

FERNANDO COTINGUIBA DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO BIOSINTÉTICA, TRANSCRIPTÔMICA E
PROTEÔMICA EM ESPÉCIES DE PIPERACEAE**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química

Orientadora: Profa. Dra. Maysa Furlan

Co-orientadora: Profa. Dra. Silvia Noelí López

Araraquara

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

S586i Silva, Fernando Cotinguiba da
Investigação biossintética, transcriptômica e proteômica
em espécies de Piperaceae / Fernando Cotinguiba da Silva. –
Araraquara : [s.n], 2011
197 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Maysa Furlan
Coorientador: Silvia Noelí López

1. Biossíntese. 2. Proteômica. 3. Transcriptômica.
I. Título.

FERNANDO COTINGUIBA DA SILVA

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Araraquara, 28 de novembro de 2011.

BANCA EXAMINADORA



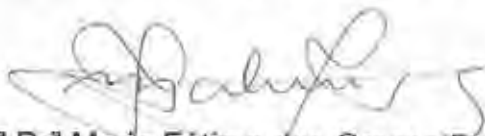
Profª Drª Maysa Furlan (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



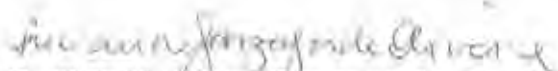
Profª Drª Isabele Rodrigues Nascimento
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Carlos Alberto Labate
Escola Superior de Agricultura – USP, Piracicaba



Profª Drª Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – UFSCar, São Carlos



Profª Drª Luciana Gonzaga de Oliveira
Instituto de Química – UNICAMP, Campinas

DADOS CURRICULARES

FERNANDO COTINGUIBA DA SILVA

1. DADOS PESSOAIS

data de nascimento: 04/09/1980

nacionalidade: brasileira

naturalidade: São Paulo (SP)

profissão: químico

endereço: Rua Padre Conrado, 1132 - Franca (SP), CEP 14405-275

e-mail: ferquimica@hotmail.com

citação bibliográfica: COTINGUIBA, F.

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1 - Graduação

Curso: Bacharelado e Licenciatura em Química **Instituição:** Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

Período: março de 2001 - julho de 2005 **Título do projeto de Iniciação Científica:** “Estudo fitoquímico do extrato de folhas de *Siphoneugena densiflora* Berg (Myrtaceae) em busca de substâncias inseticidas e inibidoras das enzimas GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) de *Trypanosoma cruzi* e APRT (adenina fosforibosiltransferase) de *Leishmania tarentolae*” **Orientador:** Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira
Bolsista: FAPESP/Processo 02/12912-0

2.2 - Mestrado

Curso: Mestrado em Química **Área de concentração:** Química Orgânica **Modalidade:** Produtos Naturais
Instituição: Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Araraquara **Período:** agosto de 2005 - junho de 2007 **Título de projeto:** “Síntese, avaliação biológica e biossintética de amidas de *Piper tuberculatum* (Piperaceae)” **Orientadora:** Profa. Dra. Maysa Furlan
Bolsista: FAPESP/Processo 05/58796-9

2.3 – Doutorado

Curso: Doutorado em Química **Área de concentração:** Química Orgânica **Modalidade:** Produtos Naturais
Instituição: Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Araraquara **Período:** agosto de 2007 – novembro de 2011 **Título de projeto:** “Investigação biossintética, proteômica e transcriptômica em espécie do gênero *Piper*” **Orientadora:** Profa. Dra. Maysa Furlan; **Co-orientadora:** Profa. Dra. Silvia Noelí López **Bolsista:** FAPESP/Processo 07/56140-4

2.4 – Doutorado Sanduíche

Curso: Estágio em Bioquímica Vegetal **Área de concentração:** Biologia Molecular **Modalidade:** Produtos Naturais
Instituição: Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie – Halle an der Saale (Alemanha) **Período:** fevereiro de 2010 – março de 2011 **Título de projeto:** “*Piper nigrum*: construção de uma biblioteca de cDNA e amplificação de genes envolvidos na biossíntese de fenilpropanóides” **Orientador:** Dr. Thomas Vogt
Bolsista: CAPES-DAAD/Processo BEX 3477/09-6

3. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. **COTINGUIBA, F.**; GOMES, K.S.; LOPEZ, S.N.; BOLZANI, V.S.; CHAGAS, A.C.S.; FLAUSINO Jr, O.; KATO, M.J.; FURLAN, M. **Biosynthetic, biological, molecular and proteomic aspects from *Piper* species**. 2011. Cidade: Campinas, SP; Evento: ESPCA - Natural Products, Medicinal Chemistry and Organics Synthesis Integrated Solutions for tomorrow's world;
2. **COTINGUIBA, F.**; MANKE, K.; FURLAN, M.; VOGT, T. **Molecular investigations of *Piper nigrum* (Black pepper) fruits in search for natural products biosynthetic target genes**. 2011. Cidade: Águas de Lindóia; Evento: 57 Congresso Brasileiro de Genética;
3. **COTINGUIBA, F.**; LOPEZ, S.N.; BOLZANI, V.S.; KATO, M.J.; LABATE, C.A.; FURLAN, M. **Proteomic analysis of two *Piper* species**. 2011. Cidade: Ouro Preto, MG; Evento: 3rd Brazilian Conference on Natural Products;
4. FOKOUE, H.H.; **COTINGUIBA, F.**; SCOTTI, M.T.; SCOTTI, L.; FURLAN, M.; KATO, M.J. **QSAR studies of anti-trypanosomal activity using molecular interactions fields of piperamides and derivatives**. 2011. Cidade: Ouro Preto, MG; Evento: 3rd Brazilian Conference on Natural Products;
5. REGASINI, L.O. ; ALEZANDRO, M.R. ; FERNANDES, D.C. ; **COTINGUIBA, F.**; COQUEIRO, A.; SANTOS, V.A.F.F.M. ; OLIVEIRA, C.M. ; FUNARI, C.S. ; FURLAN, M. ; SILVA, D.H.S.; ARAUJO, A.R.; GENOVESE, M. I.; BOLZANI, V.S. **Alpha-glucosidase inhibitors from Brazilian plants and their associated endophytic fungi: potential antidiabetic agents**. 2011. Cidade: Ouro Preto, Evento: 3rd Brazilian Conference on Natural Products;
6. BARROS, L. D. ; CHAGAS, A. C. S. ; **COTINGUIBA, F.** ; FURLAN, M. ; GIGLIOTI, R ; OLIVEIRA, M. C. S. ; BIZZO, H. . **In vitro efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)**. 2011. Cidade: Buenos Aires; Evento: 23rd. International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology;
7. FLAUSINO Jr, O.; ABISSI, B.; **COTINGUIBA, F.**; GOMES, K.S.; REGASINI, L.O.; KATO, M.J.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. **Protease inhibition activity of semi-synthetic derivatives of piperine isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae) from Brazilian Flora**. 2010. Cidade: Berlin; Evento: 58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research / 7th Tannin Conference;
8. VIEIRA, G.A.L.; **COTINGUIBA, F.**; SIQUEIRA, M.C.; LAURE, H.J.; ROSA, J.C.; GRENNÉ, L.J.; FURLAN, M.; CICALLELLI, R.M.B. **Análise proteômica de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* tratadas com substâncias de *Piper tuberculatum***. 2010. Cidade: Itajaí; Evento: V Simpósio Americano de Plantas Medicinais;
9. CARVALHO, C.O.; CHAGAS, A.C.S.; NAVARRO, A.C.M.; **COTINGUIBA, F.**; AMARANTE, A.F.T.; FURLAN, M.; BASSETTO, C.C.; BOSCHINI, L.; BARIONI JR, W.; BRITO, I.G.; CHAVES, F.C.M.; BIZZO, H. **Eficácia de extratos vegetais em nematódeos parasitas: avaliação in vitro em *Haemonchus contortus* e *Strongyloides venezuelensis* e avaliação in vivo em ratos infectados com *S. venezuelensis***. 2010. Cidade: Campo Grande; Evento: XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária.
10. BARROS, L.D.; OLIVEIRA, M.C.S.; **COTINGUIBA, F.**; FURLAN, M.; GIGLIOTI, R.; CHAGAS, A.C.S. **Eficácia in vitro de *Piper tuberculatum* sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: partições, isolados e sintéticos**. 2010. Cidade: Campo Grande; Evento: XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária.
11. **COTINGUIBA, F.**; GOMES, K.S.; REGASINI, L.O.; SIQUEIRA, M.C.; CICALLELLI, R.M.B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M.J.; FURLAN, M. **Piperine analogues as potencial anti-trypanosomal agents and its preliminar SAR data**. 2009. Cidade: Ribeirão Preto; Evento: 7th Internacional Congress of Pharmaceutical Sciences;
12. FELIPPE, L.G.; BALDOQUI, D.C.; **COTINGUIBA, F.**; BOLZANI, V.S.; KATO, M.J.; FURLAN, M. **Comparative study of PAL (Phenylalanine ammonia lyase) in Piperaceae species**. 2009.Cidade: São Pedro, SP; Evento: 2nd BCNP (Brazilian Conference on Natural Products).
13. **COTINGUIBA, F.**; LOPEZ, S.N.; BOLZANI, V.S.; KATO, M.J.; FURLAN, M. **Cinnamate 4-hydroxylase: A cytochrome enzyme involved in the phenylpropanoid pathway in *Piper tuberculatum***. 2009 Cidade: São Pedro; Evento: 2nd BCNP (Brazilian Conference on Natural Products).

14. GOMES, K.S.; **COTINGUIBA, F.**; REGASINI, L.O.; KATO, M.J.; FURLAN, M. **Piperamidas naturais e sintéticas como modelos de substâncias anti-chagásicas e antifúngicas**. 2009. Cidade: São José do Rio Preto, SP; Evento: XXI Congresso de Iniciação Científica da Unesp;
15. LEOPOLDO, M.F.; **COTINGUIBA, F.**; FELIPPE, L.G.; KATO, M.J.; FURLAN, M. **Estudo fitoquímico de *Piper* sp.** 2009. Cidade: São José do Rio Preto, SP; Evento: XXI Congresso de Iniciação Científica da Unesp;
16. BARROS, L.D.; **COTINGUIBA, F.**; GIGLIOTI, R.; GEORGETTI, C.; CALURA, F.; CALA, A.; OLIVEIRA, M. C.S.; CHAGAS, A.C.S. **Eficácia *in vitro* de extratos vegetais no controle do carrapato *Rhipicephalus***. 2009. Cidade: São Carlos; Evento: Anais da I Jornada Científica Embrapa São Carlos.
17. PASSERINI, G.D.; MONAZZI, L.G.S.; SIQUEIRA, M.C.; **COTINGUIBA, F.**; FELIPPE, L.G.; MOTA, J.S.; FURLAN, M.; CICARELLI, R.M.B. **Avaliação do potencial tripanocida de substâncias extraídas da família Piperaceae**. 2008. Cidade: Araraquara, SP; Evento: IV Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia;
18. **COTINGUIBA, F.**; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M.; CICARELLI, R.M.B.; KATO, M.J.; FURLAN, M. **Estudo químico e biológico de *Piper fuliginum* Kunth**. 2008. Cidade: Araraquara, SP; Evento: VI simpósio e VI Reunião de avaliação do Programa Biota/FAPESP.
19. **COTINGUIBA, F.**; LOPEZ, S.N.; BOLZANI, V.S.; KATO, M.J.; FURLAN, M. **Avaliação da atividade de oxidoredutases do tipo citocromo P450 em *Piper tuberculatum* Jacq.** 2008. Cidade: Araraquara, SP; Evento: VI simpósio e VI Reunião de avaliação do Programa Biota/FAPESP.
20. **COTINGUIBA, F.**; REGASINI, L.O.; KATO, M.J.; CICARELLI, R.M.B.; PASSERINI, G.D.; GIANINNI, M. J. S.M.; FURLAN, M. **Estudo químico e biológico de *Piper tuberculatum***. 2008. Cidade: Araraquara, SP; Evento: VI simpósio e VI Reunião de avaliação do Programa Biota/FAPESP.
21. PETRONIO, M.S.; REGASINI, L.O.; **COTINGUIBA, F.**; GIANINNI, M.J.S.M.; BOLZANI, V.S.; KATO, M.J.; FURLAN, M. **Avaliação do efeito sinérgico entre piperamidas e fármacos antifúngicos poliênicos e azóis**. 2008. Cidade: Araraquara, SP; Evento: 55ª Jornada Farmacêutica da Unesp.
22. **COTINGUIBA, F.**; REGASINI, L.O.; SKRZEK, S.C. G.; SIQUEIRA, J.R.; BOLZANI, V.S.; KATO, M.J.; FURLAN, M. **Atividade antioxidante de *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum***. 2008. Cidade: Araraquara, SP; Evento: 55ª Jornada Farmacêutica da Unesp.
23. **COTINGUIBA, F.**; REGASINI, L.O.; SANTOS, V.A.F.F.M.; VARANDA, E.A.; FRIGIERI, M.C.; BOLZANI, V.S.; KATO, M.J.; FURLAN, M. **Avaliação da atividade mutagênica de piplartina, uma amida isolada de *Piper tuberculatum* (Piperaceae)**. 2008. Cidade: São Paulo, SP; Evento: XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil & X Congresso.
24. GOMES, K.S.; **COTINGUIBA, F.**; REGASINI, L.O.; KATO, M.J.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. **Síntese de amidas do gênero *Piper* e análogos visando a busca de substâncias bioativas**. 2008. Cidade: São José dos Campos; Evento: XX Congresso de Iniciação Científica da UNESP.
25. KATO, M.J.; **COTINGUIBA, F.**; BOLZANI, V.S.; MOTA, J.S.; FELIPPE, L.G.; YOUNG, M.C.M.; FURLAN, M. **Tracking metabolic diversification in Piperaceae**. 2008. Cidade: Pullman, WA; Evento: Phytochemical Society of North America - Annual Meeting.
26. **COTINGUIBA, F.**; REGASINI, L.O.; DEBONSI, H.M.; BOLZANI, V.S.; AMBROSIO, D.L.; PASSERINI, G. D.; CICARELLI, R.M.B.; KATO, M.J.; FURLAN, M. **Potencial tripanocida de amidas e derivados semi-sintéticos de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae)**. 2007. Cidade: Aguas de Lindóia, SP; Evento: 30ª Reunião Anual da SBQ.
27. CESAR, F.S.; **COTINGUIBA, F.**; FELIPPE, L.G.; MOTA, J.S.; AMBROSIO, D.L.; PASSERINI, G.D.; BOLZANI, V.S.; CICARELLI, R.M.B.; KATO, M.J.; FURLAN, M. **Potencial tripanocida e antifúngico dos extratos de *Piper fuliginum* Kunth (Piperaceae)**. 2007. Cidade: Araraquara, SP; Evento: I Simpósio Paulista de Farmacognosia.
28. **COTINGUIBA, F.**; REGASINI, L.O.; DEBONSI, H.M.; BENADUCCI, T.; GIANINNI, M.J.S.M.; BOLZANI, V.S.; KATO, M.J.; FURLAN, M. **Potent antifungal agents: amides and their derivatives from *Piper tuberculatum* (Piperaceae)**. 2007. Cidade: Ribeirão Preto, SP; Evento: VI Congresso Internacional de Farmácia - CIFARP.
29. **COTINGUIBA, F.**; GALLO, M.B.C.; SILVA, M.F.G.F.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C. **Novo triterpeno glicosilado isolado das folhas de *Siphoneugena densiflora* Berg (Myrtaceae)**. 2005. Cidade: Poços de Caldas, MG; Evento: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

30. GALLO, M.B.C.; **COTINGUIBA, F.** ; GUIDO, R. ; OLIVA, G. ; FERNANDES, J. B. ; SILVA, M. F. G. ; SILVA, M. ; THIEMANN, O.; VIEIRA, P.C. **Enzymatic inhibitory activity of flavonoids, triterpenes and ecdysteroids on the GAPDH e APRT.** 2004. Cidade: Águas de São Pedro, SP; Evento: Second international joint symposium: chemistry, biological and pharmacological properties of medicinal plants from the Americas.
31. **COTINGUIBA, F.**; GALLO, M.B.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C. **Estudo fitoquímico do extrato de folhas de *Siphoneugena densiflora* (Myrtaceae) em busca de substâncias inseticidas e inibidoras das enzimas GAPDH e APRT.** 2003. Cidade: São Carlos; Evento: XI CIC Congresso de Iniciação Científica da UFSCar;
32. **COTINGUIBA, F.**; Miranda, A.M.M.; Seixas, A.S.S. **Importância da identificação do sistema ABO e do fator Rh: Análise em uma comunidade (UFSCar).** 2001. Cidade: São Carlos, SP; Evento: IX Congresso de Iniciação Científica da UFSCar.

4. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

- Técnico em Química no laboratório de Química de Produtos Naturais (UFSCar);
- Professor da disciplina Química Geral (Teórica e Experimental) ministrada ao curso de Engenharia Ambiental da UNESP (Presidente Prudente, SP) durante o primeiro semestre de 2008 (Bolsista didático)

5. CURSOS REALIZADOS

- 2011 Enzymes: from prospecting to synthetic application.** (Carga horária: 8h). USP, São Carlos, SP.
- 2011 Introdução a proteômica.** (Carga horária: 40h). UNESP, Araraquara, SP.
- 2011 Sequenciamento de ácidos nucleicos em larga escala.** (Carga horária: 3h). Sociedade Brasileira de Genética.
- 2010 Biologia Molecular.** (Carga horária: 80h). Associação Brasileira de Educação a Distância.
- 2009 Radioproteção: uso, preparo e manuseio de fontes radioativas.** (Carga horária: 50h). USP, Ribeirão Preto, SP.
- 2009 GE Day-Ferramentas para estudos proteômicos e genômicos.** (Carga horária: 8h). USP, São Carlos, SP
- 2009 Proteomics.** (Carga horária: 4h). USP, Ribeirão Preto, SP.
- 2008 Biota funcional: proteoma/metaboloma.** UNESP, Araraquara, SP.
- 2003 Tópicos em química medicinal.** (Carga horária: 15h). UFSCar, São Carlos, SP.
- 2003 Medicinal and bio-inorganic chemistry.** (Carga horária: 15h). UFSCar, São Carlos, SP.
- 2003 Catálise aplicada à processos industriais.** (Carga horária: 15h). UFSCar, São Carlos, SP.
- 2002 High efficiency enantiomeric separation.** (Carga horária: 15h). UFSCar, São Carlos, SP.

6. ESTÁGIOS REALIZADOS

- Estágio no Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DMP-UFSCar), São Carlos (SP), auxiliando nos exames parasitológicos e de determinação de doenças sanguíneas, sob a orientação da Profª Drª Ângela Maria Maffei Miranda e Prof. Dr. Antônio Sérgio Spanó Seixas (março de 2001 a novembro de 2001);
- Técnico do laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSCar, São Carlos (SP), sob supervisão do Prof. Dr. João Batista Fernandes e Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira (novembro de 2001 a fevereiro de 2003);

- Aluno de iniciação científica no laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSCar, São Carlos (SP), sob orientação do Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira (março de 2003 a julho de 2005);
- Estágio de doutorado-sanduíche no Departamento de Biologia Celular e Metabólica (Instituto Leibniz de Bioquímica de Plantas, Halle an der Saale, Alemanha), sob orientação do Dr. Thomas Vogt (abril de 2010 a março de 2011).
- Estudante visitante na Universidade Halle-Wittenberg, Alemanha, na área de Bioquímica (abril de 2010 a março de 2011).

7. IDIOMAS

Inglês: Compreende bem, Fala razoavelmente, Lê bem, Escreve razoavelmente.

Alemão: Compreende bem, Fala razoavelmente, Lê bem, Escreve razoavelmente.

8. ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

CHAGAS, A. C. S.; BARROS, L. D.; COTINGUIBA, F.; FURLAN, M.; GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, M. C. S.; BIZZO, H. ***In vitro* efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus* (Boophilus) Microplus (Acari: Ixodidae).** Parasitology Research (1987. Print), 2011.

CARVALHO, C. O.; CHAGAS, A. C. S.; COTINGUIBA, F.; FURLAN, M.; BRITO, L.G.; CHAVES, F. C. M.; STEPHAN, M.P. BIZZO, H.; AMARANTE, A. F. T. **The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*.** Veterinary Parasitology (Print), 2011.

REGASINI, L. O.; COTINGUIBA, F.; MORANDIN, A. A.; KATO, M. J.; SCORZONI, L.; GIANINNI, M. J. S. M.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. **Antimicrobial activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae) against opportunistic yeasts.** African Journal of Biotechnology, v. 9, p. 31-37, 2009.

REGASINI, L. O.; COTINGUIBA, F.; PASSERINI, G. D.; CICARELLI, R. M. B. BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. **Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae).** Revista Brasileira de Farmacognosia (Impresso), v. 19, p. 199-203, 2009.

COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; DEBONSI, H.M.; PASSERINI, G. D.; CICARELLI, R. M. B.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. **Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents.** Medicinal Chemistry Research, v. 18, p. 703-711, 2009.

REGASINI, L. O.; COTINGUIBA, F.; SIQUEIRA, J. R.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; KATO, M. J.; FURLAN, M. **Radical scavenging capacity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae).** Latin American Journal of Pharmacy, v. 27, p. 900-903, 2008.

GALLO, M. B. C.; COTINGUIBA, F.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P.C. **New natural products from *Siphoneugena densiflora* Berg (Myrtaceae) and their importance taxonomy.** Journal of the Brazilian Chemical Society (Impresso), Brasil, v. 17, n. nº2, p. 279-288, 2006.

GALLO, M. B. C.; ROCHA, W.C.; CUNHA, U. S.; COTINGUIBA, F.; DIOGO, F. A.; VENDRAMIM, J. D.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P.C. **Bioactivities of extracts and compounds from *Vitex polygama* Cham. and *Siphoneugena densiflora* Berg against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).** Pest Management Science (Print), Estados Unidos, v. 62, p. 1072-1081, 2006.

9. REVISOR DE PERIÓDICOS

2009 – Atual Periódico: Medicinal Chemistry Research

10. PRÊMIOS E TÍTULOS

2011 Menção honrosa ao trabalho intitulado "Proteomic analysis of two *Piper* species", 3rd Brazilian Conference on Natural Products.

2011 Selecionado para apresentação oral do trabalho intitulado "Proteomic analysis of two *Piper* species", 3rd Brazilian Conference on Natural Products.

2011 Selecionado para participar do evento "ESPCA on Natural Products, Medicinal Chemistry and Organic Synthesis: integrated solutions for tomorrow's world".

2008 Menção honrosa ao trabalho intitulado "Avaliação do efeito sinérgico entre piperamidas e fármacos antifúngicos poliênicos e azóis", 55a Jornada Farmacêutica da UNESP.

11. TEXTOS EM JORNAIS DE NOTÍCIAS/REVISTAS

COTINGUIBA, F. **Pesquisas buscam a cura para a Doença de Chagas.** Agencia de Notícias da Uniara, 27 nov. 2009.

