemente INOKOSHI et al. (2013) ao analisar os extratos etanólicos de *Penicillium brasilianum* FKI-3368 dois compostos foram isolados e caracterizados, um deles, um composto novo designado espirohexalina e também a viridicatumtoxina (Figura 4.114). Ambos os compostos apresentam uma estrutura hexaciclina produzidas pela fusão de um anel do tipo tetraciclina com um anel do tipo spiro. Os pesquisadores ainda descrevem a inibição da enzima UPP sintase bacteriana (undecaprenil pirofosfato sintase) por ambos os compostos isolados com valores de IC<sub>50</sub> de 9.0 e 4.0 μM, respectivamente. E portanto, as análises genéticas indicam o potencial metabólico do fungo *P. brasilianum* em produzir compostos estruturalmente semelhantes a viridicatumtoxina, até então nunca detectados no fungo em estudo. O cluster biossintético destes metabólitos é inédito em *Penicillium brasilianum*.

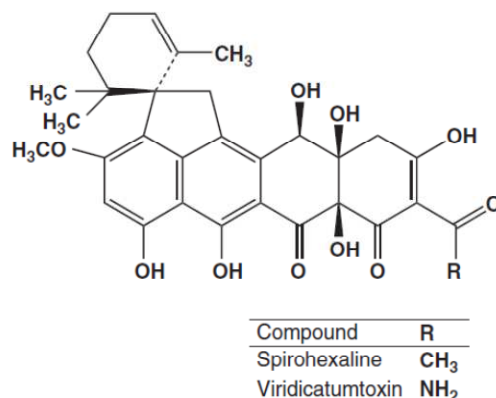


FIGURA 4.114 - Estruturas químicas dos compostos espirohexalina e viridicatuntoxina (Extraído de INOKOSHI et. al, 2013).

Estudamos a habilidade de produção de viridicatuntoxina em *Penicillium brasilianum* isolado como endofítico de *Melia azedarach*, alvo de estudo do trabalho, através de análises por HRMS dos extratos obtidos do cultivo do fungo em BDA. Conforme observamos na figura 4.115 abaixo, o fungo foi apto na produção deste metabólito devido a produção de um metabólito secundário com  $m/z$  564 ( $[M-H]^-$ ) e formula molecular  $C_{30}H_{31}NO_{10}$  com erro baixo (3 ppm), atestando a produção de viridicatuntoxina pelo fungo e iniciando os primeiros estudos de *genome mining* no grupo. Dessa maneira, abrindo a possibilidade de inúmeros projetos de pesquisa futuros no grupo LaBioMMi.

coculti\_controlPDA\_PB67 #152-158 RT: 6.46-6.71 AV: 7 NL: 5.17E5  
 F: FTMS - p ESI Full ms [150.00-850.00]

