



PROTOCOLO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CONIFERALDEÍDO DESIDROGENASE EM RAÍZES DE MILHO (*Zea mays* L.)

*Dyoni Matias de Oliveira*¹, *Aline Finger-Teixeira*², *Ana Paula Ferro*², *Wanderley Dantas dos Santos*³, *Oswaldo Ferrarese-Filho*³

RESUMO: A biomassa lignocelulósica é formada principalmente pelos polissacarídeos e fenilpropenoides que compõem a parede celular. O ácido ferúlico (FA) interliga os polímeros da parede inibindo a atividade de hidrolases. O FA é sintetizado pela oxidação do coniferaldeído catalisada pela coniferaldeído desidrogenase (CALDH). Neste trabalho relatamos o estabelecimento de um protocolo para determinar a atividade da CALDH. Sementes de milho (*Zea mays* L.) foram germinadas no escuro (72 h, 25°C). 25 plântulas uniformes foram mantidas em hidroponia por 24 h. 2 g de raízes frescas foram maceradas em tampão de extração. O homogeneizado foi centrifugado (2200×g, 30 min, 4°C) e o sobrenadante precipitado com sulfato de amônio 70%. O extrato foi centrifugado (15 min) e o pellet ressuspenso em tampão de extração foi considerado extrato enzimático bruto. A reação foi iniciada com adição do substrato e mantida a 40° C por 10 min. O produto da reação foi separado por HPLC usando-se uma coluna C18 em corrida isocrática de 1 mL min⁻¹ MeOH:AcOH 6% (30:70, v/v). A técnica foi validada com 1 mM de sinapato, um indutor desta enzima. Os resultados sugerem que o protocolo é um método simples, rápido e preciso para quantificar a atividade da CALDH, podendo ser usado para determinar os efeitos de tratamentos que interfiram na síntese de fenilpropenoides.

PALAVRAS-CHAVE: CALDH, biomassa lignocelulósica, ácido ferúlico, parede celular.

INTRODUÇÃO

A parede celular é constituída por uma mistura complexa de polissacarídeos e outros polímeros. Os polissacarídeos representam 70-90% do peso seco da parede e consistem principalmente de celulose.

No mundo todo, grande parte da biomassa lignocelulósica industrial é descartada ou subutilizada. Mais recentemente, entretanto, a biomassa lignocelulósica tem sido apontada como matéria-prima para a produção de biocombustíveis. No Brasil, uma

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

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

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

importante fonte de biomassa é o bagaço da cana-de-açúcar que é um resíduo produzido pela indústria de açúcar e álcool. Como é produzida dentro da usina, esta biomassa não requer transporte adicional, favorecendo os custos de produção. Em outros países, outras fontes de biomassa podem ser favorecidas como é o caso do milho nos EUA, maior produtor de etanol do mundo. Mas também lá, a lignocelulose é subutilizada. Além destas, muitas outras fontes de biomassa, como os resíduos de soja, podem vir a ser revertidas à produção de etanol quando a tecnologia para isto estiver disponível (dos Santos *et al.*, 2011).

O ácido ferúlico (FA) é produzido pela via dos fenilpropenoides a partir da fenilalanina e da tirosina. Seu resíduo ligado à coenzima A é um intermediário na produção do guaiacol e siringil monolignóis que são precursores da lignina. Ele também pode se ligar a pectinas como ramnogalacturonanos (Ishii, 1997) e resíduos de tirosina de glicoproteínas (Fry, 2004). Estas interligações formam uma rede que percorre toda a parede celular promovendo seu enrijecimento, restringindo o crescimento celular e prevenindo a atividade de polissacaridases (dos Santos *et al.*, 2008).

A coniferaldeído desidrogenase (CALDH), pertencente à superfamília das Aldeído Desidrogenases (ALDHs), oxida o coniferaldeído à FA. Segundo Kirch *et al.* (2001), as ALDHs catalisam a oxidação irreversível de aldeídos, reduzindo NAD(P)⁺. Preferencialmente NAD⁺ (Yoshida *et al.*, 1998).

Dados preliminares sugerem que pode haver uma correlação inversa entre a disponibilidade dos polissacarídeos a hidrolases e o conteúdo de fenilpropenoides na parede celular. Assim, a inibição da CALDH pode reduzir a recalcitrância. A possibilidade de produzir combustíveis líquidos a partir da biomassa tornou-se central na agenda de mitigação das emissões de carbono. De fato, o etanol foi reputado como parte importante da solução. Qualquer metodologia, que contribua com um maior aproveitamento da matéria lignocelulósica, para obtenção de etanol é de suma importância para a consolidação dos biocombustíveis como um substituto vantajoso aos combustíveis fósseis tanto por sua sustentabilidade quanto pelos benefícios estratégicos e econômicos (Bevan e Franssen, 2006; Goldenberg, 2008).