12. DISCIPLINAS CURSADAS (POS-GRADUAÇÃO)

Disciplinas cursadas	Conceito final
Teoria e método de separação, isolamento e purificação de compostos orgânicos	A
Produtos naturais bioativos e últimos avanços na descoberta de fármacos, cosméticos e outros produtos de interesse econômico.	B
Química Orgânica Avançada	A
Espectroscopia de Massas de Produtos Naturais	A
Bioensaio para Químicos	A
Metabolismo Microbiano	A
Biossíntese de Produtos Naturais	A
Métodos Espectrométricos I	B

13. SEMINÁRIO GERAL

Apresentação do tema "Utilização de isótopos estáveis e radioativos em estudos biossintéticos" em 09/10/2009.

DEDICATÓRIAS

**Aos meus pais Maria e Osvaldo,
meus irmãos e toda minha família....**

... me preocupo por nem sempre estar por perto para compartilharmos momentos em nossas vidas.

As vezes, para conseguirmos algo que nunca tivemos, é preciso enfrentar situações e trilhar caminhos que nunca percorremos antes. Mesmo com a distância estão torcendo, me ajudando, me incentivando...

... desde pequeno acompanho a luta diária de meus pais, para proporcionar bem estar e educação aos filhos... se estou aqui hoje, foi por tudo que fizeram e fazem por mim...

Obrigado por tudo!

DEDICATÓRIAS

Aos mestres...

Maysa Furlan

“A melhor coisa que podemos fazer para nossos filhos é neles instilar um sentido de veneração e de maravilha, somente através do qual é gerado um conhecimento dotado de sentido. Este tipo de conhecimento enriquece realmente nossas vidas, porque permite a transcendência do cotidiano: e esta é uma experiência que temos necessidade absoluta, se quisermos realizar plenamente nossa humanidade. Não é a curiosidade que é a fonte do desejo de aprender e conhecer: assim, normalmente a curiosidade é rapidamente satisfeita. É a maravilha, é o maravilhoso, que provoca uma penetração cada vez mais profunda nos mistérios do universo e na valorização autêntica das conquistas da humanidade”

(Bruno Bettelheim)

Silvia Noelí López

“Hay hombres que luchan un día y son buenos. Hay otros que luchan un año y son mejores. Hay quienes luchan muchos años, y son muy buenos. Pero hay los que luchan toda la vida, esos son los imprescindibles.”

(Bertolt Brecht)

Thomas Vogt

"Vorzüglichkeit ist eine Kunst, die man durch Ausbildung und Gewohnheit gewinnt. Wir handeln nicht aus dem Grunde richtig, weil wir Tugendhaft oder Vorzüglich sind, sondern wir sind diese, weil wir richtig gehandelt haben. Wir sind, was wir wiederholt tun. Vorzüglichkeit ist dann nicht ein Akt, sondern eine Gewohnheit."

(Aristoteles)

Levo comigo muito de cada um de vocês! Meu eterno OBRIGADO!

AGRADECIMENTOS

À UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”) e ao Instituto de Química de Araraquara, local onde vivi uma etapa profissional muito importante na minha vida.

A todos os professores e amigos do NuBBE, do Departamento de Química Orgânica e de todo Instituto de Química, pela convivência e momentos de alegria e aprendizagem.

Aos amigos do Grupo de Pesquisa em Biossíntese de Produtos Naturais, especialmente Lidiane e Vânia, por todas as discussões sobre o trabalho, além dos momentos de descontração. Obrigado !

À UFSCar (Universidade Federal de São Carlos) pelo apoio durante todo o curso de graduação; pela e por me apresentar vários amigos que mesmo distantes, são tão presentes: Alessandra, Ana Cláudia, Carlos, Edna, Giseli, Giselle, Graciela, Humberto, Ivana, Kallyni, Marcelo, Maria Carolina, Mário, Rafaela, Tânia e Vera!

A todos os professores e alunos do Laboratório de Produtos Naturais (UFSCar) com quem convivi e aprendi muito. Em especial ao Prof. Paulo Cezar Vieira e às ex-alunas, agora doutoras, Margareth Borges Coutinho Gallo e Waldireny Caldas Rocha. Obrigado!

Aos amigos-irmãos e companheiro de república: André, Antônio e Christoffer. Obrigado pelo amizade, momentos de alegria, de ajuda em todos os aspectos.

Aos meus sempre amigos de Franca (SP): Anderson, André, Paulo Roberto, Poliana, Reginaldo, Ricardo, Taís e Vivian. Eternos!

Ao pessoal do Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie (Halle an der Saale, Alemanha) pelo apoio durante o estágio de doutorado-sanduiche, em especial à Kerstin Manke, pela seriedade, competencia para conduzir o trabalho. Danke schön!

Aos amigos que convivi na Alemanha e foram (e continuam, apesar da distância) grandes companheiros: Adama, Ana Áurea, Ana Dionéia, Bruno, Chris, Christopher, Francislene, Ingrid, João, Juliana, Kusti, Mariana, Márcia, Márcio, Marcos, Rosana, Stefanie, Sven.

Aos alunos de iniciação que auxiliei na orientação: Francine, Keila, Michely e Renan. Aprendi muito com vocês!

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate (ESALQ – USP – Piracicaba) pela disposição em colaborar nos experimentos de análise proteômica e pelas discussões.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues (UFSCar – São Carlos) e a doutoranda Taicia Pacheco Fill pela colaboração nas análises de amostras por Espectrometria de Massas.

Ao Nivaldo Boralle, Hélia dos Santos Raphael, Alberto Camilo Alécio e Marcos Alves pela pelos auxílios em experimentos e amizade.

As secretárias da diretoria do IQ-UNESP Cíntia e Shirley pela amizade, competência, paciência, eficiência e simpatia!

Ao professor de inglês Juninho Basque e à professora de alemão Jutta Osthues: muito obrigado por toda gentileza e ensinamentos.

Aos funcionários do IQ por contribuírem ao bom funcionamento do Instituto, especialmente ao pessoal da segurança, da biblioteca e da seção de pós-graduação pela proximidade e toda a ajuda.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desta tese.

À CAPES, FAPESP e ao DAAD pelas bolsas de estudo concedidas.

SUMÁRIO

I - ESTUDO BIOSSINTÉTICO EM ESPÉCIES DE PIPERACEAE

1. INTRODUÇÃO.....	33
1.1. Família Piperaceae e o gênero <i>Piper</i>	33
1.2. Produtos naturais e estudos biossintéticos.....	35
1.3. Biossíntese de piperamidas em espécies de Piperaceae	36
2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	41
2.1. Incorporação de precursores marcados	41
2.2. Síntese de possíveis precursores biossintéticos	43
2.2.1. Primeira etapa: proteção da hidroxila fenólica	43
2.2.2. Segunda etapa: reação de olefinação de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) Procedimento utilizando trietilfosfonoacetato	44
2.2.3. Terceira etapa: desproteção do grupo fenol com TBAF (fluoreto de tetra-N-butilamônio)	44
2.2.4. Quarta etapa: Hidrólise do éster	45
2.2.5. Quinta etapa: Preparação de uma amida piperidínica.....	45
2.3. Preparação de extratos enzimáticos e monitoramento de atividade enzimática	45
2.3.1. Protocolo para obtenção de extrato enzimático (fração microsomal) para monitoramento da atividade da enzima C4H (cinamato 4-hidroxilase) e outras enzimas oxidoredutases de tipo P450	45
2.3.2. Monitoramento da atividade enzimática da PAL (fenilalanina amônia liase) e TAL (tirosina amônia liase) em folhas de plantas adultas de <i>P. tuberculatum</i>	47
2.3.3. Monitoramento da atividade de enzimas oxidoredutases do tipo P450: conversão do grupo 4-hidroxi-3-metóxfenil ao grupo metilenodioxílico utilizando fração microsomal de <i>P.</i> <i>nigrum</i>	49
2.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (monodimensional)	51
2.4.1. Soluções e reagentes necessários	51
2.4.2. Preparo das amostras e dos padrões	52
2.4.3. Preparo, desenvolvimento e revelação do gel	53
2.4.4. Revelação do gel.....	54
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	55
3.1. Síntese de precursores biossintéticos	55
3.2. Elucidação estrutural das substâncias preparadas.....	55
3.3. Monitoramento de atividade enzimática	71
3.4. Monitoramento da presença de ácido 3,4-metilenodioxicinâmico em frutos de <i>P. nigrum</i> ..	82
3.5. Incorporação de precursores marcados com isótopos estáveis	84

II - ESTUDO DO TRANSCRIPTOMA DE FRUTOS DE *Piper nigrum* L.

1. INTRODUÇÃO.....	96
1.1. Da genética a biologia molecular: evolução científica.....	96
1.2. Produtos naturais e a biologia molecular.....	101
1.3. <i>Piper nigrum</i> e aspectos genéticos.....	103
2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	105
2.1. Construção de uma biblioteca de cDNA.....	105
2.1.1. Preparação de extrato de tecidos de <i>P. nigrum</i> para quantificação de piperina	106
2.1.2. Extração de RNA total de frutos de <i>P. nigrum</i>	107
2.1.3. Purificação e concentração de RNA (Clean-up, kit QIAGEN®).....	108
2.1.4. RT-PCR: Síntese de cDNA pela técnica de extensão do primer (Kit Clontech In-Fusion TM SMARTer TM cDNA Library Construction).....	109
2.1.5. Purificação de cDNA (em mini-colunas de CromaSpin 1000)	111
2.1.6. Ligaçã.....	112
2.1.7. Transformaçã.....	113
2.1.8. Preparação do meio LB - ampicilina e seleção de colônias para crescimento	114
2.1.9. Preparação do meio LB - ampicilina e placas para plaqueamento	114
2.1.10. Titulaçã da biblioteca de cDNA	115
2.1.11. Purificaçã de plasmídeos	115
2.1.12. Digestã de vetores com enzimas de restriçã	116
2.1.13. Sequenciamento de DNA	117
2.1.14. Bioinformática: identificaçã das sequencias e categorizaçã funcional	117
2.2. Tentativas de amplificaçã utilizando <i>primers</i> degenerados.....	118
2.2.1. Protocolo para obtençã de cDNA a partir de RNA total.....	118
2.2.2. Desenho de primers	119
2.2.3. <i>Primers</i> de controle positivo para os experimenros de PCR	119
2.2.4. PCR (modo gradiente).....	119
2.2.5. Preparaçã de gel de agarose (1,5 %) para análise dos produtos de PCR.....	120
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	121
3.1. Construçã da biblioteca de cDNA a partir de RNA isolado de frutos de <i>Piper nigrum</i> , sequenciamento de DNA e análise das informaçõs obtidas	121
3.2. Tentativa de amplificaçã do cDNA utilizando primers degenerados	132

III – ANÁLISE PROTEÔMICA DE ESPÉCIES DE PIPERACEAE

1. INTRODUÇÃO.....	138
1.1. Proteômica.....	138

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	144
2.1. Obtenção de extratos protéicos.....	144
2.1.1. Protocolo para obtenção de extrato microsomal de <i>P. tuberculatum</i>	144
2.1.2. Protocolo para obtenção de extrato microsomal de <i>P. crassinervium</i>	144
2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (monodimensional)	145
2.3. Eletroforese bidimensional (IEF/SDS-PAGE)	145
2.4. Revelação do gel com Comassie Brilliant Blue G-250.....	152
2.5. Preparo de amostra para identificação por espectrometria de massas	153
2.6. <i>Clean-up</i> das misturas de peptídeos para espectrometria de massas.....	154
2.7. Análise por CLAE-EM	155
2.8. Tratamento de dados no programa MASCOT	155
2.9. Complementação de informações utilizando o banco de dados UniProt	156
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	157
3.1. Análise proteômica	157
 IV - CONCLUSÕES	 176
 REFERÊNCIAS	 181
 ANEXOS.....	 192

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: 1. <i>Piper tuberculatum</i> Jacq. (pimenta-d'arda); 2. <i>Piper nigrum</i> L. (pimenta-do-reino).	34
Figura 1.2: Amidas acumuladas em <i>P. tuberculatum</i> e <i>P. nigrum</i>	34
Figura 1.3: Enzimas envolvidas no metabolismo de fenilpropanóides	37
Figura 1.4: Proposta mecanística de formação do grupo metilenodioxílico	38
Figura 1.5: Outra proposta para formação do grupo metilenodioxílico	39
Figura 1.6: Formação da isoflavona pseudobaptigenina em <i>Cicer arietinum</i> (Fabaceae).....	39
Figura 1.7: Proposta biossintética de formação de amida piperina em <i>P. tuberculatum</i>	40
Figura 1.8: Plântulas de <i>Piper tuberculatum</i>	41
Figura 1.9: Padrões isolados de <i>P. tuberculatum</i>	42
Figura 1.10: Precursores ácido ferupérico (f) e feruperina (g)	43
Figura 1.11: Curva de calibração utilizando albumina como padrão protéico	49
Figura 1.12: Rota sintética adotada para a síntese dos precursores f e g	55
Figura 1.13: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância b	57
Figura 1.14: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância b	58
Figura 1.15: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância b	59
Figura 1.16: Espectro de Massas da substância b (EI, modo positivo)	60
Figura 1.17: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , δ 7,1; 300 MHz) da substância d	61
Figura 1.18: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) da substância d	62
Figura 1.19: Espectro de Massas da substância d (modo positivo)	63
Figura 1.20: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância e	64
Figura 1.21: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância e	65
Figura 1.22: Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) da substância f	66
Figura 1.23: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (DMSO , 400 MHz) da substância f	67
Figura 1.24: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO , 100 MHz) da substância f	67
Figura 1.25: Espectro de Massas da substância f (modo negativo)	68
Figura 1.26: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância g	69
Figura 1.27: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância g	70
Figura 1.28: Espectro de Massas da substância g (modo negativo)	71
Figura 1.29: Possibilidades de formação do ácido p-cumárico.....	72
Figura 1.30: Cromatogramas	72
Figura 1.31: Cromatogramas	73
Figura 1.32: Participação da enzima C4H na biossíntese de fenilpropanóides	73
Figura 1.33: Estabelecimento de condição cromatográfica para o ácido p-cumárico.	73
Figura 1.34: Conversão do ácido ferúlico ai ácido 3,4-metilenodioxicinâmico	76
Figura 1.35: Cromatograma 1 (CLAE) do ácido ferúlico (t_R = 3,40 minutos)	77

Figura 1.36: Cromatograma 2 (CLAE) da mistura do ácido ferúlico (t_R = 3,40 minutos) com o ácido 3,4-metilenodioxicinâmico (t_R = 7,40 minutos)	77
Figura 1.37: Cromatograma 3 (CLAE) da fração microsomal (branco), que mostra a presença de endógenos... ..	78
Figura 1.38: Cromatograma 4 (CLAE) do sobrenadante (branco), que mostra a presença de endógenos... ..	78
Figura 1.39: Cromatograma 5 (CLAE) dos reagentes utilizados na reação do ácido ferúlico	79
Figura 1.40: Cromatograma 6 (CLAE) da reação	79
Figura 1.41: Cromatograma 7 (CLAE) da reação do ácido ferúlico com o sobrenadante	80
Figura 1.42: Sobreposição dos cromatogramas 2, 3, 4, 5, 6 e 7	80
Figura 1.43: Cromatogramas do ácido 3,4-metilenodioxicinâmico/ácido ferúlico.....	81
Figura 1.44: Cromatogramas do ácido 3,4-metilenodioxicinâmico/ácido ferúlico.....	81
Figura 1.44: Reações enzimáticas – precursores incubados com extrato enzimático dos frutos de <i>P. nigrum</i>	82
Figura 1.46: Cromatograma mostrando tempo de retenção (t_R = 5.90 min.) do ácido 3,4-metilenodioxicinâmico	83
Figura 1.47: Cromatograma obtido para o extrato bruto de frutos de <i>P. nigrum</i>	83
Figura 1.48: Espectro no UV-Visível para o pico em t_R = 5,9 min. no extrato bruto	84
Figura 1.49: Cromatogramas para fagaramida (t_R = 22,08 min.) pelitorina (t_R = 45,62 min.); diidropiperlongumina (t_R = 32,35 min.); piperina (t_R = 42,88 min.); diidropiperina (t_R = 43,65min.).	85
Figura 1.50: Espectro de massas da amida diidropiperina (1).....	86
Figura 1.51: Espectro de massas da amida diidropiperlunguminina (2)	86
Figura 1.52: Espectro de massas da amida pelitorina (5).....	86
Figura 1.53: Espectro de massas da amida piperina (6)	87
Figura 1.54: Espectro de massas da amida faragamida (7)	87
Figura 1.54: Cromatograma do extrato marcado com U- ² H-malônico.UV-ViS (superior) e TIC (inferior).....	88
Figura 1.55: Comparação dos TICs do extrato de <i>P. tuberculatum</i> sem incorporação (inferior) e marcado com U- ² H-malônico (superior).	88
Figura 1.56: Proposta biogenética do piperil-CoA (derivado C6-C5) a partir de um intermediário C6-C3 (ácido 3,4-metilenodioxicinâmico) e ácido malônico.	89
Figura 1.57: Estrutura, fórmula molecular e massa molecular da amida piperlonguminina	89
Figura 1.58: Fragmentograma mostrando enriquecimento isotópico da substância piperlonguminina.....	90
Figura 1.59: Espectro de massas da substância piperlongumina	90
Figura 1.60: Espectro de massas da substância piperlongumina enriquecida com deutério (proveniente do ácido malônico-U- ² H) na posição α -carbonila	90

Figura 1.61: Espectro de massas da substância piperlongumina enriquecida com carbono-13 (proveniente do 2-[¹³ C]-ácido malônico) na posição α-carbonila	91
Figura 1.62: Proposta para fragmentação da amida piperlonguminina	91
Figura 1.63: Participação da L-valina na biossíntese de alguns produtos naturais	92
Figura 1.64: Proposta biogenética de formação de amidas isobutílicas em <i>P. tuberculatum</i>	92
Figura 1.65: Amidas de <i>P. tuberculatum</i> que possuem o grupo N-isobutílico.	93
Figura 1.66: Comparação do TIC dos cromatogramas do extrato de <i>P. tuberculatum</i> incorporado com L- ¹⁵ N-valina (inferior) e sem incorporar (superior).	93
Figura 2.1: Evolução dos custos X capacidade dos métodos de sequenciamento	98
Figura 2.2: Genomas sequenciados	99
Figura 2.3: Esquema geral do processamento de um gene eucarioto.....	100
Figura 2.4: Etapas para a construção de uma biblioteca de cDNA.....	100
Figura 2.5: Diversidade de enzimas de interesse biotecnológico envolvidas nas vias biossintéticas de amidas em <i>P. nigrum</i> e <i>P. tuberculatum</i>	104
Figura 2.6: Purificação de mRNA.....	109
Figura 2.7: Integrantes do kit: 1. coluna cromatográfica; 2. tubo de adaptação; 3. tubo para adaptação ao rotor	111
Figura 2.8: Vetor (pSMART2IF) utilizado no processo de clonagem	113
Figura 2.9: Transformação: 1. Aparelho de eletroporação; 2. Câmara de agitação; 3. Incubadora (37°C).....	114
Figura 2.10: Contagem visual para estimativa do número de colônias de bactérias modificadas	115
Figura 2.11: Cromatograma: piperina (padrão) – tempo de retenção	121
Figura 2.12: Cromatograma: Análise do extrato de galhos jovens de <i>P. nigrum</i> – ausência de piperina	122
Figura 2.13: Cromatograma: análise do extrato de folhas jovens de <i>P. nigrum</i> – ausência de piperina.....	122
Figura 2.14: Cromatograma: análise do extrato de frutos jovens de <i>P. nigrum</i> – alta concentração de piperina... ..	122
Figura 2.15: Perfil eletroforético do RNA total extraído de frutos de <i>P. nigrum</i> em gel de agarose 1,2%.....	123
Figura 2.16: Análise dos clones após digestão e purificação; dados estatísticos: 230 fragmentos analisados	124
Figura 2.17: Categorização da biblioteca de cDNA de <i>P. nigrum</i> de acordo com o Gene Ontology.....	128
Figura 2.18: Categorização da biblioteca de cDNA de <i>P. nigrum</i> de acordo com o Gene Ontology (considerando os genes sem identificação).	128
Figura 2.19: Reação catalisada pela enzima carbamoil fosfato sintase (CPS)	129
Figura 2.20: Reação catalisada pela enzima antranilato fosforribosiltransferase (APT)	130

Figura 2.21: Reação catalizada pela enzima desidroflavonol 4-redutase (DFR)	131
Figura 2.22: Possibilidade de participação de uma enzima com a mesma função de chalcona sintase.....	133
Figura 2.23: Possível reação catalizada por uma aciltransferase	133
Figura 2.24: Comparação entre sequencias de aminoácidos para BAHD	134
Figura 2.25: Reação catalizada pela enzima cafeoil CoA O-metiltransferase (CCoAOMT)	134
Figura 2.26: Comparação entre sequencias de várias espécies vegetais	134
Figura 2.27: Reação catalizada pela enzima cinamato 4-hidroxilase (C4H)	135
Figura 2.28: Comparação entre sequencias para C4H de várias espécies vegetais	135
Figura 2.29: Comparação entre sequencias para PAL para várias espécies vegetais	135
Figura 2.30: Reação catalizada pela enzima fenilalanina amonia liase (PAL)	136
Figura 2.31: Produto de PCR a 54,9°C e 55,9°C (Biblioteca de cDNA e <i>primers</i> para PAL), indicado pelas setas brancas	136
Figura 3.1: As interações entre os elementos moleculares básicos dos sistemas biológicos. ...	138
Figura 3.2: Compartimentalização de processos biológicos e vias biossintéticas em diferentes compartimentos vegetais	140
Figura 3.3: Contribuição de diferentes espécies de plantas na base de dados UniProt	141
Figura 3.4: Aplicação de estratégias de proteômica quantitativa para plantas na elucidação de questões biológicas.	142
Figura 3.5: Fotografia do ETTAN™ IPGphor II (Amersham Biosciences).	148
Figura 3.6: Montagem do sistema para experimento de eletroforese bidimensional	151
Figura 3.7: Cuba eletroforética para experimento de eletroforese bidimensional	151
Figura 3.8: Proteínas das folhas de <i>P. tuberculatum</i>	158
Figura 3.9: Proteínas das sementes de <i>P. tuberculatum</i>	158
Figura 3.10: Atuação da enzima oxidoredutase IFR na biossíntese de isoflavonas	169
Figura 3.11: Atuação da enzima malato desidrogenase no ciclo de Krebs.....	170
Figura 3.12: Atuação da enzima TPI (triose fosfato isomerase) na glicólise.....	171
Figura 3.13: Exemplo de metilação catalizada por uma enzima OMT	171
Figura 3.14: Espécimen de <i>P. tuberculatum</i> submetida a diversidade de fatores que afetam diretamente a expressão de proteínas	173
Figura 3.15: Categorização da identidade de proteínas de folhas de <i>P. tuberculatum</i> de acordo com o UniPROT.....	174
Figura 3.16: Categorização da identidade de proteínas de sementes de <i>P. tuberculatum</i> de acordo com o UniProt.....	174
Figura 3.17: Categorização da identidade de proteínas de folhas de <i>P. crassinervium</i> de acordo com o UniPROT	175
Figura 4.1: Biossíntese de piperamidas	177
Figura 4.2: Biologia de sistemas x aspectos estudados em três espécies de Piperaceae.....	180