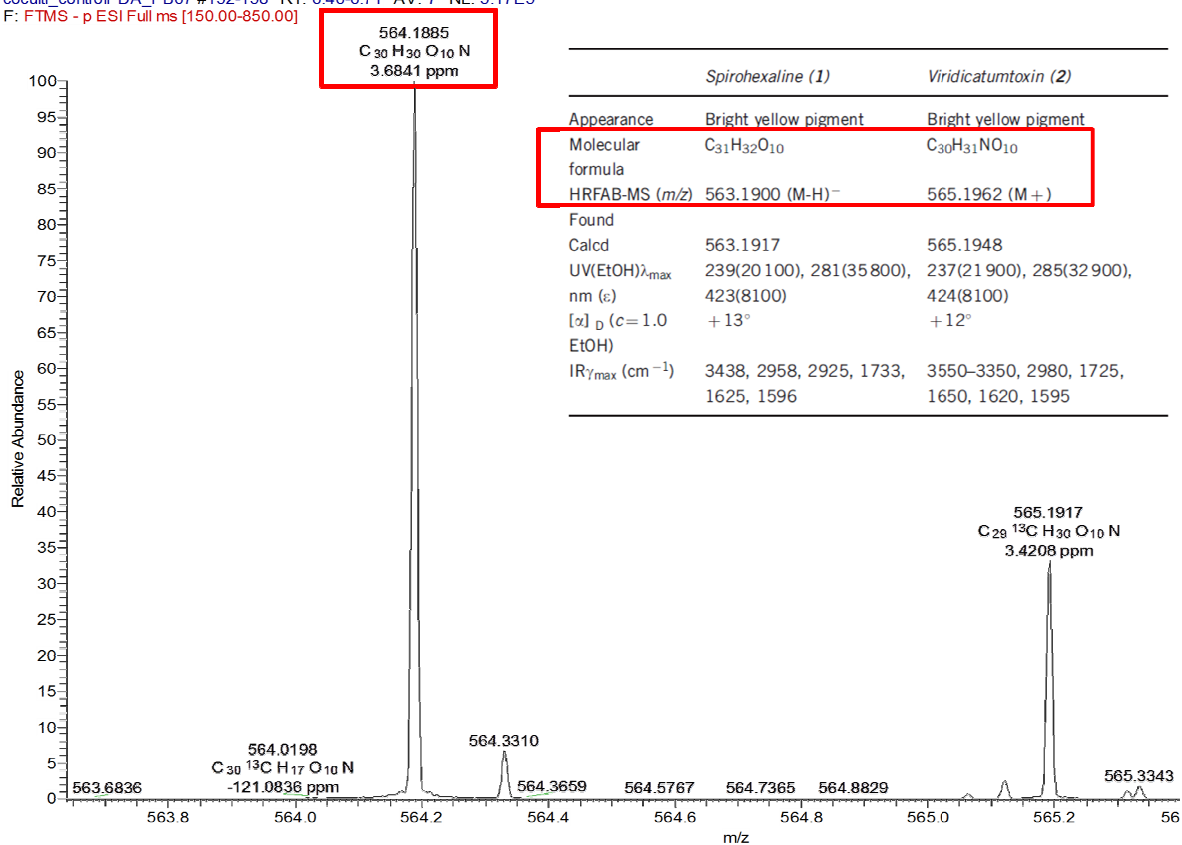


FIGURA 4.115 - Espectro de massas HRMS obtido para a substância viridicatuntoxina produzida pelo fungo *P. brasilianum* estudado no trabalho.

## 5 - Conclusões

. Concluiu-se que o fungo *Penicillium brasilianum* produz metabólitos secundários via rota biossintética dos fenilpropanóides, metabólitos raros e inéditos em micro-organismos que apresentam inúmeras atividades biológicas interessantes. A biossíntese das amidas bis-fenilpropanoídicas foi comprovada através de análises por HRMS, onde se verificou a produção dos intermediários biossintéticos (ácido cinâmico, ácido p-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico e ácido sináptico) a partir da adição de L-fenilalanina as células do micro-organismo ressuspensas em tampão

Estudos *in vitro* da enzima Fenilalanina amônia-liase nativa, primeira enzima envolvida na via dos fenilpropanóides purificada através de diferentes técnicas cromatográficas, indicou grande promiscuidade da enzima frente a todos os substratos avaliados. A biossíntese das amidas bis-fenilpropanoídicas foi avaliada *in vivo* através da adição de diferentes aminoácidos halogenados no meio de cultura, uma vez que a PAL mostrou-se ativa frente a estes substratos. Visualizou-se a produção de cada um dos aminoácidos adicionados N-acetilados, a caracterização foi baseada em dados de RMN 1D e 2D e MS. A produção de brasiliamidas halogenadas não foi observada.

Concluiu-se através de estudos de inibidores enzimáticos frente a enzima PAL que o  $\text{CuCl}_2$  inibe 99,9% da atividade da enzima e estudos *in vivo* com este inibidor indicaram abolição da produção de brasiliamidas indicando o envolvimento da enzima de interesse na rota biossintética das brasiliamidas e consequente comprovação de fenilpropanóides fúngicos.