A planta, em condições não estressantes, produz a quantidade de FA necessária para controlar o crescimento celular. Uma pequena inibição da enzima pode reduzir o número de resíduos de FA em uma medida suficientemente suave para não afetar os processos de construção da parede, mas suficiente para reduzir o grau de dimerização dos resíduos de feruloil esterificados aos polissacarídeos, tornando a parede mais acessível ao ataque hidrolítico, favorecendo a produção de biocombustíveis. A identificação e determinação da atividade enzimática da CALDH foi o objetivo deste trabalho, sendo uma ferramenta importante para os estudos visando o desenvolvimento da tecnologia para o etanol celulósico e a consolidação dos biocombustíveis como um substituto vantajoso aos combustíveis fósseis.

METODOLOGIA

Cultivo e Tratamento das Plântulas para Ensaio Bioquímicos

Sementes de milho cv IPR 114 foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 2%, lavadas com água deionizada e distribuídas uniformemente em papel de germinação umedecido com água deionizada. As sementes foram recobertas com outra folha de papel, enroladas delicadamente e acondicionadas em tubos apropriados para preservar a umidade e climatizados em câmaras de germinação onde permaneceram por 72 h.

Anais Eletrônico

VII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar

CESUMAR – Centro Universitário de Maringá

Editora CESUMAR

Maringá – Paraná – Brasil

As plantas viáveis foram selecionadas e acondicionadas em suportes ajustáveis apropriados para o crescimento em hidroponia utilizando-se solução nutritiva de Hoagland, meia força.

Protocolo para determinação da atividade da CALDH

A padronização da atividade enzimática da CALDH foi adaptada a partir de Nair *et al.* (2004) para as diferentes plantas. Os tecidos vegetais (2 g de biomassa fresca) foram macerados em 3 mL de meio de extração contendo ditioneitol 5 mM, EDTA 1 mM, 10% de glicerol e tampão Hepes 50 mM pH 8,0. A suspensão foi centrifugada a 2200xg por 30 min sob refrigeração e o sobrenadante precipitado com sulfato de amônio 70%. A proteína precipitada foi centrifugada por 15 min e o precipitado dissolvido com 1 mL de tampão de extração sendo considerado o extrato enzimático final. Para o ensaio enzimático foi acompanhada a oxidação de coniferaldeído a FA a 40°C, 10 min. O volume final do meio de reação (1 mL) continha 100 µL de extrato enzimático, DTT 5 mM, tampão Hepes/HCl 50 mM, pH8,0, NAD⁺ 1 mM e coniferaldeído 30 µM. A reação foi iniciada com a adição do substrato e encerrada após 10 min incubada a 40°C com 60 µL de HCl 3 M. A seguir as amostras foram centrifugadas por 2 min em 10000xg. A atividade enzimática foi avaliada pela produção de FA min⁻¹ mg de proteína⁻¹. O FA foi separado em corrida isocrática de HPLC em fase reversa com coluna C-18 em fase móvel MeOH:AcOH (30:70 v/v) com fluxo de 1 mL min⁻¹ e detectado em espectrofotômetro com arranjo de diodos em 330 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados (Fig. 1) revelam que o produto da reação apresenta o mesmo tempo de retenção do padrão de FA (1) (~10 min). A mesma figura mostra que a preparação enzimática não interfere com os resultados evidenciando que este método pode ser empregado para quantificar a atividade da CALDH de forma acurada, mesmo em extrato bruto. Uma curva padrão obtida com o FA demonstrou que a metodologia é altamente sensível mesmo em baixas atividades enzimáticas (dados não mostrados). Um experimento comparativo com e sem ácido sinápico 1 mM (Fig. 2) indica que esta técnica pode ser usada para diferenciar atividades muito próximas, minimizando resultados contraditórios. Este protocolo pode ser usado rotineiramente em raízes de milho com resultados reprodutivos.