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Metabólitos isolados de <i>P. tuberculatum</i> utilizados como padrões.....	42
Tabela 1.2: Quantidades dos reagentes utilizados na reação enzimática.....	46
Tabela 1.3: Construção de curva de calibração utilizando albumina sérica	48
Tabela 1.4: Concentração da fração microssomal.....	50
Tabela 1.5: Reagentes usados na reação enzimática	50
Tabela 1.6: Reagentes utilizados na reação enzimática	50
Tabela 1.7: Padrão protéico utilizado no experimento de eletroforese e suas respectivas massas moleculares (em kDa).....	52
Tabela 1.8: Cromatogramas das análises em CLAE	76
Tabela 2.1: Eventos que marcaram a evolução da genética e da biologia molecular	97
Tabela 2.2: Amostras analisadas	106
Tabela 2.3: Condições de análise por CLAE	107
Tabela 2.4: Genes identificados em <i>Piper nigrum</i>	124
Tabela 3.1: Solução de reidratação (sem adição do IPG buffer).....	145
Tabela 3.2: Tampão de equilíbrio	146
Tabela 3.3: Solução estoque de acrilamida-bisacrilamida	146
Tabela 3.4: Tampão de resolução (4x).....	146
Tabela 3.5: Solução SDS 10%	146
Tabela 3.6: Solução persulfato de amônia 10%	146
Tabela 3.7: Tampão de corrida.....	146
Tabela 3.8: Solução de agarose.....	147
Tabela 3.9: Solução estoque de azul de bromofenol (1%).....	147
Tabela 3.10: Protocolo de focalização isoeletrica aplicado. (Tiras de 13 cm, gradientes de pH 3-10L).	149
Tabela 3.11: Reagentes e proporções necessários para preparar 100 mL de gel de poliacrilamida 12,5%	149
Tabela 3.12: Padrão protéico utilizado no experimento de eletroforese e suas respectivas massas moleculares (em KDa).....	150
Tabela 3.13: Proteínas de <i>P. tuberculatum</i> e <i>P. crassinervium</i>	160

LISTA DE TABELAS E FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1.1: Obtenção do extrato enzimático de folhas de <i>P. tuberculatum</i>	47
Fluxograma 1.2: Etapas envolvidas na revelação do gel SDS-PAGE utilizando AgNO ₃ como agente revelador.....	54
Fluxograma 2.1: Diagrama de fluxo simplificado das etapas envolvidas na obtenção de uma biblioteca de cDNA a partir do RNA total de frutos de <i>P. nigrum</i>	105
Fluxograma 2.2: Primeira etapas para obtenção de cDNA para construção da biblioteca	110
Fluxograma 2.3: Protocolo para obtenção de cDNA a partir de RNA total (Fermentas).....	118
Fluxograma 3.1: Resumo de metodologias utilizadas desde a preparação da amostra até a análise por CLAE-EM.....	154

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

2D-SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio bidimensional
ACN	acetonitrila
ADP	difosfato de adenosina
AMBIC	bicarbonato de amônio
ATP	trifosfato de adenosina
BAHD	aciltransferase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C4H	cinamato 4-hidroxilase
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa
CCSG	cromatografia em coluna utilizando sílica gel
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propanosulfonato
CHS	chalcona sintase
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CoA	coenzima A
COMT	cateol CoA metiltransferase
<i>d</i>	duplete
<i>dd</i>	duplo duplete
<i>ddd</i>	duplo duplo duplete
DAD	detector de arranjo de diodos
DCC	dicicloexilcarbodiimida
DIC	diisopropilcarbodiimida
DMSO-<i>d</i>₆	dimetilsulfóxido deuterado
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP's	desoxirribonucleotídeos fosfatados (adenina, citosina, guanina e timina)
DTT	ditiotretol
<i>E</i>	contrário (do alemão <i>Entgegen</i>)
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EM	espectrometria de massas
<i>enc</i>	enterocin biosynthesis gene cluster
ERO	espécies reativas de oxigênio
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FA	ácido fluorídrico
g	grama
<i>g</i>	Gauss

gi	número de identidade genética
HAc	ácido acético
HOBt	hidroxibenzotriazol
HSP	<i>Heat shock protein</i>
HWE	reação de Horner-Wadsworth-Emmons
Hz	Hertz
IAA	iodoacetamida
ID	identidade da proteína
IEF	focalização isoelétrica
IPTG	isopropil β-D-1-tiogalatopiranosídeo
<i>J</i>	constante de acoplamento
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LAR	resistência adquirida localizada
LB	meio Luria-Bertani
m	metro
M	molar (mol.L ⁻¹)
<i>m</i>	múltiplo
mA	miliAmpère
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>
mg	miligrama
MHz	megahertz
mL	mililitro
mm	milímetro
M-MuLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
M_r	massa molecular relativa
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
MS/MS	<i>tandem mass spectrometry</i>
<i>m/z</i>	razão massa carga
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
nm	nanometro
OMT	O-metiltransferase
PAH	fenilalanina hidroxilase
PAL	fenilalanina amônia liase
pb	par de base

PCR	reação em cadeia da polimerase
PCIA	solução fenol-clorofórmio
pH	potencial hidrogeniônico
pI	ponto isoelétrico
PKS	policetídeo sintase
PLP	fosfato de piridoxal
PN	produto(s) natural(is)
PSA	persulfato de amônio
p/v	peso por volume
PVPP	polivinilpirrolidona
q	quadrupeto
Q-TOF	<i>Quadrupole - Time of Flight Mass Spectrometry</i>
(R)	direito (do latim <i>Rectus</i>)
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio um
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze
rpm	rotações por minuto
rRNA	ácido ribonucléico ribossômico
RT-PCR	reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
RuBisCO	ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase
s	simpleto
(S)	esquerdo (do latim <i>Sinister</i>)
SAM	S-adenosilmetionina
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio
sl	simpleto largo
S_N2	substituição nucleofílica bimolecular
SOC	meio nutritivo com triptona, extrato de levedura, NaCl e glicose
t	tripleto
TAL	tirosina amônia liase
TBAF	fluoreto de tetra-N-butilamonio
TBS	terc-butildimetilsilila
TBSOTf	terc-butildimetilsililtriflato
TBE	tampão Tris-Borato-EDTA
TCA	ácido tricloroacético
TE	tampão Tris-EDTA
TEMED	tetrametiletenodiamina
TFA	ácido trifluoracético
THF	tetraidrofurano

TIC	cromatograma de íons totais
TMS	tetrametilsilano
ToF	time of flight
t_R	tempo de retenção
TRIS	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
tRNA	ácido ribonucléico transportador
U	unidade de concentração enzimática
U-²H	uniformemente marcado com deutério
UFC	unidade formadora de colônia
UV	ultravioleta
V	Volt
v/v	volume por volume
W	Watt
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galatopiranosídeo
Z	juntos (do alemão <i>Zusammen</i>)
λ	comprimento de onda
δ	deslocamento químico
(+)	dextrorrotatório (rotação no sentido horário)
(-)	levorrotatório (rotação no sentido anti-horário)

RESUMO

Três espécies de *Piper* foram escolhidas como modelos para estudos biossintéticos, transcriptômicos e proteômicos: *P. tuberculatum*, *P. nigrum* e *P. crassinervium*. As duas primeiras espécies acumulam principalmente metabólitos secundários da classe das amidas e essas substâncias foram alvo de experimentos biossintéticos. Foram monitoradas as atividades de diversas enzimas envolvidas na via fenilpropanoídica, dentre elas a fenilalanina amônia liase (PAL) e a cinamato 4-hidroxilase (C4H). Observou-se também atividade de uma enzima que catalisa a conversão do ácido ferúlico ao ácido 3,4-metilenodioxicinâmico, denominada 3,4-metilenodioxicinâmico sintase. Esta é provavelmente uma enzima monooxigenase-dependente do citocromo P450. A principal questão biossintética está centrada na sequência na qual as reações ocorrem: o grupo metilenodioxílico pode ser formado antes ou depois da porção amídica. Para elucidar esta questão, sintetizou-se dois possíveis precursores contendo o grupo 4-hidróxi-3-metóxi-fenílico: o ácido ferupérico e a feruperina. No entanto, experimentos de atividade enzimática *in vitro* utilizando estes dois precursores não foram esclarecedores, devido a existência de piperina endógena no extrato enzimático proveniente de folhas de *P. nigrum*, o que impediu observar a formação de produto. Foi avaliado também a participação de ácido malônico e L-valina na biossíntese destas amidas: incorporou-se precursores isotopicamente marcados em plântulas de *P. tuberculatum*: ácido 2-[¹³C]-malônico, ácido malônico-U-²H e ¹⁵N-L-valina). Após análise por CLAE-EM, conclui-se que o ácido malônico participa da reação de condensação com fenilpropanóides, gerando os derivados C₆-C₅ e L-valina é precursor do grupo isobutilamina. Considerando todos as evidências experimentais, a proposta biossintética infere que o grupo metilenodioxifenílico é formado antes da formação da porção amídica. Realizou-se o estudo proteômico de folhas e frutos de *P. tuberculatum* e *P. crassinervium*, sendo que esta última acumula derivados prenilados do ácido benzóico como principais metabólitos secundários. Os extratos protéicos foram analisados por 2D-SDS-PAGE e ESI-Q-ToF e foram identificadas diversas proteínas que estão envolvidas em processos/mecanismos de defesa do organismo vegetal frente a estresses biótico e abiótico, além de algumas enzimas do metabolismo secundário e de importância econômica. Finalmente, construiu-se uma biblioteca de cDNA a partir de RNA total extraído de frutos de *P. nigrum* e foram identificados genes envolvidos em metabolismo primário e secundário. A partir da exploração da biblioteca de cDNA, 230 plasmídeos foram purificados e 40 clones sequenciados. Tentativas de amplificação utilizando *primers* degenerados de diversas enzimas foram realizadas: aciltransferase (BAHD), cafeoil-CoA O-metiltransferase (CCoACOMT), chalcona sintase (CHS), cinamato 4-hidroxilase (C4H) e fenilalanina amônia liase (PAL), mas nenhuma sequência foi amplificada, sugerindo a necessidade de sequenciamento do genoma funcional desta espécie.

Palavras chaves: biossíntese, transcriptômica, proteômica, Piperaceae

ABSTRACT

Three *Piper* species were chosen as models for biosynthetic, transcriptomic and proteomics studies: *P. tuberculatum*, *P. nigrum* and *P. crassinervium*. The first two species accumulate mainly amides as secondary metabolites. This class of compounds was targeted by biosynthetic experiments. It was monitored the enzymatic activities of several enzymes involved in the phenylpropanoid pathway, including phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase. It was also observed the activity of an enzyme that catalyzes the conversion of ferulic acid to 3,4-methylenedioxycinnamic acid, named 3,4 methylenedioxycinnamic acid synthase. The main question was centered on the biosynthetic sequence: whether the methylenedioxy group can be formed before or after the amide portion. In order to elucidate this question, two possible precursors containing the group 4-hydroxy-3-methoxyphenyl were synthesized: feruperic acid and feruperine. However, experiments of *in vitro* enzymatic activity using these two precursors were not enlightening, due to the existence of piperine as endogenous in the enzymatic extract from leaves of *P. nigrum*, which prevented observe the formation of product. It was also evaluate the participation of malonic acid and L-valine in the biosynthesis of these amides, by incorporating isotopically labeled precursors in plants of *P. tuberculatum*: 2- $[^{13}\text{C}]$ -malonic acid, malonic- $\text{U-}^2\text{H}$ acid and ^{15}N -L-valine. After analysis by HPLC-MS, it was concluded that the malonic acid participates in the condensation reaction with phenylpropanoids, generating the $\text{C}_6\text{-C}_5$ derivatives and L-valine is the putative precursor of the isobutylamine group. Considering all the experimental evidence, the biosynthetic pathway proposed was that in which the methylenedioxy group is formed before the amide. In the second step, it carried out the proteomic study of leaves and fruits of *P. tuberculatum* and *P. crassinervium*, and this latter accumulates prenylated benzoic acid derivatives as main secondary metabolites. The extracted proteins were analyzed by 2D-SDS-PAGE and ESI-Q-ToF and were identified several proteins that are involved in processes/mechanisms of plant defense against biotic and abiotic stresses, and some enzymes of secondary metabolism as well some of them with economic importance. Finally, a cDNA library was constructed from total RNA extracted of *P. nigrum* fruits and several genes involved in primary and secondary metabolism were identified. From this cDNA library, 230 plasmids were purified and 40 clones were sequenced. Attempts of amplification using degenerate primers were performed to several enzymes: acyltransferase (BAHD), caffeoyl-CoA O-methyltransferase (CCoAOMT), chalcone synthase (CHS), cinnamate 4-hydroxylase (C4H) and phenylalanine ammonia lyase (PAL), but no sequence was amplified, suggesting the need for functional genome sequencing of this species.

Keywords: Biosynthesis, transcriptomic, proteomic, Piperaceae

ZUSAMMENFASSUNG

Drei *Piper* Arten wurden als Modelle für Biosynthese, Transkript-Analytik und Proteom-Studien gewählt: *P. tuberculatum*, *P. nigrum* und *P. crassinervium*. Die ersten beiden Arten reichern vor allem Amide als sekundäre Pflanzenstoffe. Diese Klasse von Verbindungen wurde hinsichtlich ihrer Biosynthese im Detail analysiert. Dabei waren insbesondere die enzymatischen Aktivitäten verschiedener Enzyme in der Phenylpropanoid Weg, darunter Phenylalanin-Ammoniak-Lyase und Cinnamat-4-Hydroxylase. Es wurde auch die Aktivität eines Enzyms beobachtet, dass die Umwandlung von Ferulasäure zu 3,4-methylenedioxycinnaminsäure katalysieren kann. Dieses Enzym, eine 3,4-methylenedioxycinnamic-Synthase, ist wahrscheinlich ein Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase. Um die wichtige Frage zu klären, ob die Methylenedioxygruppe auf der Stufe der Säure, des aktivierten Esters oder erst auf der Ebene des Amids gebildet wird. Zwei mögliche Vorstufen aus der Gruppe der 4-Hydroxy-3-methoxyphenylpropane wurden synthetisiert: Feruperinsäure und Feruperine. *In vitro* durchgeführte enzymatische Untersuchungen auf P450-Enzymaktivität mit diesen beiden Vorläufern waren nicht aufschlussreich, aufgrund großer Mengen von Piperin als endogene Substanz in enzymatischen Extrakten aus den Früchte von *P. nigrum*, die eine direkte Beobachtung der Produktbildung verhinderten. Dagegen wurde die Beteiligung von Malonsäure und L-Valin in der Biosynthese dieser Amide belegt, indem isotope markierten Vorstufen in Pflanzen von *P. tuberculatum*: 2- $[^{13}\text{C}]$ -Malonsäure-, Malon- $\text{U-}^2\text{H}$ -Säure und ^{15}N -L-Valin appliziert wurden. Nach der Analyse mittels HPLC-MS, wurde der Schluss gezogen, dass die Malonsäure an der notwendigen Kondensationsreaktion der Phenylpropanoid-Biosynthese beteiligt ist und $\text{C}_6\text{-C}_5$ -Derivate gebildet werden können. L-Valin ist der vermeintliche Vorläufer des Isobutylamin Gruppe. Unter Berücksichtigung aller experimentellen Beweise, wurde für den Biosyntheseweg vorgeschlagen, dass die Methylenedioxygruppe vor dem Amid gebildet wird. In einem weiteren Projekt, sollte eine Proteom-Studie von Blättern und Früchten von *P. tuberculatum* und *P. crassinervium*, durchgeführt werden. *P. crassinervium* akkumuliert prenylierte Benzoessäurederivate als wichtige Sekundärmetabolite. Die extrahierten Proteine wurden durch 2D-SDS-PAGE und ESI-Q-ToF-MS analysiert und mehrere Proteine identifiziert, die in Prozessen/Mechanismen der pflanzlichen Abwehr gegen biotische und abiotische Stressfaktoren beteiligt sein könnten, dazu Enzyme des Sekundärstoffwechsel und Proteine von wirtschaftlicher Bedeutung. Schließlich, wurde eine cDNA-Bibliothek aus mRNA von *P. nigrum* Beeren erstellt, und die Gene und entsprechende Proteine zu identifizieren, die an der Bildung der Piperamid beteiligt sind. Aus dieser cDNA-Bibliothek wurden 230 Plasmide mit cDNAs entsprechender Größe gereinigt, die für die gesuchte Acyltransferase (BAHD), Kaffeoil-CoA O-Methyltransferase (CCoAOMT), Chalkonsynthase (CHS), Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) und Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) codieren können. Keines der analysierten Plasmide (40 Kandidaten) enthielt die gesuchte Sequenzen. Die Amplifikation der Gene direkt unter Verwendung von degenerierten Primern war ebenfalls nicht erfolgreich. Die Schwierigkeiten, Sequenzinformation interessanter Biosynthesewege mit Hilfe etablierter Technologien zu erhalten, machen die Anwendung von modernen

Hochdurchsatz-Sequenzierverfahren zur funktionellen Genom-Analyse dieser Spezies absolut erforderlich

Schlüsselwörter: Biosynthese, Transkriptom, Proteom, Piperaceae

EPÍGRAFE

Trabalho solitário

“Minha força está na solidão. Não tenho medo nem de chuvas tempestivas nem de grandes ventanias soltas, pois eu também sou o escuro da noite.”

(Clarice Lispector)

Trabalho solidário

“Eu vivo muito alegre, muito feliz, trabalho, tenho sempre muita gente em volta de mim, muita, muita gente na minha vida, é disso que eu gosto”

(Chico Xavier)

OBJETIVO GERAL

Aplicar conceitos dinâmicos da Química de Produtos Naturais na elucidação da via biossintética das piperamidas em espécies de Piperaceae: abordagem dos aspectos mecanísticos, proteômicos e genômicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- sintetizar os possíveis precursores biossintéticos da amida piperina;
- elucidar a via biossintética de formação do grupo metilenodioxílico, a partir da reação de precursores sintéticos e comerciais com extratos enzimáticos provenientes das folhas de *P. tuberculatum* e *P. nigrum*;
- analisar o proteoma de *P. tuberculatum* em busca principalmente de enzimas envolvidas no metabolismo secundário;
- construir uma biblioteca de cDNA a partir de RNA total de frutos de *P. nigrum*, realizar o sequenciamento de material genético e identificação de genes;
- utilizar *primers* degenerados para amplificar genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo secundário de *P. nigrum*.

PARTE I

ESTUDO BIOSSINTÉTICO EM ESPÉCIES DE PIPERACEAE

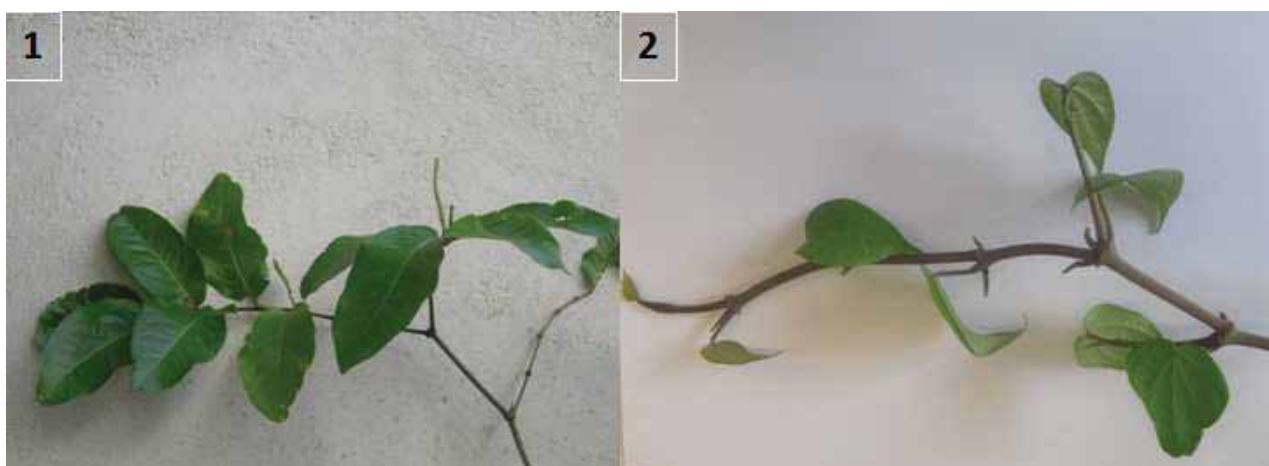
1. INTRODUÇÃO

1.1. Família Piperaceae e o gênero *Piper*

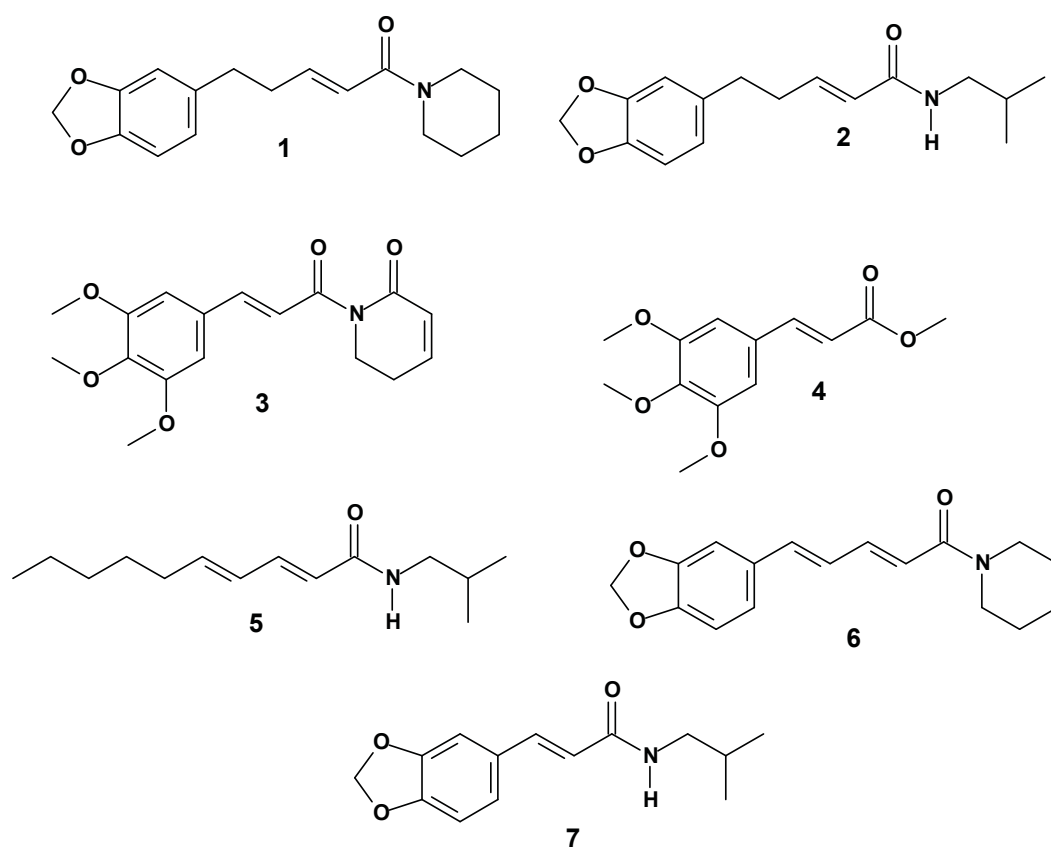
A família Piperaceae, juntamente com Aristolochiaceae, Saururaceae e Lactoridaceae são classificadas entre as mais primitivas das Angiospermas (KATO e FURLAN, 2007). Esta família compreende mais de 4000 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, sendo que a maioria de seus exemplares são arbustos ou trepadeiras que se agarram aos troncos das árvores por meio de raízes adventícias, raramente sendo encontradas árvores (LOPEZ et al. 2010). As espécies da família Piperaceae compreendem 5 gêneros: *Peperomia* Ruiz e Pavon (aproximadamente 1700 espécies), *Piper* L. (aproximadamente 2000 espécies), *Manekia* Trel. (anteriormente chamada de *Sarcorhachis*, 6 espécies), *Verhuellia* e *Zippelia* Blume (WANKE et al. 2007) e apresentam constituição química bastante diversificada, e consequentemente, tem sido alvo de numerosas investigações fitoquímicas. As principais classes de compostos descritos são as lignanas/neolignanas (PARMAR et al. 1997; FELIPPE et al. 2008; FELIPPE et al. 2011), amidas alifáticas e aromáticas (NAVICKIENE et al. 2000; SILVA et al. 2002; COTINGUIBA et al. 2009), policetídeos (CHENG et al. 2003), piperolídeos (LAGO et al. 2005; MARQUES et al. 2008), derivados do ácido benzóico (BALDOQUI et al. 1999; LAGO et al. 2004; BERGAMO et al. 2005, MORANDIM et al. 2005; LOPES et al. 2008), cromanos prenilados e cromenos (BALDOQUI et al. 1999; BATISTA JÚNIOR et al. 2008; MOTA et al. 2009).