O genoma do fungo *P. brasilianum* foi sequenciado em parceria com a unidade de seqüenciamento da Universidade de Cambridge, Reino Unido

e através de estudos de bioinformática pode-se determinar o gene que codifica a PAL e a partir de então se realizaram extensos estudos envolvendo biologia molecular levando a clonagem e expressão da proteína recombinante. Conclui-se que o vetor pETSUMO levou a expressão da proteína recombinante em maiores concentrações na fase aquosa, como desejado, assim como a cepa de *E. coli* BL21 (DE3) apresentou melhores resultados de expressão. Dessa maneira, determinaram-se as melhores condições de expressão para a enzima PAL recombinante e esta pode ser obtida com sucesso, em altas concentrações e purificada através de um único passo (coluna de afinidade) por gradiente de pH e obtida em alto grau de pureza comprovado através de eletroforese. A enzima PAL recombinante foi caracterizada com sucesso por espectrometria de massas. Determinou-se os parâmetros de incubação ótimos para a enzima como o pH 8.8, a temperatura em 45°C e o tempo de reação em 3h. A enzima mostrou cinética enzimática micheliana e  $K_m$  igual a 4,88mM.

Os resultados apresentados parecem deixar claro que exista uma relação entre a produção de brasiliamida A quando o fungo é submetido a situações de estresse. A enzima PAL parece estar envolvida em mecanismos de defesa no fungo, assim como já descrito para plantas. O estresse mecânico ao fungo representado através de cortes ao fungo durante o seu desenvolvimento resultou em estímulo a produção de brasiliamida A, assim como a exposição diária a luz UV. A diminuição da concentração dos ions  $Fe^{2+}$  e  $PO_4^{3-}$  no meio de cultura também resultou em estímulo a produção de brasiliamida A pelo fungo *P. brasilianum*.

## Referências Bibliográficas

ACHNINE, L.; BLANCAFLOR, E. B.; RASMUSSEN, S. & DIXON, R. D. “Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis”. *The Plant Cell*, **16**: 3098, 2004.

Antismash - <http://antismash.secondarymetabolites.org/>

BELLER, M.; ECKERT, M.; GEISLER, H. “Efficient chemoenzymatic synthesis of enantiomerically pure  $\alpha$ -amino acids”. *Chem. Eur. J.*, **4**(5): 119, 1998.

BENZ, F. F.; KNIISEL, J.; NUESCH, H.; TREICHLER, W.; VOSER, R. & NYFELER, R. “Metabolites of microorganisms: Echinocandin B, a novel polypeptide-antibiotic from *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus*, isolation and structural components”. *Helv. Chim. Acta*, **57**: 2459, 1974.

BLAST2GO - <http://www.blast2go.com/b2ghome>

BRADFORD, M. M. “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Analytical Biochemistry*, **72**(1-2): 248, 1976.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A. & PALMA, M. S. “Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático”. *Quím. Nova*, **31**(3): 669, 2008.

CASS, Q. B. & DEGANI, A. L. G. *Desenvolvimento de Métodos por HPLC Fundamentos, Estratégias e Validação*. 1.ed. São Carlos, EdUFSCar, 2001. 77 p.

CHALABAEV, S.; TURLIN, E.; BAY, S.; GANNEAU, C.; BRITO-FRAVALLO, E.; CHARLES, J.F.; DANCHIN, A. & BIVILLE, F. “Cinnamic acid, an autoinducer of its own biosynthesis, is processed via hca enzymes in *Photobacterium luminescens*”. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**(6): 1717, 2008.

CZICHI, U. & KINDL, H. “Phenylalanine ammonia-lyase and cinnamic acid hydroxylase as assembled consecutive enzymes on microsomal membranes of cucumber cotyledons: Cooperation and subcellular distribution”. *Planta*, **134**: 133, 1977.

DIXON, R. A. & PAIVA, N. L., “Stress-induced phenylpropanoid metabolism”. *The Plant Cell*, **7**: 1085, 1995.