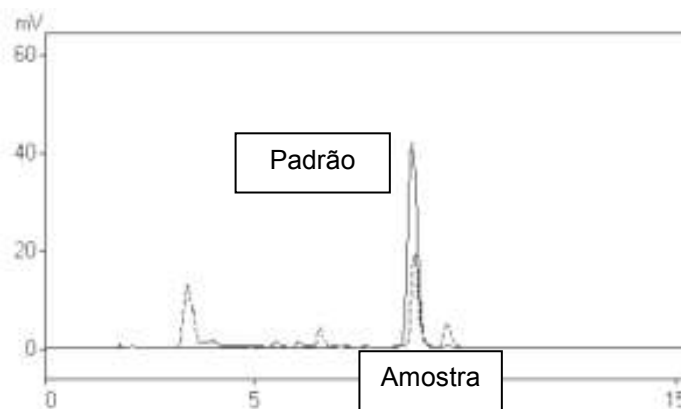


Figura 1: Cromatograma da CALDH. Padrão de ácido ferúlico 50 µM (linha contínua) e amostra (linhas tracejadas).

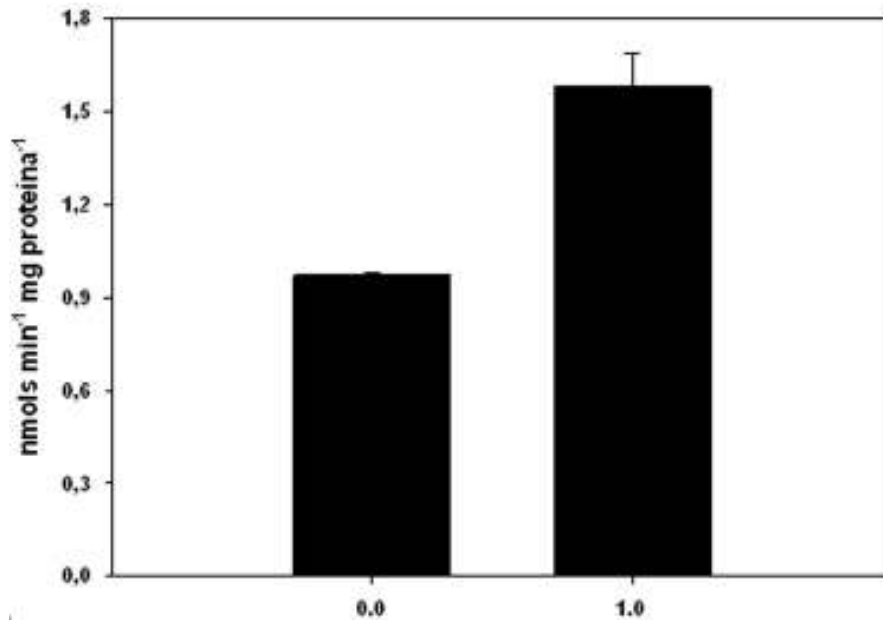


Figura 2: Atividade da CALDH em raízes controle e tratadas com 1 mM de ácido sinápico por 24 h.

CONCLUSÃO

O método de corrida isocrática por HPLC descrito neste trabalho é simples, rápido e acurado. Pode ser recomendado como uma alternativa para determinar a atividade da CALDH em extratos de proteínas de raízes de milho não purificados sendo promissor para a aplicação em outras espécies vegetais, além dos efeitos de inibidores desta enzima e suas implicações metabólicas.

REFERÊNCIAS

BEVAN, M.W., FRANSSSEN M.C.R. (2006). Investing in green and white technology. *Nature Biotechnology*. 24(7):365-367.

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

dos SANTOS, W. D., GOMES, E. A., BUCKERIDGE. M. S.(2011) **Bioenergy and the Sustainable Revolution**. In: Buckeridge, M. S and Goldman, G. H. (Org.). *Routes for Cellulosic Ethanol*. New York: Springer, v. 1, p. 15-26.

FRY, S.C. (2004). Oxidative coupling of tyrosine and ferulic acid residues: Intra- and extra-protoplasmic occurrence, predominance of trimers and larger products, and possible role in inter-polymeric. *Phytochemistry Reviews*, 3:97-111

ISHII, T. (1997) Structure and functions of feruloylated polysaccharides. **Plant Science**. 127:111-127.

GOLDENBERG, J., COELHO, S.T., GUARDABASSI, P. (2008). The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, doi:10.1016/j.enpol.2008.02.028

KIRCH, H. H., NAIR, A., BARTELS, D. (2001). Novel ABA-dehydration-inducible aldehyde dehydrogenase genes isolated from the resurrection *plant Craterostigma plantagineum* and *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal** 28: 555-567.

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

YOSHIDA, A., RZHETSKY, A., HSU, L.C., CHANG, C (1998). Human aldehyde dehydrogenase family. **Febs European Journal of Biochemistry**, 251:549-557.