O gênero *Piper* teve seu primeiro estudo químico em 1819 quando foi isolada a piperamida piperina, um princípio ativo pungente da pimenta-do-reino, *Piper nigrum*. As espécies do gênero *Piper* encontram-se largamente distribuídas nos dois hemisférios e têm uma notável importância em fitoquímica, atividade etnobotânica e biológica. Atualmente, o estudo envolvendo espécies de *Piper* tem se intensificado devido às inúmeras substâncias de origem natural que foram e continuam sendo isoladas, muitas delas com importantes atividades biológicas, como por exemplo, atividade antifúngica, tripanocida, antiparasitária e antioxidante (PARMAR et al. 1997; NAVICKIENE et al. 2000; KATO e FURLAN, 2007; REGASINI et al. 2008; COTINGUIBA et al. 2009).

Piper tuberculatum Jacq. (pimenta d'arda) e *Piper nigrum* L. (pimenta-do-reino) (Figura 1.1) foram as duas espécies alvo de estudos biossintéticos neste trabalho, focando na compreensão de vias biossintéticas de amidas. As piperamidas (Figura 1.2), como também costumam serem denominadas, são compostos fenólicos derivados do ácido chiquímico, principal precursor de aminoácidos aromáticos. Estas substâncias podem ser classificadas como amidas piperidínicas (1 e 6), piperidônicas (3), isobutílicas (2, 5 e 7) e diméricas.

Figura 1.1: 1. *Piper tuberculatum* Jacq. (pimenta-d'arda); 2. *Piper nigrum* L. (pimenta-do-reino)

Fonte: arquivo pessoal (Fernando Cotinguiba)

Figura 1.2: Amidas acumuladas em *P. tuberculatum* e *P. nigrum*

1.2. Produtos naturais e estudos biossintéticos

Os organismos vivos produzem uma diversidade de substâncias cuja grande maioria parece não participar diretamente do seu crescimento e desenvolvimento. No entanto, a apreciação crescente dos diversos efeitos biológicos produzidos por estas substâncias, tradicionalmente denominadas metabólitos secundários, tem incitado uma reavaliação dos seus possíveis papéis, especialmente no contexto de interações ecológicas. Além disso, o reconhecimento das propriedades biológicas de ampla variedade de produtos naturais, termo empregado como sinônimo de metabólitos secundários, tem alimentado uma busca intensa por novos fármacos, antibióticos, inseticidas e herbicidas (MACEDO, 2007). Por estes motivos, a química de produtos naturais foi alvo de intensas investigações durante as últimas décadas, resultando no desenvolvimento de teorias biossintéticas e na compreensão dos mecanismos de ação de enzimas. Estas descobertas tiveram um grande impacto sobre a imaginação dos químicos orgânicos, e a mimetização de processos bioorgânicos em laboratório levou a importantes avanços nos métodos sintéticos. Muitos destes desenvolvimentos não teriam sido possíveis sem a ação de pesquisas sobre tais rotas biossintéticas de metabólitos secundários, onde a marcação isotópica dentre outras metodologias tem desempenhado um papel fundamental (CSEKE et al. 2006).

A utilização de compostos orgânicos contendo isótopos como marcadores para a elucidação de vias metabólicas em organismos, tecidos e células teve início na década de 1930 com a utilização dos isótopos estáveis, sendo os primeiros estudos conduzidos com deutério. Posteriormente, surgiu a era dos estudos utilizando substâncias radiomarcadas com ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S e mais tarde com ^3H , pois este se tornou disponível comercialmente na década de 1950 e 1960 (BACHER et al., 1998).

Os mecanismos envolvidos na biossíntese de moléculas orgânicas em diferentes organismos sempre foram norteados de questionamentos e desafios. Em 1945, o químico norte-americano Melvin Calvin estudou o processo de assimilação de carbono por plantas (fotossíntese) utilizando gás carbônico marcado com ^{14}C . Este evento tornou-se um marco nos estudos biossintéticos em plantas, envolvendo isótopos radioativos ou estáveis como marcadores (HARTMANN, 2007). O estabelecimento de protocolos experimentais utilizando isótopos estáveis (^{13}C , ^2H , ^{15}N , ^{18}O) e radioativos (^{14}C , ^3H , ^{32}P) associado ao progresso no desenvolvimento de técnicas de análise e investigação molecular como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (com detecção por ultravioleta / cintilador líquido), a Espectrometria de Massas (EM) e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) impulsionou as pesquisas visando a compreensão do metabolismo vegetal, animal e microbiano (EISENREICH e BACHER et al. 2007; GODIN et al. 2007; MAHMUD, 2007; XAVIER et al. 2007). Assim, através da incorporação de precursores marcados, seguido da metabolização pelo organismo em estudo e posterior detecção do isótopo, tornou-se possível desvendar rotas metabólicas. A grande quantidade de informações destes estudos trouxe desenvolvimento não somente à área de bioquímica, mas também à química orgânica, medicina,

genética, enzimologia, agronomia e física dentre outras. Atualmente, mesmo com a diversidade de rotas biossintéticas já descritas, existem diversas biomoléculas interessantes cujos mecanismos de formação ainda não foram desvendados e devido a isto, a utilização de marcadores continua atual e fundamental na compreensão de processos metabólicos diversos (MAHMUD, 2007).

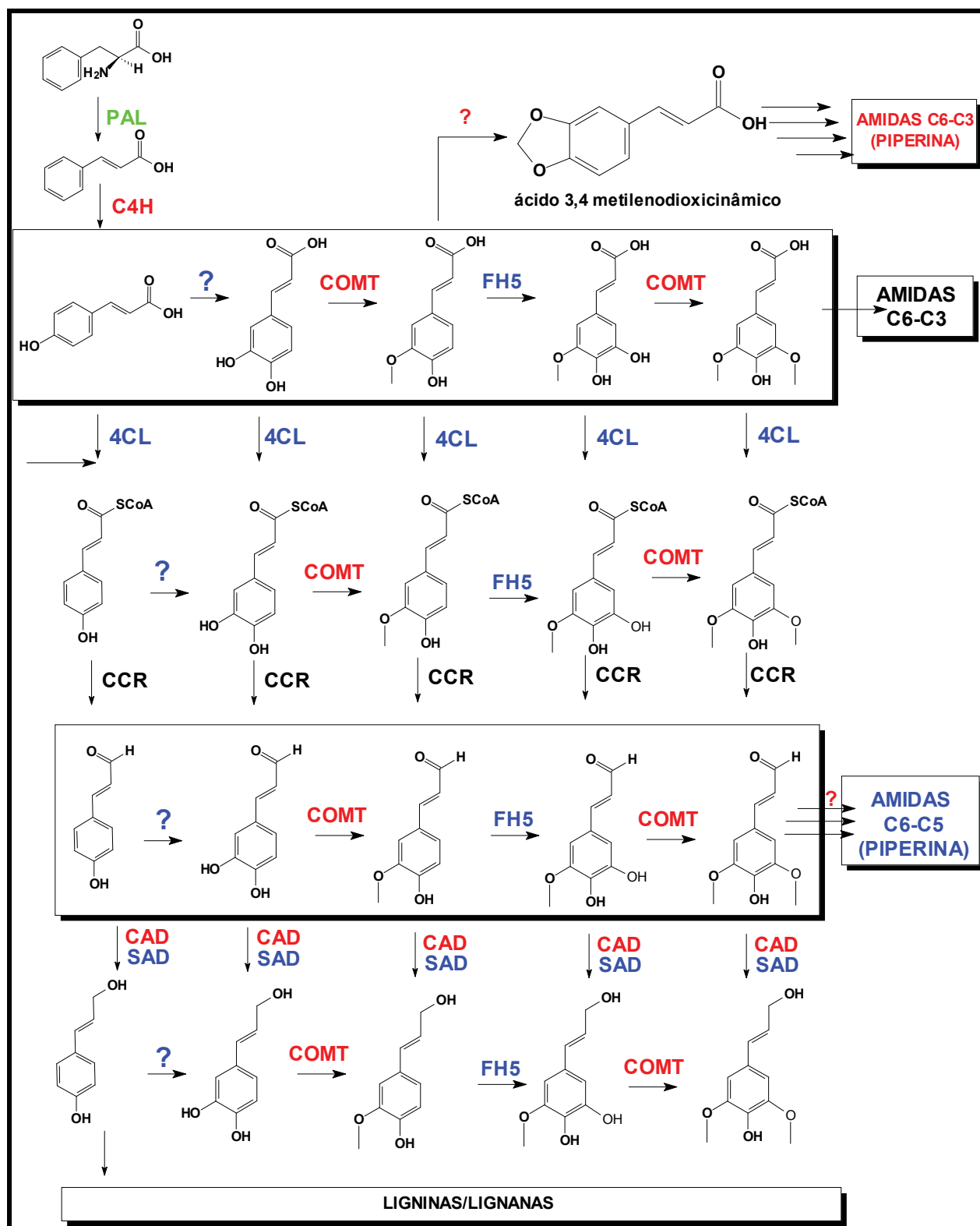
Diversos estudos publicados nos últimos anos, como a biossíntese alternativa de pentoses em *Arabidopsis* (SHARPLES e FRY, 2007), a descoberta de uma rota alternativa para a biossíntese de sesquiterpenos a partir do pirofosfato de (Z,Z)-farnesila (SALLAUD et al., 2009); a determinação da rota biossintética da trigonelina utilizando nicotinato marcado com ^{14}C como precursor (ZHENG et al., 2008); e a descoberta da via MEP que dá origem às unidades isoprênicas (ROHMER, 1999), corroboram que a utilização de isótopos em estudos biossintéticos continua atual e eficiente.

1.3. Biossíntese de piperamidas em espécies de *Piperaceae*

Compostos fenólicos podem ser biossintetizados a partir do ácido chiquímico, precursor de aminoácidos aromáticos. Os fenilpropanóides, especificamente, são derivados dos aminoácidos fenilalanina e a partir daí, diversas classes de substâncias são geradas, incluindo lignanas, ligninas, cumarinas, estilbenos, flavonóides, ésteres fenólicos e derivados do ácido benzóico e amidas (VOGT, 2010).

Diversas enzimas envolvidas na formação dos fenilpropanóides já foram caracterizadas (Figura 1.3), dentre elas a **PAL** (fenilalanina amônia liase), envolvida na reação de trans-desaminação da fenilalanina; **C4H** (cinamato 4-hidroxilase), catalisa a oxidação do ácido cinâmico ao ácido cumárico; **4CL** (4-cumarato:CoA ligase) catalisa a conversão do ácido cumárico ao respectivo éster CoA; **CCR** (cinamoil coenzima A redutase) que catalisa a redução de ésteres CoA a aldeídos; **COMT** (ácido cafeico O-metiltransferase) promove O-metilações em ácidos fenilpropanoídicos; **FH5** (ferulato-5-hidroxilase) promove a hidroxilação na posição 5 do anel aromático do ácido ferúlico; **CAD/SAD** (cinamoil álcool desidrogenase/sinapil álcool desidrogenase); **CCoAOMT** (ácido caféico CoA O-metiltransferase) catalisa metilações em ésteres CoA. As enzimas **CAD/SAD** são homólogas, isto é, catalisam o mesmo tipo de reação, mas a enzima **CAD** mostra-se seletiva na redução de cinamaldeído para o respectivo álcool enquanto a **SAD** prefere reduzir sinapaldeído ao álcool sinapílico (BOERJAN et al., 2003).

Figura 1.3: Enzimas envolvidas no metabolismo de fenilpropanóides



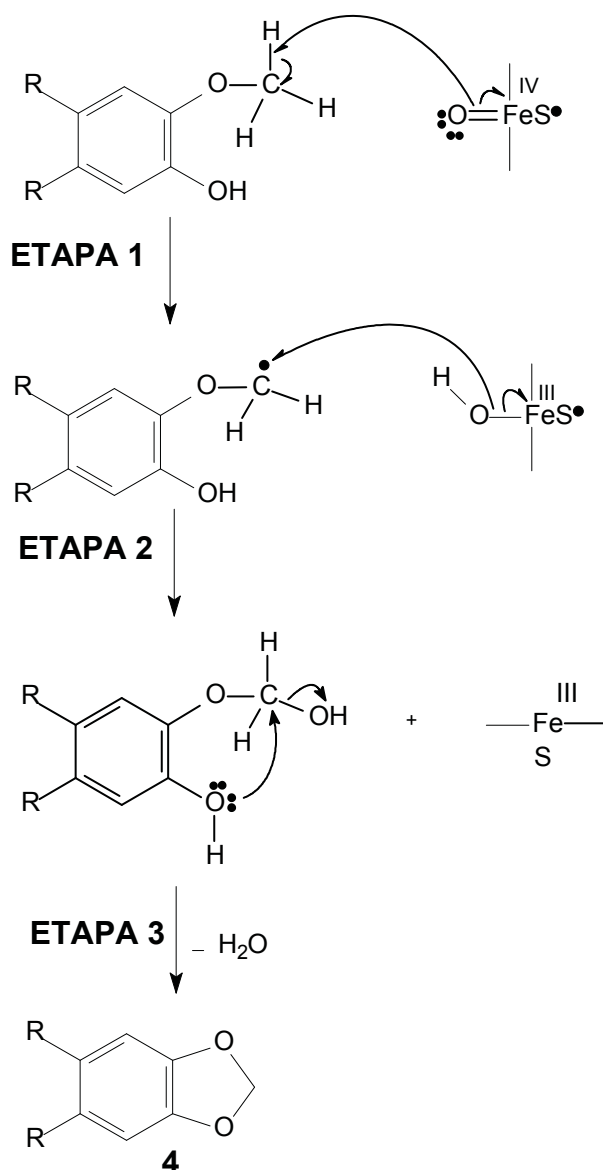
Fonte: (BOERJAN et al., 2003)

O grupo metilenodioxílico ocorre em um grande número de produtos naturais, principalmente em alcalóides (BAUER e ZENK et al., 1991; IKESAWA et al., 2003; IKESAWA et al., 2003b). Na via fenilpropanoídica, é proposto que o ácido ferúlico seja o precursor direto do ácido

3,4-metilenodioxicinâmico, mas até o momento a provável oxidorredutase envolvida nesta transformação ainda não foi identificada e caracterizada (BOUGARD et al., 2006).

Existem na literatura duas propostas para formação do grupo metilenodioxílico a partir de uma estrutura *o*-metoxifenólica. Na primeira proposta (Figura 1.4) de formação deste grupo (BAUER e ZENK, 1991), um dos elétrons da ligação carbono-hidrogênio do grupamento metoxila é transferido para o átomo de oxigênio do grupo prostético heme do citocromo P450 (o estado de oxidação do ferro passa de IV para III), formando uma ligação O-H e um carbono radical no substrato. Na próxima etapa (2) ocorre a transferência do radical hidroxila ao substrato, formando-se uma função acetal. Posteriormente (etapa 3), ocorre uma SN_2 intramolecular, (eliminando uma molécula de água), formado assim a grupo metilenoxílico (etapa 4).

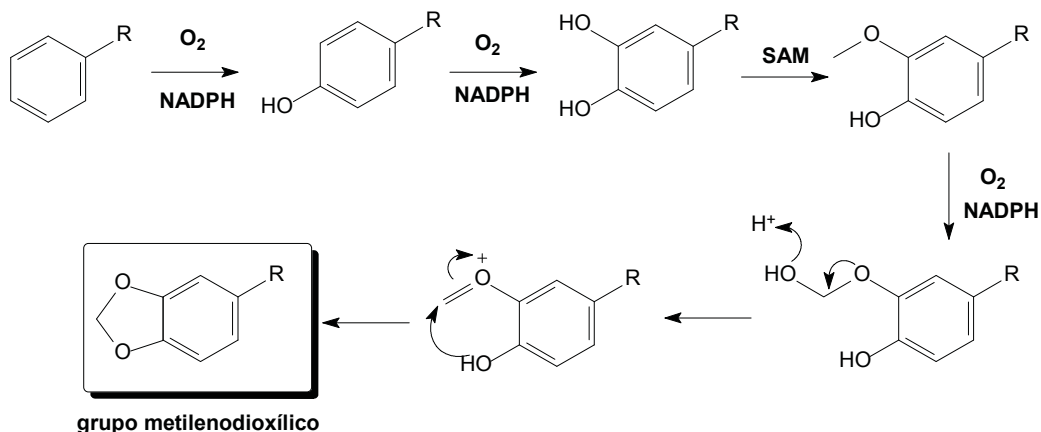
Figura 1.4: Proposta mecanística de formação do grupo metilenodioxílico a partir de substrato *o*-metoxifenol



Fonte: (BAUER e ZENK, 1991)

Em outra proposta de formação do grupo metilenodioxílico (Figura 1.5), ocorre a saída de água do grupamento álcool (etapa 3) com posterior adição de um nucleófilo ao átomo de carbono (DEWICK, 2009).

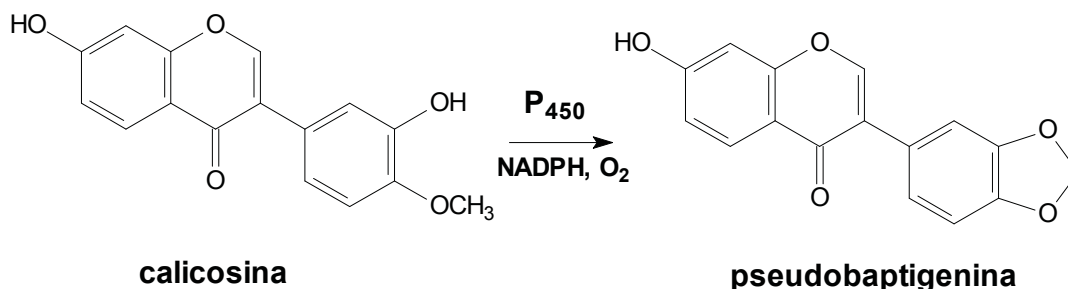
Figura 1.5: Outra proposta para formação do grupo metilenodioxílico



Fonte: DEWICK, 2009

A biossíntese da isoflavona pseudobaptigenina metabolizada em *Cicer arietinum* (Fabaceae) foi elucidada através de experimentos de incubação da fração microsomal proveniente das raízes desta planta com o possível precursor (calicosina). A isoflavona pseudobaptigenina foi biossintetizada (Figura 1.6), comprovando que a formação do grupo metilenodioxílico é a última etapa biossintética e totalmente dependente do cofator NADPH e O_2 . Ensaio adicionais utilizando inibidores da atividade do citocromo P450 incluindo CO (monóxido de carbono), cetoconazol e BAS 110, triadimefona demonstraram também que o grupo metilenodioxílico é formado pela ação de uma oxidoreductase do tipo citocromo P450 (CLEMENS e BARZ, 1996).