EMILIANI, G.; FONDI, M.; FANI, R. & GRIBALDO, S. "A horizontal gene transfer at the origin of phenylpropanoid metabolism: a key adaptation of plants to land". *Biol. Direct*, **4**:1, 2009.

EL-ELIMAT, T.; RAJA, H., A.; GRAF, T., N.; FAETH, S., H.; CECH, N., B. & OBERLIES, N., H. "Flavonolignans from *Aspergillus iizukae*, a Fungal Endophyte of Milk Thistle (*Silybum marianum*)". *Journal of natural products*, *in press*.

FILL, T. P.; PEREIRA, G. K.; SANTOS, R. M. G. & RODRIGUES-FILHO, E. "Four additional meroterpenes produced by *Penicillium* sp found in association with *Melia azedarach*: possible biosynthetic intermediates to austin". *Z. Naturforsch.*, **62**(b): 1035, 2007.

FILL, T. P.; SANTOS, R. M. G.; BARRISON, A.; RODRIGUES-FILHO, E. & SOUZA, A. Q. "Co-production of bisphenylpropanoid amides and meroterpenes by an endophytic *Penicillium brasilianum* found in the root bark of *Melia azedarach*". *Z. Naturforsch.*, **64**(c): 355, 2009.

FILL, T. P. Estudos Biossintéticos de Amidas Bisfenilpropanoídicas Produzidas pelo Fungo *Penicillium brasilianum*, um Endofítico de *Melia azedarach* (Meliaceae). São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2009. Dissertação de mestrado, 157 p.

FILL, T. P.; SILVA, B. F. & RODRIGUES-FILHO, E. "Biosynthesis of phenylpropanoid amides by an endophytic *Penicillium brasilianum* found in root bark of *Melia azedarach*". *J. Microbiol. Biotechnol.*, **20**(3): 622, 2010.

FILL, T. P.; ASENHA, H. B.; MARQUES, A. S.; FERREIRA, A. G. & RODRIGUES-FILHO, E. "Time course production of indole alkaloids by an endophytic strain of *Penicillium brasilianum* cultivated in rice". *Nat. Prod. Res.*, **27**(11): 967, 2013.

FUJITA, T.; MAKISHIMA, D.; AKIYAMA, K. & HAYASHI, H. "New convulsive compounds, brasiliamides A and B, from *Penicillium brasilianum* Batista JV-379". *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**(8): 1697, 2002.

FUJITA, T. & HAYASHI, H., "New brasiliamide congeners: brasiliamides C,D and E form from *Penicillium brasilianum* Batista JV-379". *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**(4): 820, 2004.

GOSS, R.; O'HAGAN, D. & COURTIEU, J. "Assay for the enantiomeric analysis of fluoroacetic acid: Insight into the stereochemical course of fluorination during fluorometabolite biosynthesis in *Streptomyces cattleya*". *J. Am. Chem. Soc.*, **125**: 379, 2003.



GUNATILAKA, L. A. A. "Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence". Jour. Nat. Prod., **69**: 509, 2006.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. "Bioactive natural products from endophytes: A review" Applied Biochemistry and Microbiology, **44**(2): 136, 2008.

HERTWECK, C.& SCHERLACH, K. "Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms".Org. Biomol. Chem., **7**:1753, 2009.

HYUN, M. W.; YUN, Y. H.; KIM, J. Y. & KIM, S. H. "Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase". Mycobiology, **39**(4): 257, 2011.

HRAZDINA, G. & JENSEN, R. A. "Spatial organization of enzymes in plant metabolic pathways". Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., **43**: 241, 1992.

INOKOSHI, J.; NAKAMURA, Y.; HONGBIN Z.; UCHIDA, R.; NONAKA, K.; MASUMA, R. & TOMODA, H. "Spirohexalines, new inhibitors of bacterial undecaprenyl pyrophosphate synthase, produced by *Penicillium brasilianum* FKI-3368" The Journal of Antibiotics, **66**: 37, 2013

ISHI, K.; MARUYAMA, J.; JUVVADI, P. R.; NAKAJIMA, H. & KITAMOTO, K. "Visualizing nuclear migration during conidiophore development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus oryzae*: multinucleation of conidia occurs through direct migration of pluralnuclei from phialides and confers greater viability and early germination in *Aspergillus oryzae*". Biosci. Biotechnol. Biochem., **69**: 747, 2005.