Figura 1.6: Formação da isoflavona pseudobaptigenina em *Cicer arietinum* (Fabaceae)

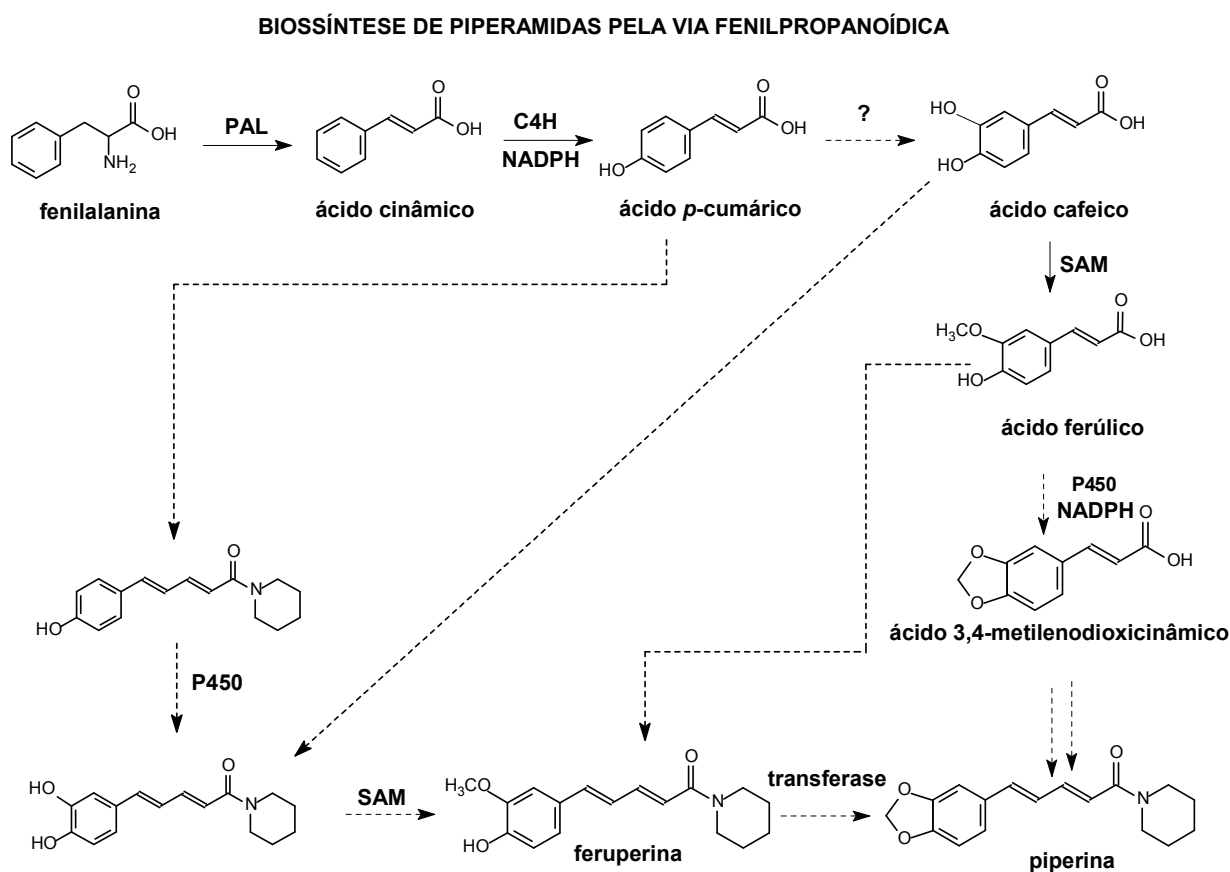


Fonte: CLEMENS e BARZ, 1996

As estruturas das amidas isoladas de *P. tuberculatum* apresentam em comum um anel aromático substituído com um grupo metilenodioxílico. A proposta biossintética para a formação do grupo metilenodioxílico pode ser vista na figura 1.7. Esta figura mostra que existem diversas

possibilidades de caminhos biossintéticos para formação deste grupo: o grupo metilenodioxílico pode ser formado antes ou depois do grupo amídico. Este grupo pode ser formado a partir do primeiro precursor, ácido ferúlico, ou após a formação da amida feruperina tendo como precursores derivados fenilpropanoídicos menos oxidados tais como ácido cinâmico, ácido *p*-cumárico e/ou ácido caféico.

Figura 1.7: Proposta biossintética de formação de amida piperina em *P. tuberculatum*



Visando determinar qual é o precursor direto utilizado na formação do grupo metilenodioxílico, realizou-se a síntese de precursores biossintéticos substituídos no anel aromático com os grupos metóxi e hidróxi (3-metóxi-4-hidróxifenil, como a amida feruperina, Figura 1.7), para utilizá-los em reações *in vitro* com extratos enzimáticos e assim, compreender a atuação de enzima oxidorredutases do tipo citocromo P450. Os resultados destes experimentos forneceriam então subsídios para determinar em qual etapa da biossíntese das amidas ocorre a oxidação do anel aromático, mais especificamente, a formação do grupo metilenodioxílico.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1. Incorporação de precursores marcados (YAMAUCHI et al., 2003)

2.1.1. Material vegetal

O material vegetal foi coletado em setembro de 2009 a partir de germinações *in natura* de sementes de um indivíduo adulto de *P. tuberculatum* crescendo em casa de vegetação no Instituto de Química (UNESP, Araraquara-SP, Brasil). Foram utilizadas plântulas, com altura em torno de 10 cm, mas que apresentassem folhas em estágio inicial de desenvolvimento.

2.1.2. Incorporação de L-¹⁵N-valina, ácido malônico U-²H e ácido 2-¹³C-malônico

41 mg de ¹⁵N-L-valina foi dissolvida em 36 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,04 seguido da adição de 54 mL de água, obtendo-se solução na concentração 4mM. (41 mg/90 mL). Esta solução foi distribuída em 7 frascos contendo plântulas de *P. tuberculatum* (Figura 1.8). A incorporação da substância foi realizada durante 9 dias. Após este período, as plantas foram retiradas da solução, e as folhas foram trituradas com nitrogênio líquido e submetidas a processo de extração com 50 mL de uma mistura de etanol:acetato de etila (3:7). O mesmo procedimento foi realizado para incorporação das substâncias ácido malônico marcado com deutério (4 mM) e carbono 13 (4 mM) (posição 2).

Figura 1.8: Plântulas de *Piper tuberculatum*



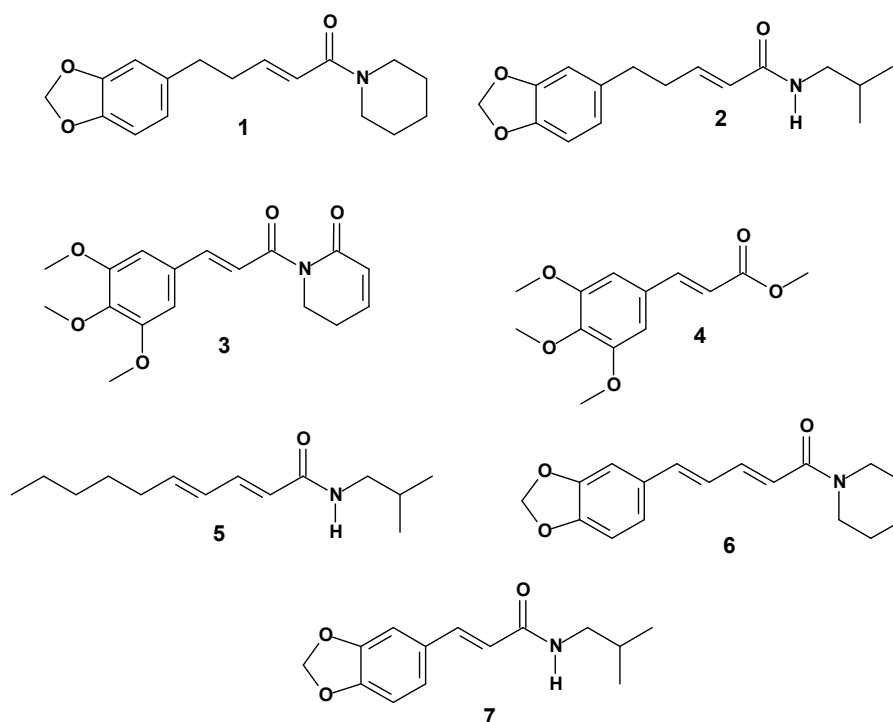
2.1.3. Estabelecimento de condição cromatográfica para análise de amidas de *P. tuberculatum*

Os metabólitos apresentados na figura 1.9 foram isolados de *P. tuberculatum* durante o estágio de mestrado e foram usados como padrões (Figura 1.9, Tabela 1.1) foram isolados e os extratos provenientes das plântulas oriundas dos experimentos de incorporação de precursores e branco cromatográfico foram dissolvidos em metanol e submetidos a processo de *clean up* utilizando cartucho C₁₈. Alíquotas de 20 µL de cada extrato foram analisadas por CLAE utilizando coluna contendo C₁₈ como fase estacionária (Coluna Supelco, Supelcosil LC-18, 25 cm X 4.6 mm, 5 µm). As análises foram realizadas em modo gradiente com metanol: água (5%→95%, v/v) como fase móvel e fluxo de 1 mL.min.⁻¹. O detector UV foi utilizado (λ = 254 nm).

Tabela 1.1: Metabólitos isolados de *P. tuberculatum* utilizados como padrões

código	Substância
1	diidropiperina
2	diidropiperlonguminina
3	(<i>E</i>)-piplartina
4	3,4,5-trimetóxicinamato de metila
5	pelitorina
6	piperina
7	fagaramida

Figura 1.9: Padrões isolados de *P. tuberculatum*



2.1.4. Condições de análise por espectrometria de massa

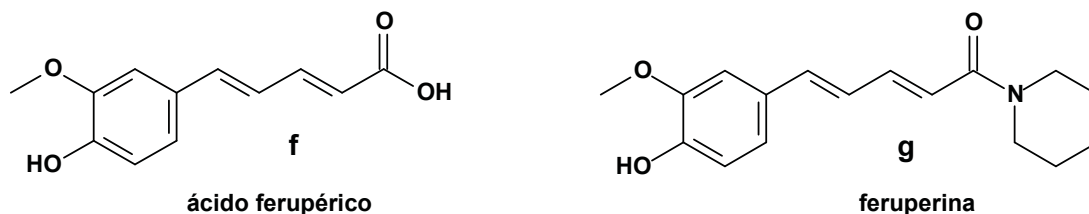
As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos (LaBioMMI, UFSCar, São Carlos-SP) pela doutoranda Taicia Pacheco Fill, sob a supervisão do Prof. Edson Rodrigues Filho.

As análises foram realizadas em aparelho triplo quadrupolo Quattro-LC Micromass com fonte de ESI (15 eV e 20 eV). As condições de CLAE foram: modo gradiente (50→100% de metanol/ água acidificada à 0,01%; 60 minutos; DAD.).

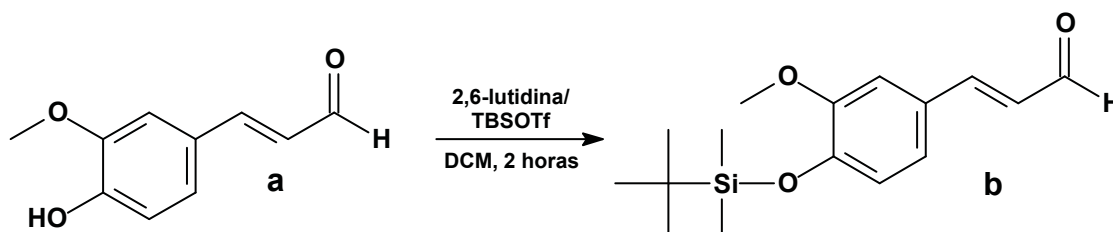
2.2. Síntese de possíveis precursores biossintéticos

Foram sintetizados dois possíveis precursores da piperina: ácido ferupérico (**f**) e a amida feruperina (**g**). A figura 1.10 mostra as estruturas destes compostos e outros possíveis precursores da piperina. Será relatado neste tópico todas as metodologias (BAZIN et al. 2008) utilizadas na rota sintética destes precursores biossintéticos e os rendimentos apresentados foram calculados com base na massa obtidas após as etapas cromatográficas (quando necessárias) e levando em consideração o rendimento teórico (100%). Os espectros foram obtidos em Espectrômetro de RMN Varian MERCURY-VX de 300 e 400 MHz.

Figura 1.10: Precursores ácido ferupérico (**f**) e feruperina (**g**)



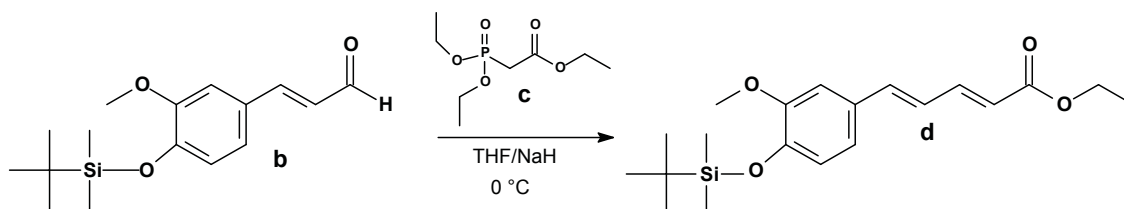
2.2.1. Primeira etapa: proteção da hidroxila fenólica



Procedimento experimental: Em um frasco contendo 480 mg (2,69 mmol) do aldeído **a** foram adicionados 3,26 mL de diclorometano anidro. O sistema foi resfriado a 0 °C e então adicionou-se 0,63 mL de 2,6-lutidina anidra (5,38 mmol) seguido por 1,2 mL de TBSOTf (terc-butyldimetilsililtriflato) (5,38 mmol). O sistema reacional foi agitado a temperatura ambiente por 2 horas e monitorado por CCDC. A reação foi finalizada pela adição de éter etílico gelado e solução 1M de NaHSO₄. A mistura foi extraída com éter etílico, lavada com solução de éter etílico, água

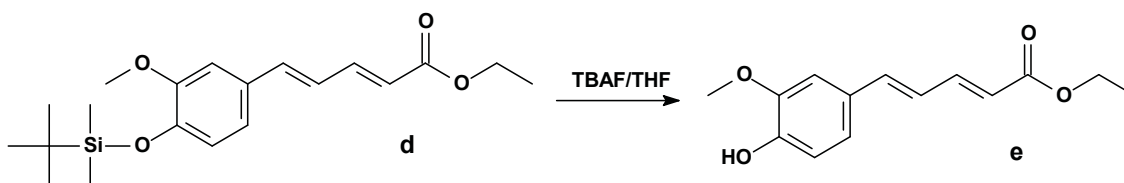
destilada, e soluções saturadas de NaHCO_3 e NaCl . As fases orgânicas foram combinadas, secas com Na_2SO_4 , concentradas em rotaevaporador e posteriormente purificada em coluna contendo sílica gel 60 (230-400 mesh) (CCSG). **Produto final:** (674 mg, rendimento: 95%)

2.2.2. Segunda etapa: reação de olefinação de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) – Procedimento utilizando trietilfosfonoacetato



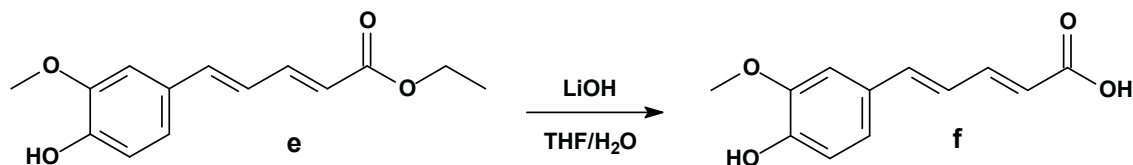
Procedimento Experimental: O sistema reacional foi mantido sob atmosfera seca e inerte (fluxo de gás nitrogênio). NaH (pó) foi adicionado lentamente à solução do aldeído (**b**) e trietilfosfonoacetato (**c**), ambos previamente dissolvido em THF anidro. O frasco foi mantido em banho de gelo durante a adição de NaH. Depois esta etapa, a reação foi agitada à temperatura ambiente por uma hora. Água gelada foi adicionada e a mistura foi extraída com éter etílico. A fase orgânica foi lavada com água e seca com Na_2SO_4 e concentrada com o auxílio de um evaporador rotativo. O produto (**d**) foi purificado em uma coluna contendo sílica gel 60 (230-400 mesh), utilizando clorofórmio como fase móvel. **Produto final:** (647 mg, rendimento: 78%)

2.2.3. Terceira etapa: desproteção do grupo fenol com TBAF (fluoreto de tetra-*N*-butilamônio)



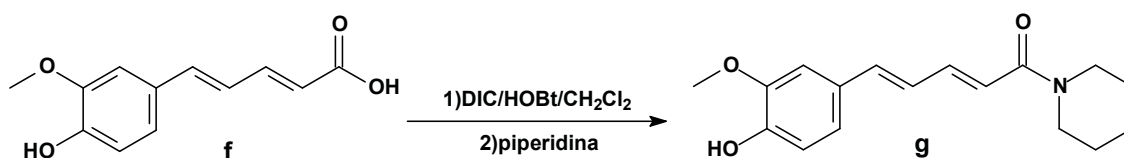
Procedimento Experimental: Dentro de um balão (25 mL) o composto **d** (645 mg) foi dissolvido em THF anidro (4,5 ml). Ácido acético glacial (0,4 ml) foi adicionado a 0 °C sob atmosfera de nitrogênio. TBAF (1 M em THF, 3,55 mL, 3,55 mmol) foi adicionado gota a gota, e a mistura agitada na mesma temperatura por 1 hora. O excesso de solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Adicionou-se solução de HCl 0,5M até atingir o pH 5. A fase aquosa foi extraída com éter etílico (4 x 5 mL). A fase orgânica foi lavada com água (50 mL) e salmoura (50 mL), sucessivamente, secas com MgSO_4 , e concentrada. O produto bruto foi purificado em coluna contendo sílica gel 60 (230-400 mesh), usando hexano/acetato de etila (8:2) como fase móvel. **Produto final:** (291 mg, rendimento: 66%)

2.2.4. Quarta etapa: hidrólise do éster



Procedimento Experimental: Em um balão reacional contendo o éster **e** (291 mg) foi dissolvido em 10 mL de uma solução de THF/água (3:2). Em seguida, foi adicionado 140 mg de LiOH. A reação foi agitada à temperatura ambiente durante 48 horas. Finalizou-se a reação com a adição de ácido clorídrico 0,5M até pH 4. O produto foi purificado em coluna contendo sílica gel 60 (230-400 mesh), usando acetato de etila como fase móvel. **Produto final:** (176 mg, rendimento: 68%)

2.2.5. Quinta etapa: preparação de uma amida piperidínica



A substância **f** (50 mg) foi misturada com DIC (30,4 mg) e HOBt (32,5 mg) em diclorometano (25 mL) por 10 minutos em temperatura ambiente, seguido pela adição de piperidina (20,4 mg). A mistura reacional foi monitorada por CCDC (diclorometano-acetona/4:1) até quando o ácido **6** fosse consumido. O produto bruto foi purificado em coluna contendo sílica gel 60 (230-400 mesh) (fase móvel: diclorometano/acetona 100:0-50:50). **Produto final:** (36 mg, rendimento: 56%)

2.3. Preparação de extratos enzimáticos e monitoramento de atividade enzimática

Os protocolos a seguir relatam a preparação de extratos enriquecidos em PAL e enzimas oxidorreduções do tipo citocromo P450 (fração microssomal).

2.3.1 Protocolo para obtenção de extrato enzimático (fração microssomal) para monitoramento da atividade da enzima C4H (cinamato 4-hidroxilase) e outras enzimas oxidorreduções de tipo P450 (DURST et al., 1996)

Preparação do tampão (100 mL)

O tampão utilizado na extração dos microssomos de folhas jovens de *P. tuberculatum* continha: 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4; EDTA 1 mM (37,2 mg); sacarose 250 mM (8,55 g); DTT 15 mM (231 mg) e ascorbato de sódio 40 mM (792 mg).

Obtenção da fração microssomal

- a. 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 vegetal (a cada 20 g de folhas, 4 g de PVPP foi utilizado);
- b. folhas jovens e brotos foram coletados e colocadas em nitrogênio líquido, sendo pesadas logo em seguida. (17,10 g);
- c. o material vegetal foi triturado em almofariz com auxílio de pistilo e N₂;
- d. foi adicionado 42,75 mL do tampão;
- e. esta mistura foi muito bem triturada e posteriormente mantida em banho de gelo por 10 minutos sob agitação suave;
- f. as amostras foram filtradas em gaze e centrifugadas por 15 minutos a 10000.g (9150 rpm) durante 15 minutos.
- g. o precipitado foi descartado e ao sobrenadante, foi adicionado uma solução 1 M de MgCl₂ necessário para atingir uma concentração de 30 mM;
- h. A solução foi então agitada sob banho de gelo por 20 minutos e centrifugada a 40000.g;
- i. o precipitado e o sobrenadante foram utilizados como fonte enzimática.

Ensaio enzimático

Neste ensaio enzimático, foram administradas quantidades das frações enzimáticas que contivessem ao menos 0,1 mg de proteína.

Preparação das amostras para ensaio

Reações e brancos

Tabela 1.2: Quantidades dos reagentes utilizados na reação enzimática

	Tampão	NADPH	ácido cinâmico	fração enzimática
Fração sobrenadante (3S)				
1	158 µL	-	-	342 µL
2	138 µL	10 µL	10 µL	342 µL
3	138 µL	10 µL	10 µL	342 µL
Fração precipitado (3P)				
4	385 µL	-	-	115 µL
5	365 µL	10 µL	10 µL	115 µL
6	365 µL	10 µL	10 µL	115 µL

Condições de análise via CLAE: volume de amostra injetado: 10 mL; fluxo = 1,0 mL.min⁻¹; λ = 278 nm; coluna: Supelcosil LC-18 (25 cm X 4,6 mm, 5 μ m); fase móvel: H₂O (0,01% de HAc):MeOH/9:1.

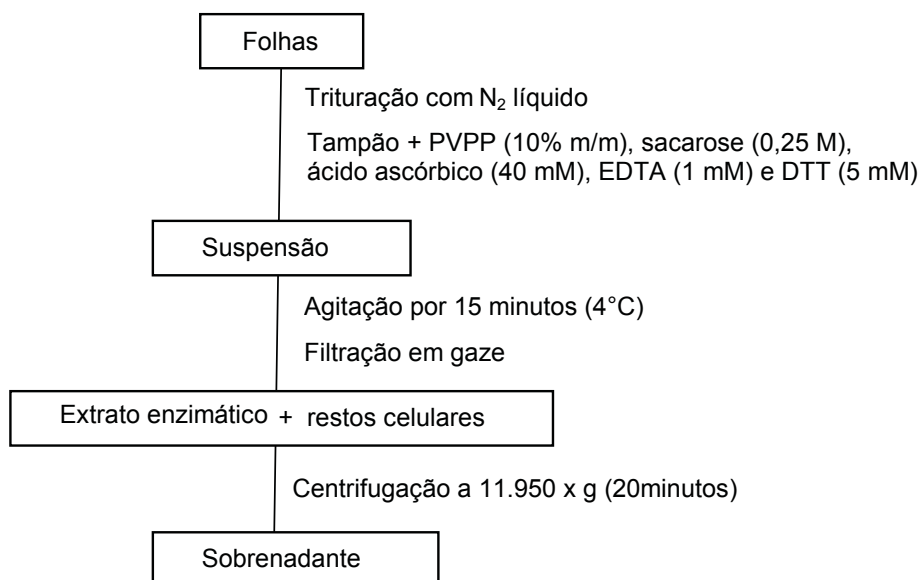
2.3.2. Monitoramento da atividade enzimática da PAL (fenilalanina amônia liase) e TAL (tirosina amônia liase) em folhas de plantas adultas de *P. tuberculatum*

Extração enzimática

Para obtenção de extrato enzimático para monitoramento das enzimas PAL e TAL 25 g folhas de *P. tuberculatum* foram trituradas em N₂ líquido utilizando-se gral e pistilo. Posteriormente, foi adicionado 100 mL de solução tampão borato 0,1 M, pH 8,8. A solução tampão continha PVPP (10% m/m), sacarose (0,25 M), ácido ascórbico (40 mM), EDTA (1 mM) e DTT (5 mM).

A suspensão obtida foi agitada suavemente por 15 minutos em banho de gelo antes do experimento. Após homogeneização com tampão, o extrato foi filtrado em gaze para um tubo de centrifuga mantido a 4 °C e centrifugado a 11.950.g por 20 minutos. O sobrenadante foi armazenado em banho de gelo e o precipitado foi descartado (Fluxograma 1.1).

Fluxograma 1.1: Obtenção do extrato enzimático de folhas de *Piper tuberculatum*.



Ensaio enzimático

O ensaio enzimático foi iniciado adicionando-se a um eppendorf 250 μ L de tampão borato 0,1 M (pH 8,8), 125 μ L de solução enzimática e deixando esta solução em banho a 40 °C por cinco minutos. A reação foi então iniciada com a adição de 150 μ L de fenilalanina (10 mM) / tirosina (10 mM) e incubada a 40°C sob agitação. Após 60 minutos a reação foi finalizada com a adição de 25 μ L de HCl (6M). A solução foi agitada e centrifugada a 14.000 rpm por alguns segundos. Este

experimento foi realizado em triplicata. Condições de análise via CLAE: volume de amostra injetado: 10 µL; fluxo = 1,0 mL/min; λ = 275 nm; coluna: Supelcosil LC-18 (25 cm X 4,6 mm, 5 µm); fase móvel: MeOH:H₂O (+0,1% de HAc) – 60:40.

Construção da curva de calibração para dosagem protéica dos extratos enzimáticos

Preparação do reagente de Bradford (BRADFORD, 1976)

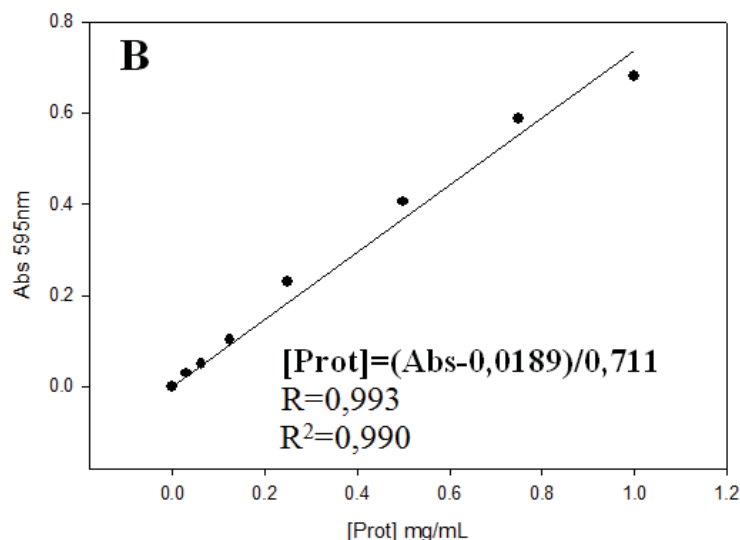
Coomassie Brilliant Blue G-250 (100 mg) foi dissolvido em 50 mL de uma solução etanólica à 95%. Nesta solução foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85% e a solução resultante foi diluída para um volume final de 1 litro. A concentração final dos reagentes foi 0,01% (p/v) de Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7% de etanol e 8,5 % (p/v) de ácido fosfórico.

Preparação da solução de albumina bovina (1 mg.mL⁻¹)

20 mg de albumina sérica bovina foram dissolvidas em 20 mL de água deionizada e posteriormente diversas alíquotas desta solução foram utilizadas para obtenção de curva de calibração, conforme a tabela 1.3. Em cubeta de poliestireno, foi obtido o valor de absorção de cada solução à 595 nm.

Tabela 1.3: Construção de curva de calibração utilizando albumina sérica

[illegible]

Figura 1.11: Curva de calibração utilizando albumina como padrão protéico

2.3.2. Monitoramento da atividade de enzimas oxidoredutases do tipo P450: conversão do grupo 4-hidroxi-3-metóxfenil ao grupo metilenodioxílico utilizando fração microssomal de *P. nigrum*

Preparação de tampão fosfato de sódio (100 mL)

O tampão usado para extração de microssomos de folhas jovens de *P. nigrum* continha 100 mL de solução 0,1 M de fosfato de sódio (pH 7,4), 1 mM EDTA (37,2 mg), 250 mM de sacarose (8,55 g), 15 mM DTT (231 mg) e ascorbato de sódio 40 mM (792 mg).

Obtenção da fração microssomal

- Após a dissolução 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 vegetal (cada 20 g de material vegetal, 4 g PVPP foi adicionado);
- Frutos frescos (20 g) foram tratados com N₂ líquido e submetidos a um moinho de bolas, em seguida, foi adicionado 30 mL de tampão. Esta mistura foi macerada e depois mantida em gelo por 10 minutos sob agitação suave. As amostras foram coletadas e filtradas através Miracloth® e equilibradas nos tubos de centrifuga;
- As amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 15000g. O precipitado foi descartado e à metade do sobrenadante adicionou-se uma solução de MgCl₂ 1M para obter uma concentração de 30 mM.
- A solução foi então agitada sob banho de gelo por 20 minutos e centrifugada a 45000g por 25 minutos. A outra parte desta solução foi submetida à centrifugação (100000.g) por 90 minutos.

- Os precipitados de ambas as centrifugações foram utilizados como fonte de enzima. A concentração de proteínas foi quantificada pelo método de Bradford.

Nestes ensaio enzimático, foram utilizadas quantidades das frações enzimáticas que continham pelo menos 0,1 mg de proteína, como a tabela 1.4 abaixo:

Tabela 1.4: Concentração da fração microssomal

Fração	<i>Piper nigrum</i> Concentração	Quantidade
precipitado	3,9 mg/mL	26 µL = 0,1 mg

Ensaio enzimático 1 – tempo reacional 30 minutos

Tabela 1.5: Reagentes usados na reação enzimática

código	NADPH	Tampão	Fonte de enzima	Precursor
branco (fonte de proteína)				
1	10 µL	-	460 µL	30 µL
2	10 µL	-	460 µL	30 µL
ácido ferupérico (f)				
3	10 µL	450 µL	30 µL	10 µL
4	10 µL	450 µL	30 µL	10 µL
feruperina (g)				
5	10 µL	450 µL	30 µL	10 µL
6	10 µL	450 µL	30 µL	10 µL

A reação foi incubada a 32 °C com os substratos (10 mM, 10 mL) e NADPH (25 mM/ 10 mL), em um volume total de 500 µL durante 30 minutos. A reação foi encerrada com a adição de 30 µL de ácido acético. Esta solução foi misturada e 500 µL de acetato de etila foi adicionado e agitado. A mistura foi centrifugada (14.000 rpm, a 3 minutos) e o sobrenadante foi analisado por CLAE.

Ensaio enzimático 2 - tempo reacional 0, 20 e 60 minutos

Tabela 1.6: Reagentes utilizados na reação enzimática

código	precursores	fonte de enzimas	tempo de incubação
1	ácido ferupérico (f)	Microsossomos	0
2	ácido ferupérico (f)	Microsossomos	20
3	ácido ferupérico (f)	Microsossomos	60
4	feruperina (g)	Microsossomos	0
5	feruperina (g)	Microsossomos	20
6	feruperina (g)	Microsossomos	60
7	ácido ferupérico (f)	MgCl ₂	0

8	ácido ferupérico (f)	MgCl ₂	20
9	ácido ferupérico (f)	MgCl ₂	60
10	feruperina (g)	MgCl ₂	0
11	feruperina (g)	MgCl ₂	20
12	feruperina (g)	MgCl ₂	60

Avaliação da atividade da enzima

Condições de análise CLAE: volume de amostra injetada: 10 µL, fluxo = 1,0 mL.min⁻¹, λ = 278 nm, coluna: Supelcosil LC-18 (25 cm x 4,6 mm, 5 mm), fase móvel: H₂O (0,01% HAc): MeOH/9:1.

2.4. Eletroforese em gel de poli(acrilamida) SDS-PAGE (monodimensional)

As amostras protéicas foram analisadas por eletroforese monodimensional, para avaliar a qualidade e diversidade de proteínas presentes nos extratos enzimáticos.

2.4.1. Soluções e reagentes necessários

Tampão de Separação (pH 8,8)

TRIS	1,5 M (18,17 g em 100 mL)
HCl	Ajustar pH para 8,8
SDS	0,4% p/v (0,4 g em 100 mL)

Tampão de Concentração (pH 6,8)

TRIS	0,5 M
HCl	Ajustar pH para 6,8
SDS	0,4% p/v

Solução Acrilamida-Bisacrilamida

acrilamida	30% p/v (30g para 100 mL)
bisacrilamida	0,8% p/v (0,8 g para 100 mL)

Bisacrilamida 2% p/v

bisacrilamida	2 g para 100 mL
---------------	-----------------

Solução tampão de corrida (pH 8,3)

TRIS	3,025 g.L ⁻¹ (0,025 M)
Glicina	14,4 g.L ⁻¹ (0,192 M)
SDS	1 g.L ⁻¹

Loading buffer

TRIS 1,5 M (pH 6,8)	0,83 mL
glicerol	4 mL
SDS	4 mL
EDTA	37,2 mg
azul de bromofenol	0,4 mg
H ₂ O deionizada	Completado com 10 mL

Esta solução foi armazenada a - 20°C em alíquotas de 290 µL, sendo que antes do uso foram adicionados 13,5 µL de uma solução 0,5 M de DTT.

2.4.2. Preparo das amostras e dos padrões

Após a determinação da concentração protéica das amostras (extratos enzimáticos obtidos a partir das folhas de *P. tuberculatum*) a serem aplicadas, as mesmas foram diluídas para uma concentração de aproximadamente 0,1 mg/mL. 20 µL de cada uma das amostras foram misturados em vortex com 10 µL de solução *loading buffer* e aquecidas a 100 °C, durante 5 min. Estas soluções foram então centrifugadas a 9.000 rpm por 30 segundos e aplicadas ao gel. Como padrão foram utilizados 5 µL de uma solução que continha as proteínas descritas na tabela 1.7. A esta solução foram adicionados 25 µL de H₂O deionizada e 10 µL de *loading buffer*. Os mesmos procedimentos de aquecimento e centrifugação descritos para as amostras foram realizados para a solução padrão.

O volume de cada aplicação no gel foi de 10 µL para as amostras e de 7,5 µL para os padrões.

Tabela 1.7: Padrão protéico utilizado no experimento de eletroforese e suas respectivas massas moleculares (em kDa)

Proteína	massa molecular (kDa)
fosforilase	97,4
albumina sérica	66,2
ovalbumina	45,0

anidrase carbônica	31,0
inibidora de tripsina	21,5
α -lactalbumina	14,4

2.4.3. Preparo, desenvolvimento e revelação do gel

Foram utilizados dois tipos de géis, o gel de concentração e o gel de separação. Estão indicadas abaixo as proporções dos reagentes que foram necessárias preparar o gel de separação 12%.

Gel de separação (suficiente para o preparo de 2 géis)

Reagente	Gel 12%
tampão de separação	2,5 mL
solução acril-Bisacrilamida	4,0 mL
H ₂ O	3,44 mL
persulfato de amônio (10% p/v)*	100 μ L
TEMED	14 μ L

* Preparou-se no momento da utilização.

Gel de concentração (suficiente para o preparo de 2 géis)

Reagente	Quantidade
tampão de concentração	750 μ L
solução acril-Bisacrilamida	300 μ L
H ₂ O	1,55 mL
bisacrilamida 2%	200 μ L
PSA (10% p/v)*	30 μ L
TEMED	5 μ L

* Preparou-se no momento da utilização.

A cuba utilizada na eletroforese SDS-PAGE foi Hoefer Mighty Small Dual Gel Caster; Mighty Small SE250/SE260 Mini Vertical Unity, Fonte Electrophoresis Power Supply EPS 301.

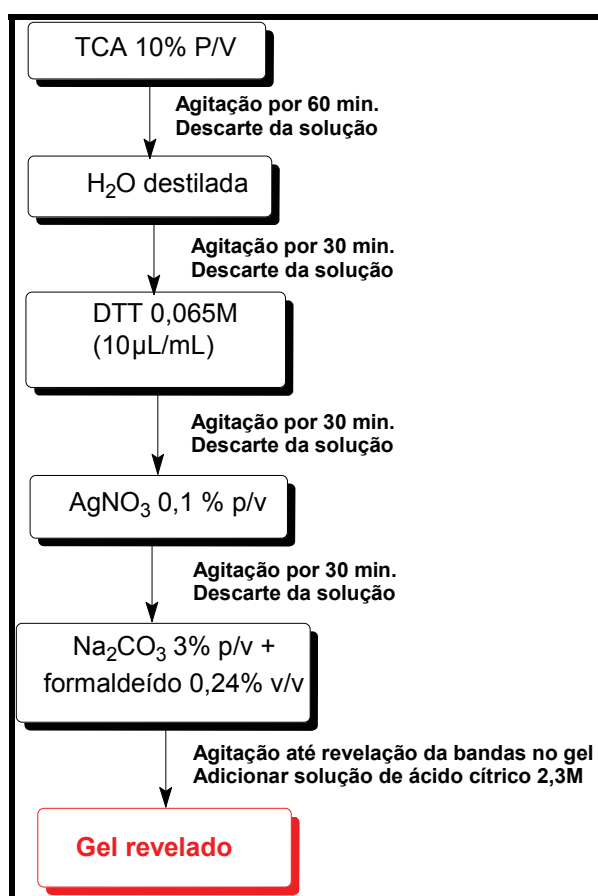
Cada gel foi montado no suporte e foi adicionado o volume necessário da solução tampão de corrida, sendo então aplicada uma intensidade de corrente de 20 mA até o *loading buffer* atingir o final do gel. Neste momento, o gel foi retirado da cuba eletroforética e iniciou-se o processo de revelação. O reagente para revelação utilizado foi nitrato de prata.

2.4.4. Revelação do gel

Revelação com AgNO_3 (*Silver Staining Protocol for Proteins*, Amersham Biosciences).

Umas das substâncias utilizadas para a revelação dos géis foi nitrato de prata (AgNO_3). O gel foi colocado em um frasco (onde ele permaneceu imóvel e plano) e 100 mL de soluções de ácido tricloroacético (TCA), DTT, AgNO_3 , Na_2CO_3 e formaldeído, e ácido cítrico foram utilizadas no processo de revelação, conforme indicado o fluxograma a seguir:

Fluxograma 1.2: Etapas envolvidas na revelação do gel SDS-PAGE utilizando AgNO_3 como agente revelador

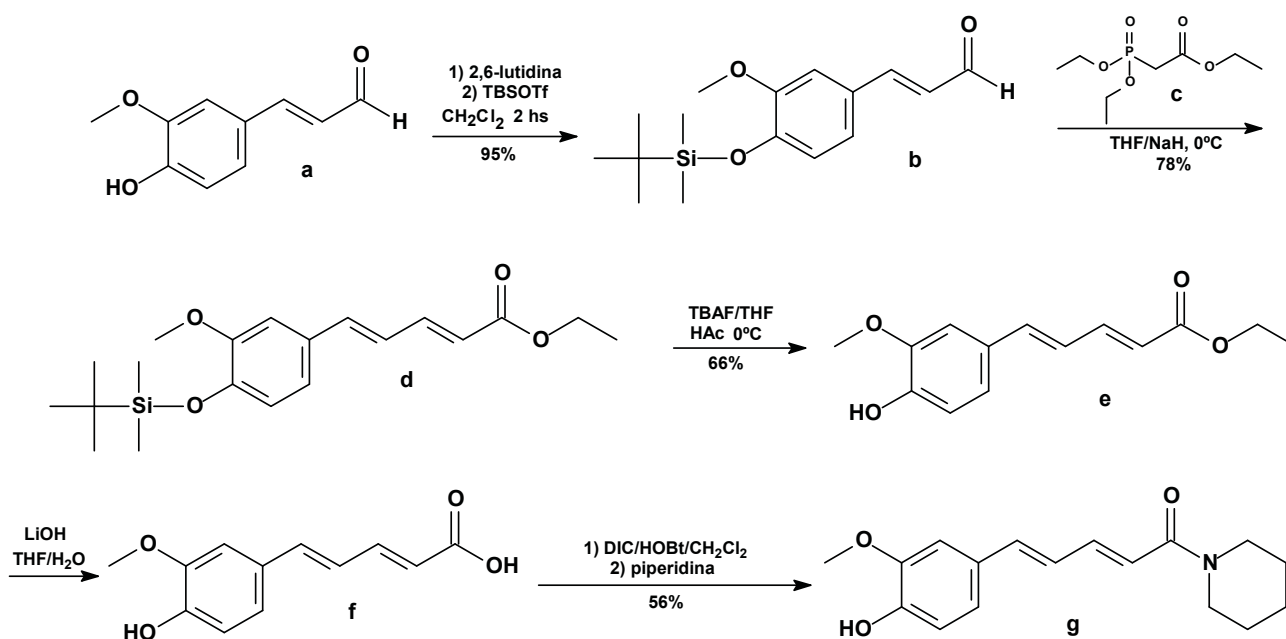


3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Síntese de precursores biossintéticos

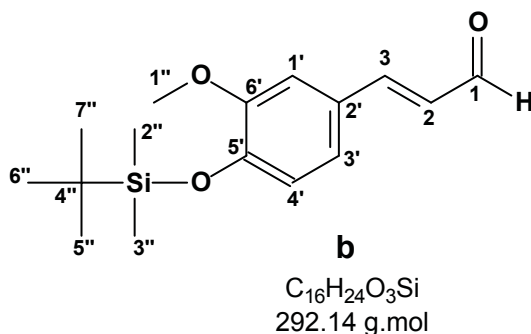
A substância de partida utilizada na síntese dos precursores foi o aldeído ferúlico **a**. A primeira reação realizada foi a proteção da hidroxila fenólica utilizando terc-butildimetilsililtriflato, obtendo-se o aldeído **b**. Este aldeído **b** foi substrato para uma reação do tipo olefinação HWE (Horner-Wadsworth-Emmons) utilizando trietilfosonoacetato. Obteve-se então o éster **d**, que em seguida foi submetido à desproteção da hidroxila fenólica utilizando fluoreto de tetrabutylamônio (TBAF). Uma reação de hidrólise deste éster com hidróxido de lítio (LiOH) em água/THF foi realizada, rendendo o ácido carboxílico **f**. A amida **g** foi preparada através da reação entre o ácido **f** e piperidina, usando como ativador de carbonila *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIC). O ácido carboxílico **f** e a amida **g** foram utilizados como substratos em reações com extrato microsomal proveniente de folhas de *P. nigrum*, no intuito de avaliar em qual etapa ocorre a ciclização que gera o grupo metilenodioxílico em piperamidas.

Figura 1.12: Rota sintética adotada para a síntese dos precursores **f** e **g**



3.2. Elucidação estrutural das substâncias preparadas

As estruturas das substâncias preparadas foram identificadas utilizando dados de experimentais obtidos através da análise de espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM).

3.2.1. Aldeído **b**

A substância **b** apresentou-se como um sólido laranja amorfo. No espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz, Figuras 1.13 e 1.14) foram observados um sinal em δ 9,45 (*d*, J = 7,6 Hz, 1H), característico do H-1 da função aldeído; um sinal em δ 7,21 (*d*, J = 15,6 Hz, 1H) atribuído ao hidrogênio H-3 da ligação dupla; um sinal em δ 6,90 (*d*, J = 2,4 Hz, 1H) atribuído ao hidrogênio H-1' do anel aromático; um sinal em δ 6,88 (*dd*, J = 7,6 Hz, 2,4 Hz, 1H) atribuído ao hidrogênio H-3' do anel aromático; um sinal em δ 6,69 (*d*, J = 7,6 Hz, 1H) atribuído ao hidrogênio H-4' do anel aromático; um sinal em δ 6,40 (*dd*, J = 15,6 Hz, 7,6 Hz, 1H) atribuído ao hidrogênio H-2 da ligação dupla; um sinal em δ 3,70 (*s*, 3H) referente aos H-1" do grupo metoxila; um sinal em 0,90 (*s*, 9H) relativo aos H-5'', H-6'' e H-7'' dos três grupos metila do substituinte TBS (terc-butildimetilsilila); um sinal em δ 0,00 (*s*, 6H) relativo aos H-2'' e H-3'' das duas metilas ligadas diretamente ao átomo de silício do grupo TBS (terc-butildimetilsilila).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 1.15) foram observados um sinal em δ 193,7, atribuído ao C-1 de carbonila de aldeído; oito sinais em δ 153,1; δ 151,4; δ 148,5; δ 127,9; δ 126,7; δ 123,1; δ 121,2; δ 111,0, relativos aos carbonos sp^2 de ligação dupla e do anel aromático; um sinal em δ 55,4, atribuído ao C-1" da metoxila; um sinal em δ 25,6, atribuído aos carbonos C-5'', C-6'' e C-7'' das metilas do grupo terc-butila; um sinal em δ 18,5, atribuído ao carbono quartenário C-4'' do grupo terc-butila e um sinal em δ -4,6 atribuído aos carbonos C-2'' e C-3'' das duas metilas ligadas ao silício.

A fórmula molecular $C_{16}H_{24}O_3Si$ foi confirmada através da inspeção do espectro de ESI-MS (Figura 1.16), que mostrou o pico do íon quasi-molecular m/z 314.9 $[M + Na]^+$.