JORGENSEN, K.; RASMUSSEN, A. V.; MORANT, M.; NIELSEN, A. H.; BJARNHOLT, N.; ZAGROBELNY, M.; BAK, S.& MOLLER, B. L. "Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products". Curr. Opin. Plant. Biol., **8**: 280, 2005.

JUVVADI, P. R.; SESHIME, Y.& KITAMOTO, K. "Genomics reveals traces of fungal phenylpropanoid-flavonoid metabolic pathway in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*". The Journal of Microbiology, **43**(6): 475, 2005.

KALGHATGI, K. K. & SUBBA RAO P. V. "Microbial L-phenylalanine ammonia-lyase: Purification, subunit structure and kinetic properties of the enzyme from *Rhizoctonia solani*". Biochem J., **149**(1): 65, 1975.

KIM, S. H.; VIRMANI, D.; WAKE, K.; MACDONALD, K.; KRONSTAD, J. W. & ELLIS, B. E. "Cloning and disruption of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Ustilago maydis*". *Curr. Genet.*, **40**: 40, 2001.

KOUKOL, J. & CONN, E. E. "Metabolism of aromatic compounds in higher plants: IV Purification and properties of phenylalanine deaminase of *Hurden vulgare*". *J. Biol. Chem.*, **236**: 2692, 1961.

LAEMMLI, U. K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*, **227**:680, 1970.

LEADLAY, P. & WEISSMAN, K. J. "Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides". *Nature Reviews Microbiol.*, **3**: 925, 2005.

LICHTENSTEIN, E. P. & CASIDA, J. E., "Myristicin, an insecticide and synergist occurring naturally in the edible parts of parsnips". *J. Agric. Food Chem.*, **11**: 410, 1981.

MACHIDA, M.; ASAI, K.; SANO, M.; TANAKA, T.; KUMAGAI, T.; TERAJ, G.; KUSUMOTO, K.; ARIMA, T.; AKITA, O.; KASHIWAGI, Y.; ABE, K.; GOMI, K.; HORIUCHI, H.; KITAMOTO, K.; KOBAYASHI, T.; TAKEUCHI, M.; DENNING, D. W.; GALAGAN, J. E.; NIERMAN, W. C.; YU J.; ARCHER, D. B.; BENNETT, J. W.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E.; FEDOROVA, N. D.; GOTOH, O.; HORIKAWA, H.; HOSOYAMA, A.; ICHINOMIYA, M.; IGARASHI, R.; IWASHITA, K.; JUVVADI, P. R.; KATO, M.; KATO, Y.; KIN, T.; KOKUBUN, A.; MAEDA, H.; MAEYAMA, N.; MARUYAMA, J.; NAGASAKI, H.; NAKAJIMA, T.; ODA, K.; OKADA, K.; PAULSEN, I.; SAKAMOTO, K.; SAWANO, T.; TAKAHASHI, M.; TAKASE, K.; TERABAYASHI, Y.; WORTMAN, J. R.; YAMADA, O.; YAMAGATA, Y.; ANAZAWA, H.; HATA, Y.; KOIDE, Y.; KOMORI, T.; KOYAMA, Y.; MINETOKI, T.; SUHARNAN, S.; TANAKA, A.; ISONO, K.; KUHARA, S.; OGASAWARA, N. & KIKUCHI H. "Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*". *Nature.*; **438**(7071): 1157, 2005.

MACDONALD, M. J. & D'CUNHA, J. B. "A modern view of phenylalanine ammonia-lyase". *Biochem. and Cell Biol.*, **85**: 273, 2007.

MALONE, G.; ZIMMER, P. D.; MENEGHELLO, G. E.; BINECK, E. & PESKE, S. T. "Prospecção de genes em bibliotecas de cDNA". *R. Bras. Agrociência*, **12**(1):07, 2006.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L. & VIRET, O. "Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi". *Natural Toxins*, **1**(3): 185, 1992.

POPPE, L.; & RETEY, J. “Friedel–crafts-type mechanism for the enzymatic elimination of ammonia from histidine and phenylalanine”. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**: 3668, 2005.

RASMUSSEN, S. & DIXON, R. A. “Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway”. *Plant Cell*, **11**: 1537, 1999.

RepeatMasker - <http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>

RITTER, H.& SCHULZ, G. E., “Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase”, *The Plant Cell*, **16**: 3426, 2004.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3<sup>a</sup> ed. Nova Iorque, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A. R. “DNA sequencing with chain terminating inhibitors”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **74**: 5463, 1977.

SANTOS, R. M. G. “Metabolismo Secundário dos Fungos *Penicillium* sp e *Fusarium moniliforme* Isolados como Endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae)”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2003. Tese de doutorado, 432 p.

SAUNDERS, J. A. & O’NEILL, N. R., “The characterization of defense responses to fungal infection in alfalfa”. *BioControl.*, **49**: 715, 2004.

SCHULZ, B.; BOYLE C.; DRAEGER, S.; ROMMERT A.& KROHN, K. “Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites”. *Mycol. Res.*, **106** (9): 996, 2002.

SESHIME, Y.; JUVVADI, P. R.; FUJII, I. & KITAMOTO, K. “Genomic evidences for the existence of a phenylpropanoid metabolic pathway in *Aspergillus oryzae*”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **337**: 747, 2005.

SESHIME, Y; JUVVADI, P. R.; KITAMOTO, K.; EBIZUKA, Y.; NONAKA, T.& FUJII, I. “*Aspergillus oryzae* type III polyketide synthase CsyA is involved in the biosynthesis of 3,5-dihydroxybenzoic acid”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **20**: 4785, 2010.

SIUZDAK, G. *Mass Spectrometry for Biotechnology*. 1a ed. San Diego: Academic Press, 1996. p. 161

SKOOG, D. A., HOLLER, F., J. & NIEMAN, T., A., *Princípios de Análise Instrumental*. 5ª ed. Porto Alegre, Bookman, 2002, p.445.

STONE, J. K.; BACON, C. W. & WHITE Jr, J. F. “An overview of endophytic microbes: endophytism defined”. IN: *Microbial Endophytes*, BACON, C.W; & WHITE Jr, J. F. (Eds). Nova Iorque, CRC Press, 2000, p. 3–5.

STROBEL, G. “Microbial gifts from rain forests”. *Canadian Journal Plant Pathology*, **24**: 14, 2002.

TURNER, W. B. & ALDRIDGE, D. C. *Fungal Metabolites Vol. II*. 2ª ed. Londres, Academic Press, 1983, p. 35.

VANELLI, T.; QI, W. W.; SWEIGARD, J.; GATENBY, A. A. & SARIASLANI, F. S. “Production of p-hydroxycinnamic acid from glucose in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* by expression of heterologous genes from plants and fungi”. *Metabolic Engineering*, **9**(2), 142, 2007.

WERCK-REICHHART, D. “Cytochromes P450 in phenylpropanoid metabolism”. *Drug Metabol. and Drug Interact.*, **12**: 221, 1995.

YU, J.; BHATNAGAR, D.& CLEVELAND, T. E. “Completed sequence of aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus*”. *FEBS Lett.*, **564**: 126, 2004.

YU, D.; ZENG, J.; CHEN, D.; ZHAN, J. “Characterization and reconstitution of a new fungal type III polyketide synthase from *Aspergillus oryzae*”. *Enzyme and Microbial Technology*, **46**(7): 575, 2010.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.& TAN, R. X. “Biology and chemistry of endophytes”. *Nat. Prod. Rep.*, **23**: 753, 2006.