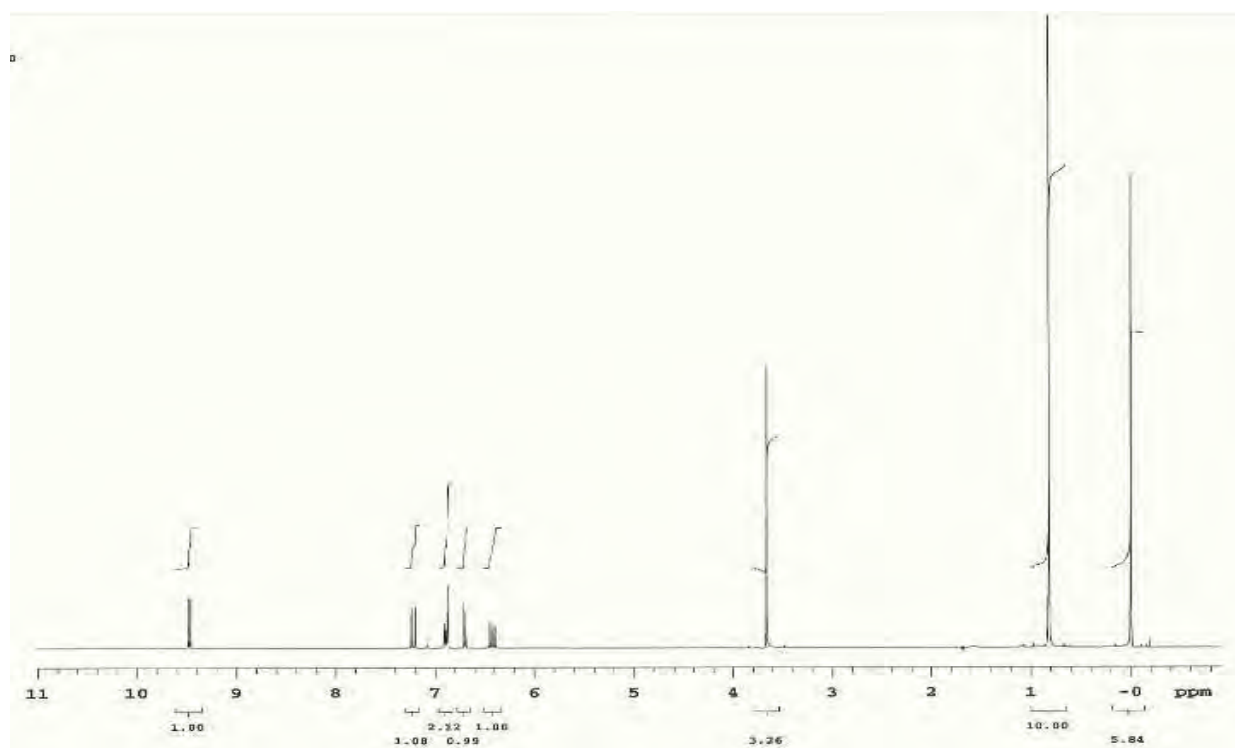
Figura 1.13: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **b**

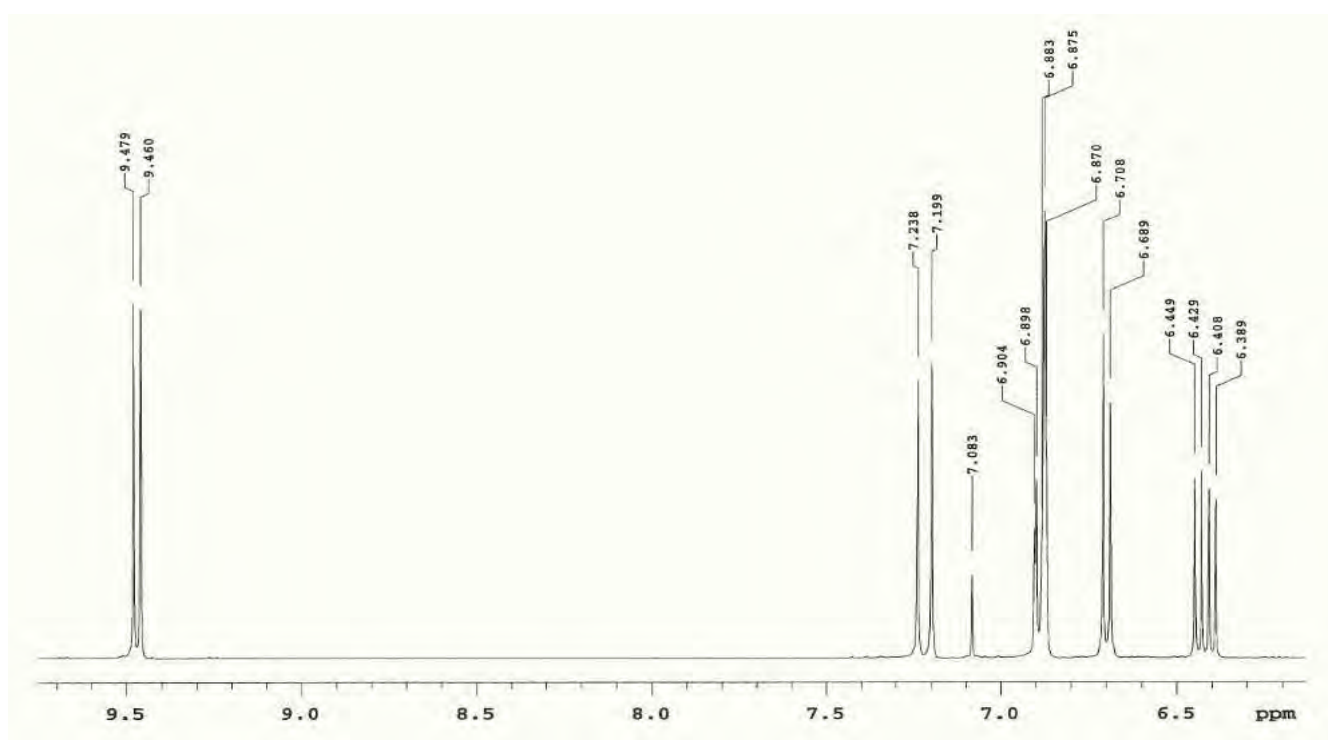
Figura 1.14: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **b**

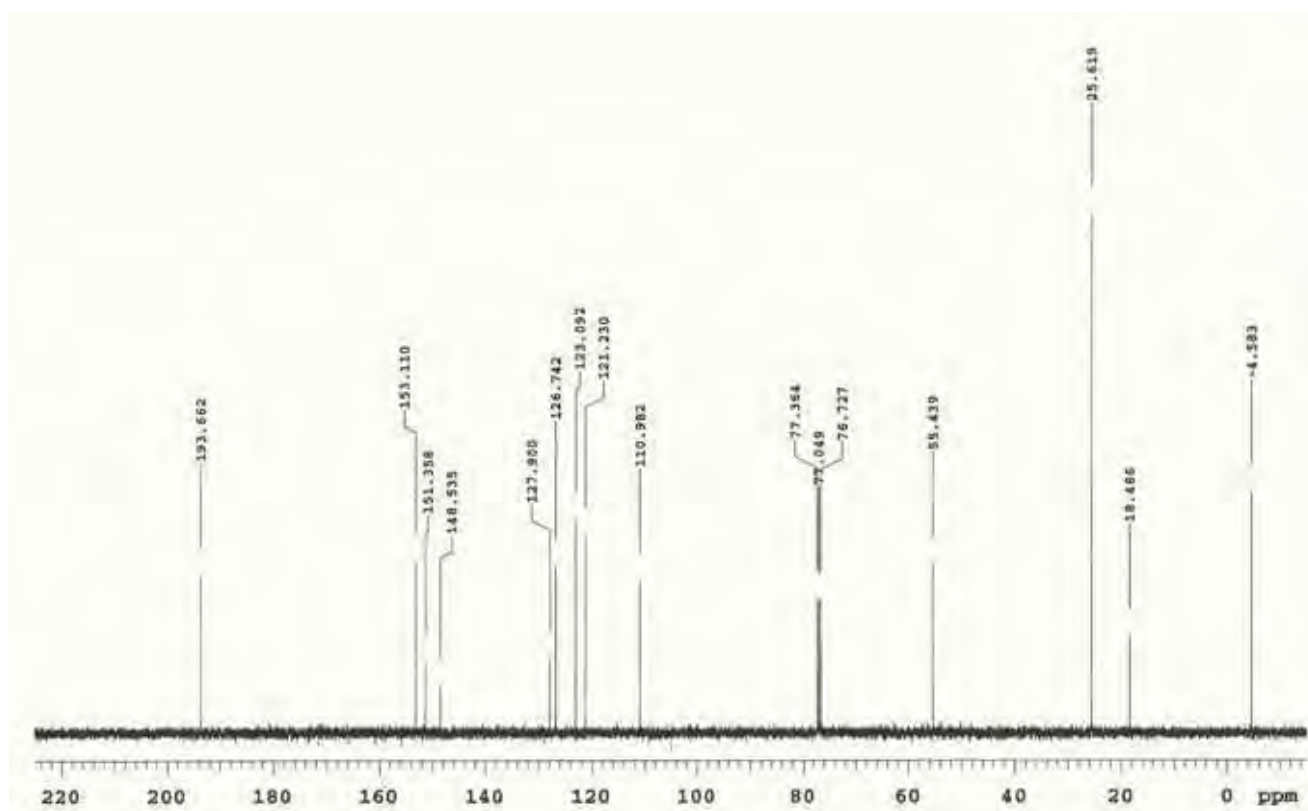
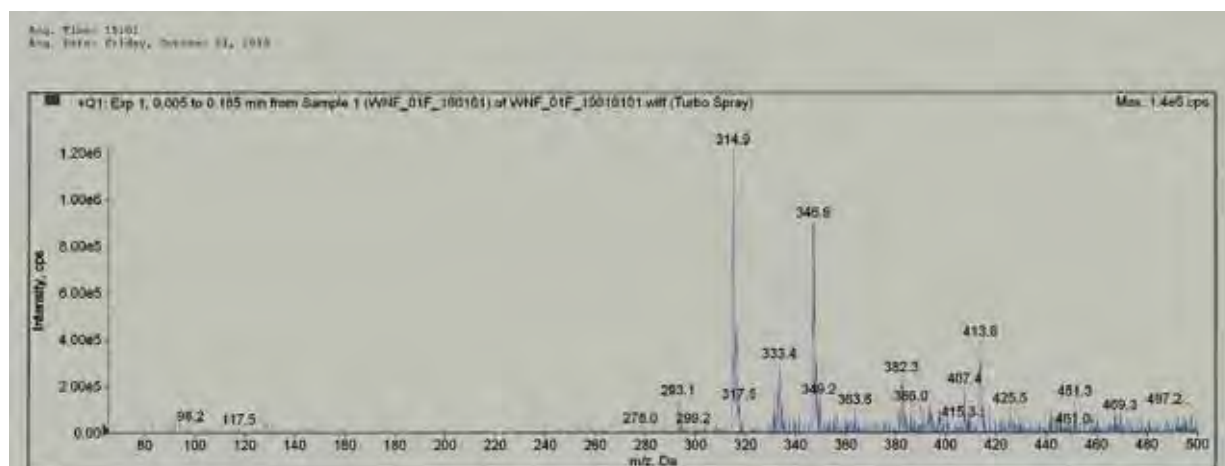
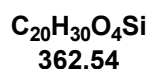
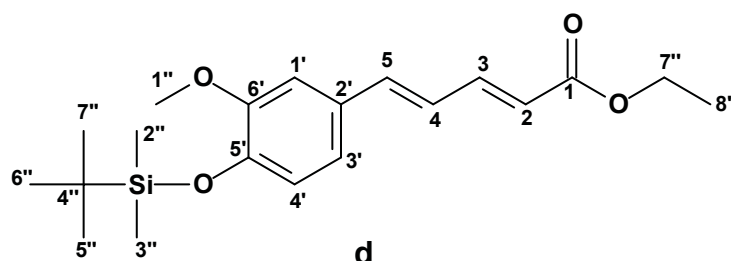
Figura 1.15: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância **b**

Figura 1.16: Espectro de Massas da substância **b** (EI, modo positivo)

3.2.2. Éster **d**



A substância **d** apresentou-se como um líquido denso e amarelado. No espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, δ 7,1; 300 MHz, Figura 1.17), as principais diferenças observadas quando comparado ao aldeído **2** são: um sinal em δ 7,27 (*dd*, J = 15,3; 10,2 Hz; 1H), atribuído ao H-3 da cadeia lateral; um sinal em δ 5,77 (*d*, J = 15,3 Hz; 1H), atribuído ao H-2 da cadeia lateral; um sinal em δ 4,05 (*q*, J = 9,6 Hz, 2H), atribuído aos H-7'' do grupo metileno do éster etílico; um sinal em δ 1,14 (*t*, J = 9,6 Hz, 3H), atribuído aos H-8'' do grupo metila do éster etílico;

No espectro de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz, Figura 1.18) foram observados um sinal em δ 167,2, atribuído ao C-1 de carbonila de éster; dez sinais em δ 151,1; δ 146,4; δ 144,9; δ 140,5; δ 130,0; δ 124,4; δ 121,1; δ 121,0; δ 120,1; δ 110,1, relativos aos quatro carbonos sp^2 de duas ligações duplas do sistema carbonílico $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturado e dos seis carbonos sp^2 do anel aromático; um sinal em δ 60,2, atribuído ao C-7'' da função éster metílico; um sinal em δ 55,4, atribuído ao C-1'' do grupo metoxila; um sinal em δ 18,4, atribuído C-8'' ao grupo metila da função éster; um sinal em δ 14,3, atribuídas ao carbonos das três metilas do grupo terc-butila; e um sinal em δ -4,6, atribuído às duas metilas ligadas diretamente ao átomo de silício.

A massa molecular $C_{20}H_{30}O_4Si$ foi confirmada através da inspeção do espectro de ESI-MS (Figura 1.19), que mostrou o pico do íon quasi-molecular m/z 385.3 $[M + Na]^+$.

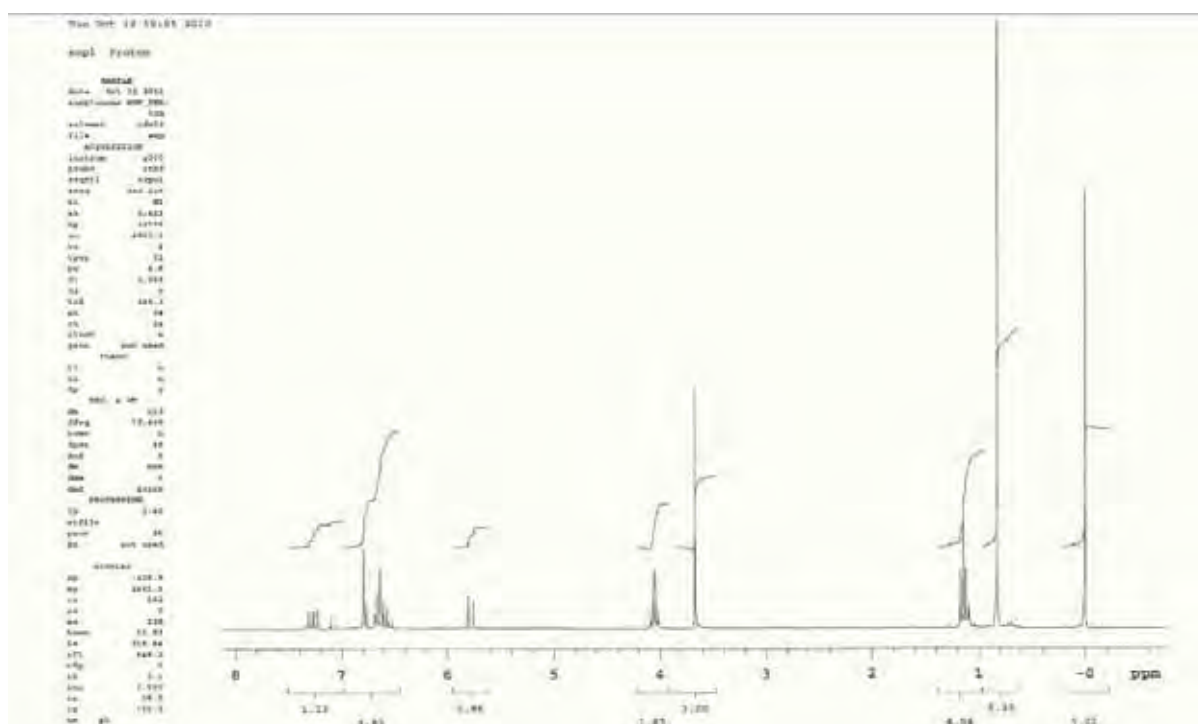
Figura 1.17: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , δ 7,1; 300 MHz) da substância d

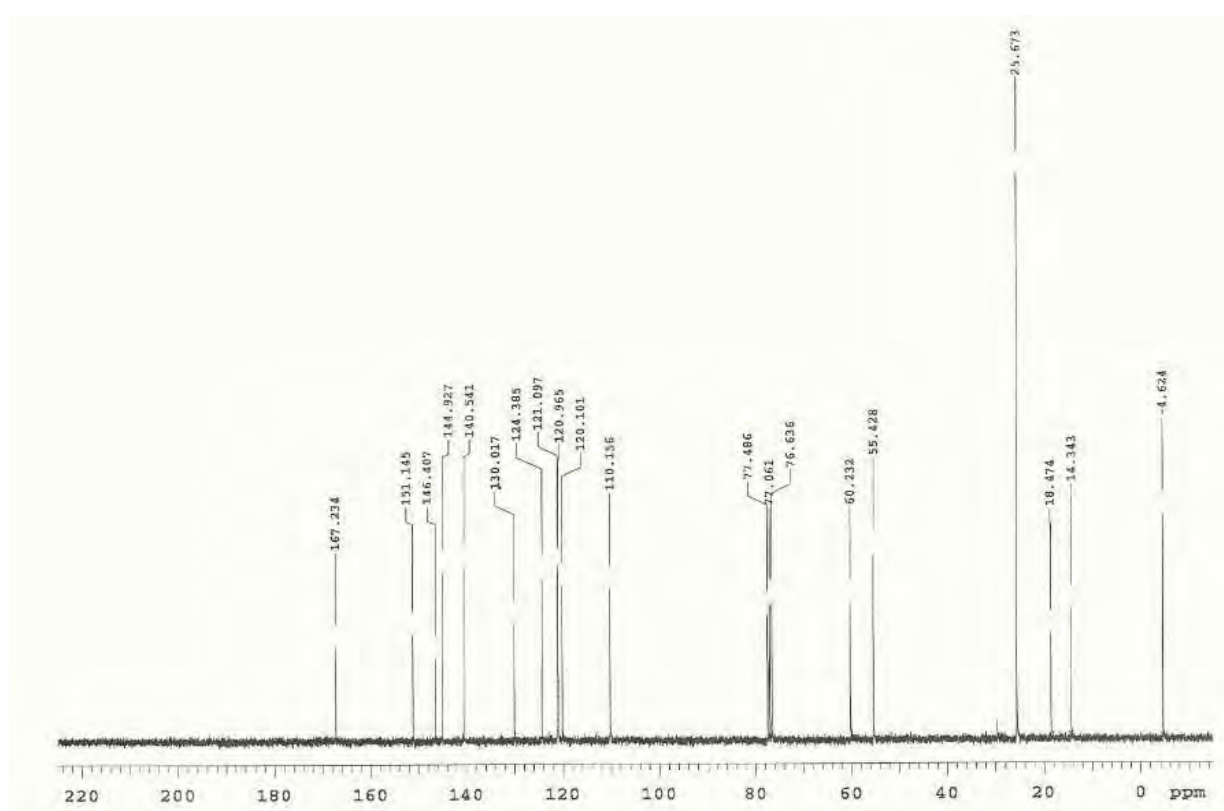
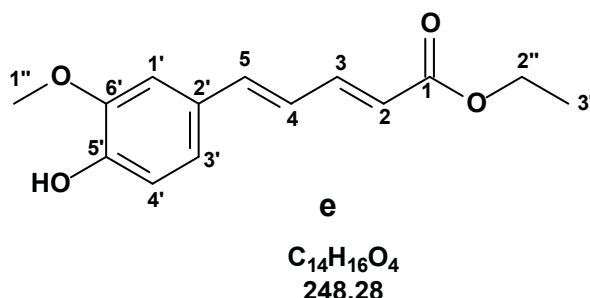
Figura 1.18: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) da substância d

Figura 1.19: Espectro de Massas da substância **d** (modo positivo)

3.2.3. Éster e



A substância **e** apresentou-se como um líquido denso e amarelado. No espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz, Figura 1.20) foram observados: um sinal em δ 7,40 (*dd*, $J = 15,2$; 10,2 Hz; 1H), atribuído ao H-3; um sinal em δ 6,94 (*dd*, $J = 8,4$; 1,6 Hz; 1H) atribuído ao H-3'; um sinal em δ 6,93 (*s*, 1H), atribuído ao H-1', um sinal em δ 6,86 (*d*, $J = 8,4$ Hz; 1H), atribuído ao H-4'; um sinal em δ 6,77 (*d*, $J = 15,2$ Hz; 1H), atribuído ao H-5; um sinal em δ 6,67 (*dd*, $J = 15,2$; 10,2 Hz; 1H), atribuído ao H-4; um sinal em δ 5,91 (*d*, $J = 15,2$ Hz; 1H), atribuído ao H-2; um sinal em δ 4,21 (*q*, 9,6 Hz, 2H), atribuído aos H-2'' do grupo metileno do éster etílico; um sinal em δ 3,86 (*s*, 3H), atribuído aos H-1'' do grupo metoxila; um sinal em δ 1,28 (*t*, 9,6 Hz, 3H), atribuído aos H-3'' do grupo metila do éster etílico. O espectro confirma que a desproteção do grupo fenólico com TBAF foi eficiente.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 1.21) foram observados um sinal em δ 167,4, atribuído ao C-1 de carbonila de éster; dez sinais em δ 147,0; δ 146,9; δ 145,1; δ 140,7; δ 128,6; δ 123,9; δ 121,7; δ 119,8; δ 114,9; δ 108,8, relativos aos quatro carbonos sp^2 de duas ligações duplas do sistema carboxílico $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturado e dos seis carbonos sp^2 do anel aromático; um sinal em δ 60,4, atribuído ao C-2'' da função éster metílico; um sinal em δ 55,9, atribuído ao C-1'' grupo metoxila; um sinal em δ 14,3, atribuído ao C-3'' do grupo metila da função éster etílico.

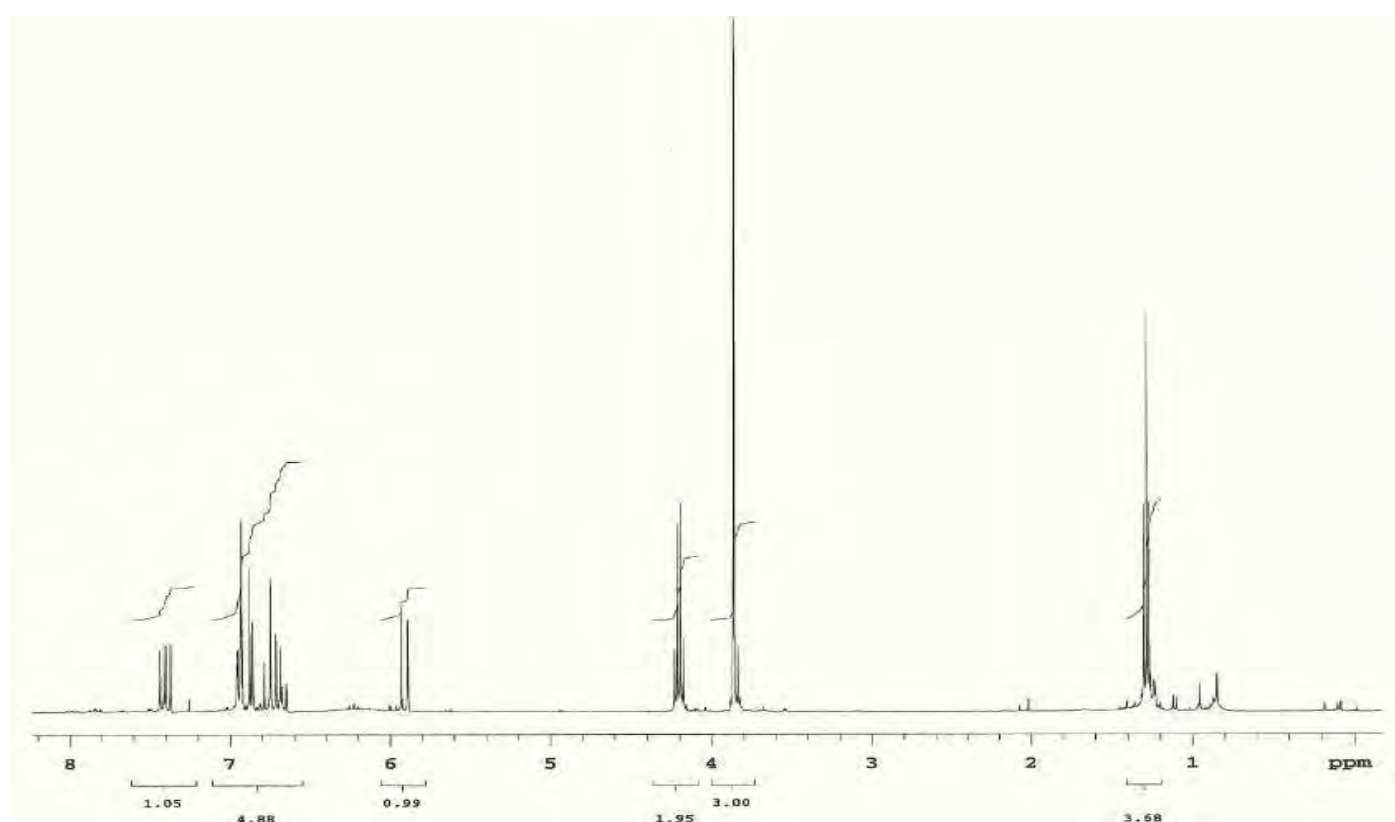
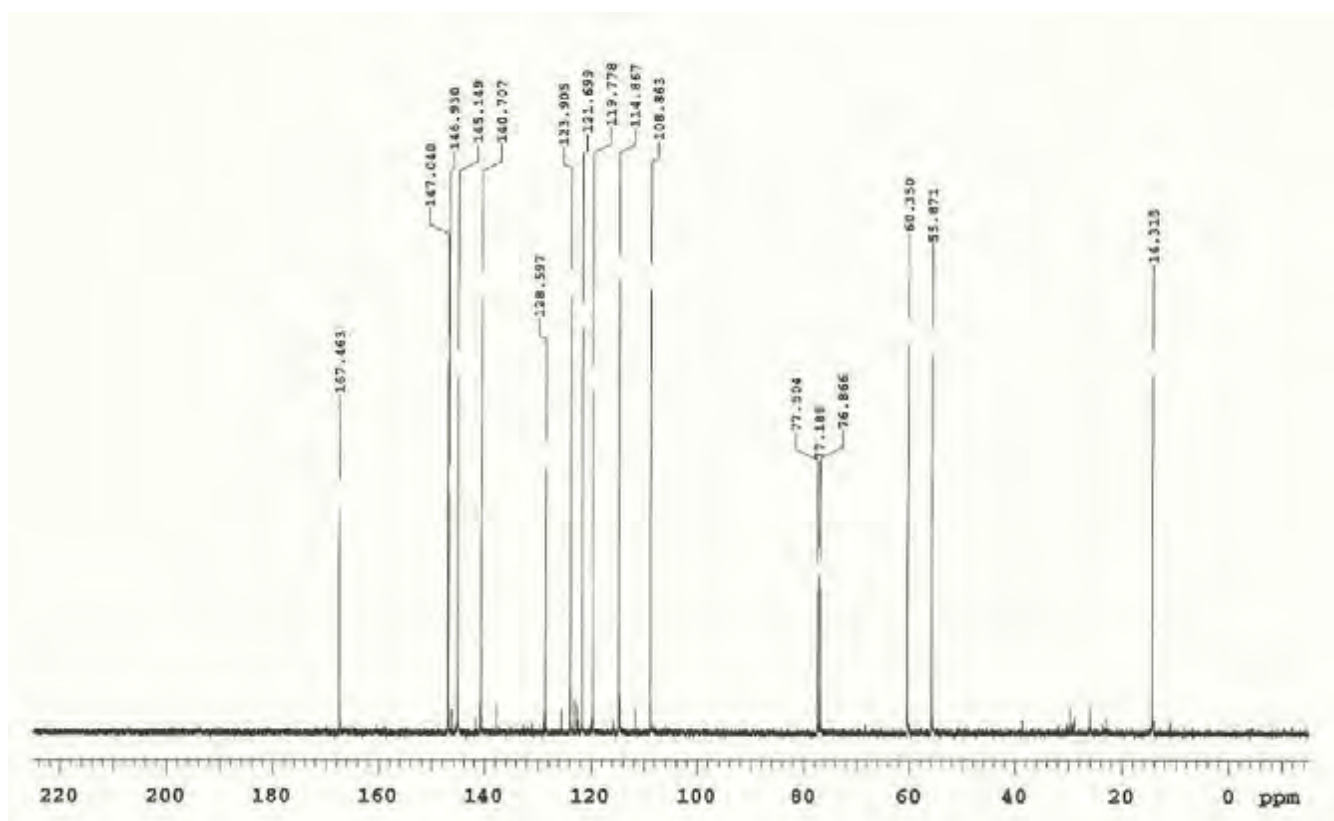
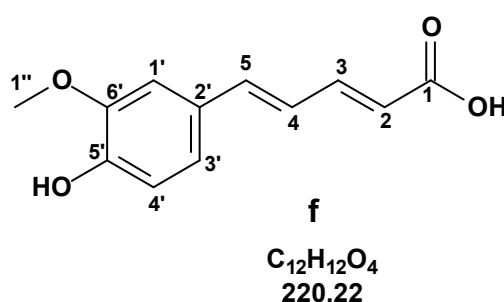
Figura 1.20: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **e**

Figura 1.21: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância **e**

3.2.4. Ácido carboxílico f (ácido ferupérico)



A substância **f** apresentou-se como um sólido amarelado cristalino. No espectro de RMN 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, Figuras 1.22 e 1.23) foram observados: um sinal em δ 6,59 (*ddd*, $J = 15,2; 7,60; 2,80$ Hz; 1H), atribuído ao H-3; um sinal em δ 6,30 (*d*, $J = 2,0$ Hz; 1H), atribuído ao H-1'; um sinal em δ 6,17 (*dd*, $J = 8,4; 2,0$ Hz; 1H), atribuído ao H-3'; um sinal em δ 5,96 (*d*, $J = 8,40$ Hz; 1H), atribuído ao H-4'; um sinal em δ 5,18 (*d*, $J = 15,2$ Hz; 1H), atribuído ao H-2; um sinal em δ 3,07 (*s*, 3H), atribuído aos H-1" do grupo metoxila. O espectro confirma que a hidrólise do grupo éster foi eficiente.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 1.24) foram observados um sinal em δ 173,7, atribuído ao C-1 da carboxila nila de função ácido carboxílico; dez sinais em δ 151,8; δ 151,7; δ 149,7; δ 144,8; δ 132,3; δ 127,3; δ 125,2; δ 123,3; δ 118,9; δ 113,5, relativos aos quatro carbonos sp^2 de duas ligações duplas do sistema carboxila $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada e dos seis carbonos sp^2 do anel aromático; e um sinal em δ 58,9, atribuído ao C-1" do grupo metoxila.

A massa molecular $C_{12}H_{12}O_4$ foi confirmada através da inspeção do espectro de ESI-MS (Figura 1.25), que mostrou o pico do íon quasi-molecular em m/z 219,2 $[M - H]^-$.

Figura 1.22: Espectro de RMN de 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) da substância **f**

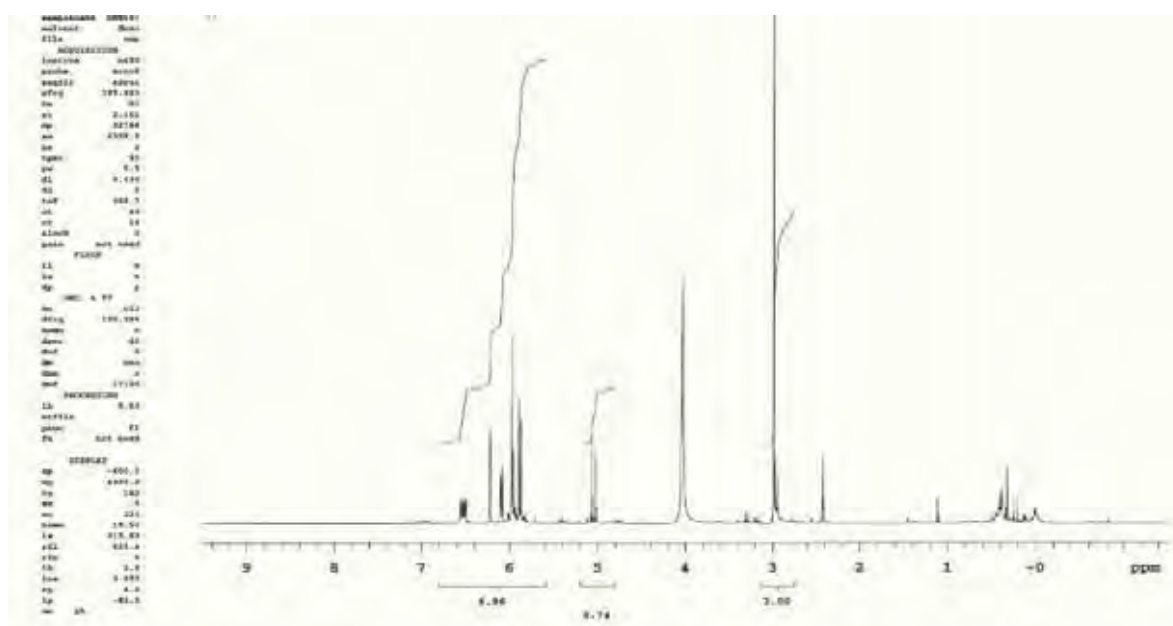


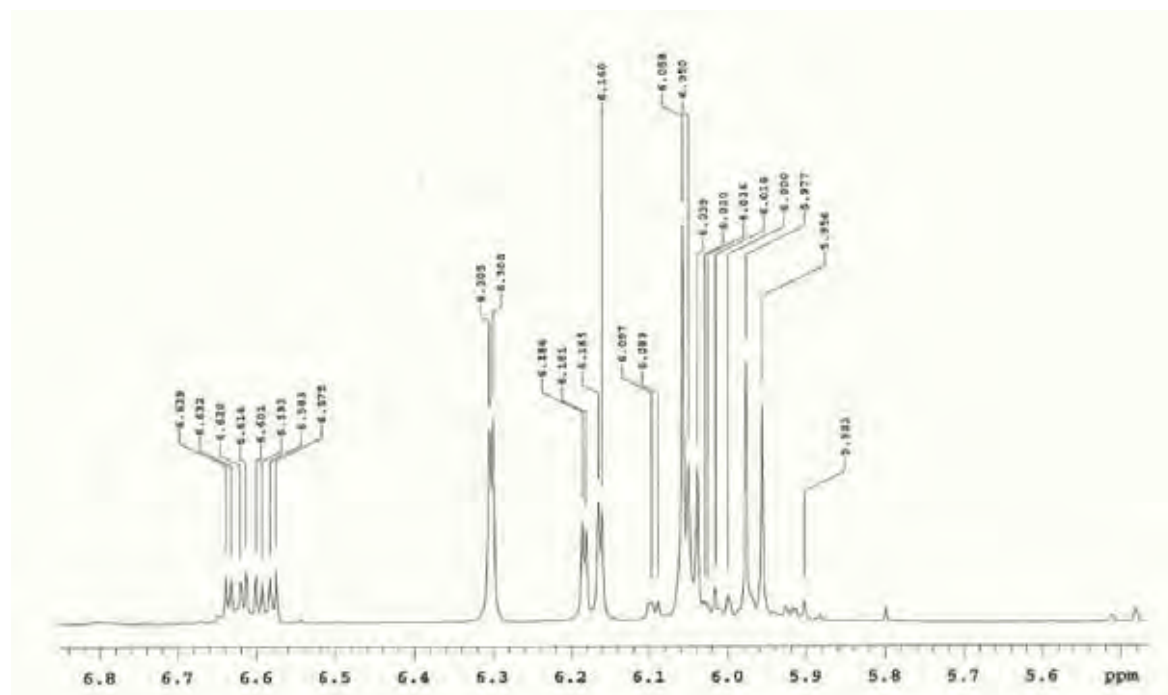
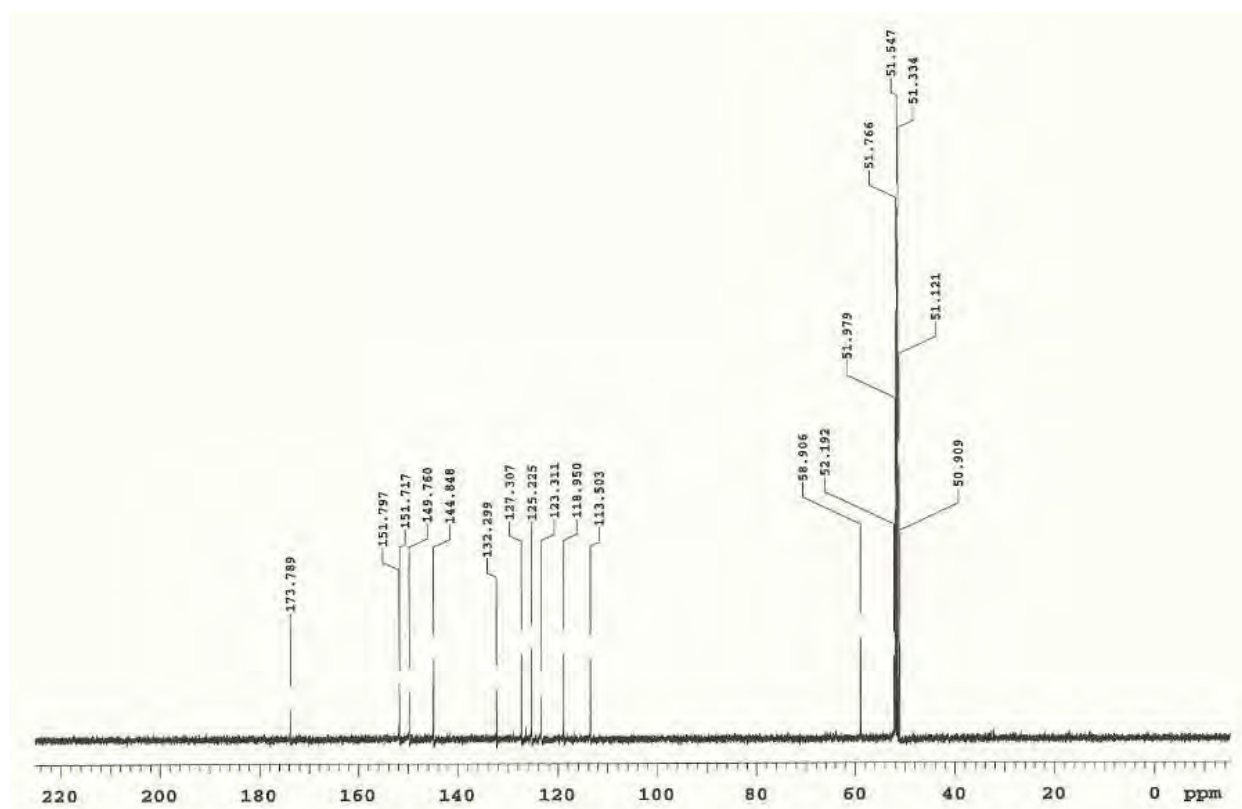
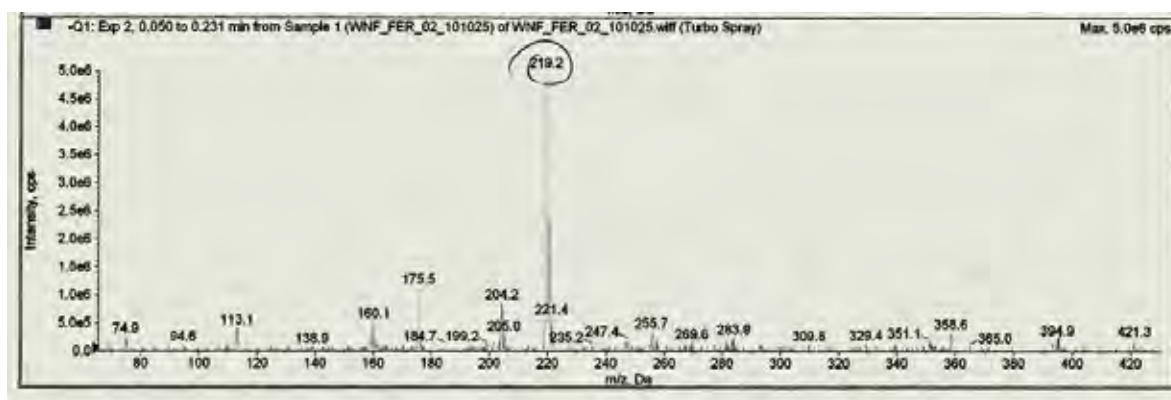
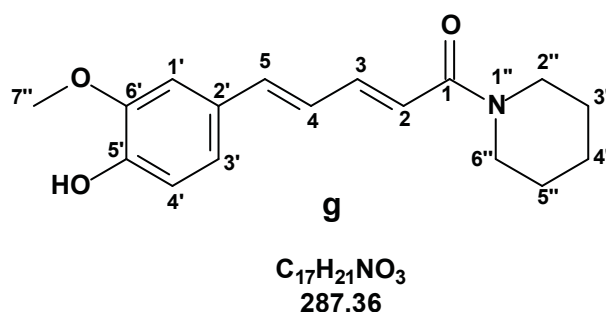
Figura 1.23: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (DMSO, 400 MHz) da substância **f****Figura 1.24:** Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO, 100 MHz) da substância **f**

Figura 1.25: Espectro de Massas da substância **f** (modo negativo)

3.2.5. Amida **g** (feruperina)



A substância **g** apresentou-se como um sólido amarelado. No espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz, Figura 1.26) foram observados: um sinal em δ 7,41 (*ddd*, $J = 15,2$; 7,60; 2,80 Hz; 1H), atribuído ao H-3; um sinal em δ 6,99 (*dd*, $J = 8,0$; 1,6 Hz; 1H), atribuído ao H-3'; um sinal em δ 6,95 (*d*, $J = 1,6$ Hz; 1H), atribuído ao H-1'; um sinal em δ 6,89 (*d*, $J = 8,0$ Hz; 1H), atribuído ao H-4'; um sinal em δ 6,44 (*d*, $J = 15,2$ Hz; 1H), atribuído ao H-2; um sinal em δ 3,92 (*s*, 3H), atribuído aos H-7'' do grupo metoxila; sinais entre δ 3,64 e δ 3,53 (*m*, 4H), atribuído aos H-2'' e H-6'' do anel piperidínico; sinais entre δ 1,66 e δ 1,59 (*m*, 6H), atribuído aos H-3'', H-4'' e H-5'' do anel piperidínico. Os dados foram comparados com a literatura (CORREA et al., 2010) e o espectro confirma então que a preparação da amida feruperina foi eficiente.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 1.27) foram observados um sinal em δ 165,6, atribuído ao carbono C-1, característico de carbonila de função amida; dez sinais em δ 147,0; δ 146,9; δ 143,0; δ 138,9; δ 128,8; δ 124,6; δ 121,1; δ 119,3; δ 114,9; δ 108,9, relativos aos quatro carbonos sp^2 de duas ligações duplas do sistema carbonila $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada e dos seis carbonos sp^2 do anel aromático; e um sinal em δ 55,8, atribuído ao C-7'' do grupo metoxila; um sinal em δ 41,8 atribuído aos C-2'' e C-6'' do anel piperidínico; um sinal em δ 24,6 atribuído ao C-4'' do anel piperidínico; um sinal em δ 23,5 atribuído aos C-3'' e C-5'' do anel piperidínico.

A massa molecular $C_{17}H_{21}NO_3$ foi confirmada através da inspeção do espectro de ESI-MS (Figura 1.28), que mostrou o pico do íon quasi-molecular em m/z 286,4 $[M - H]^-$.

Figura 1.26: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da substância **g**

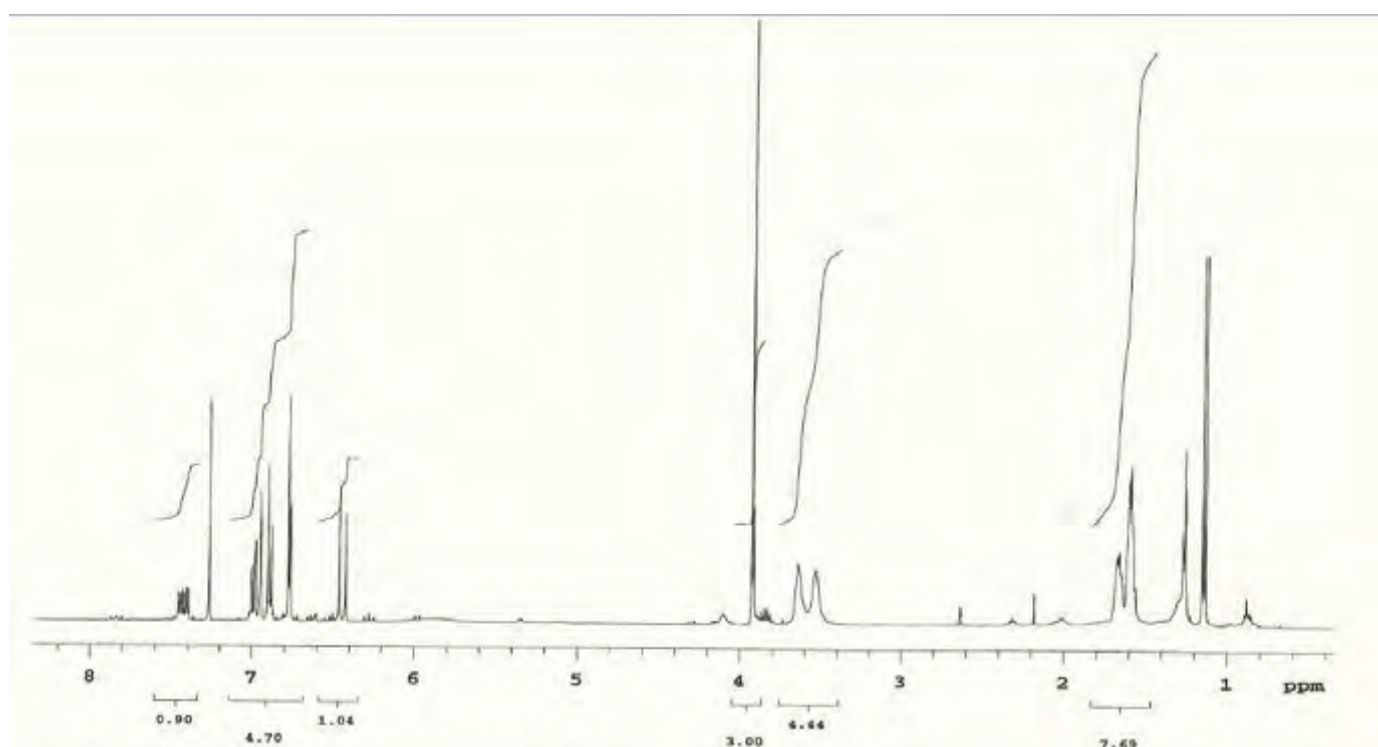


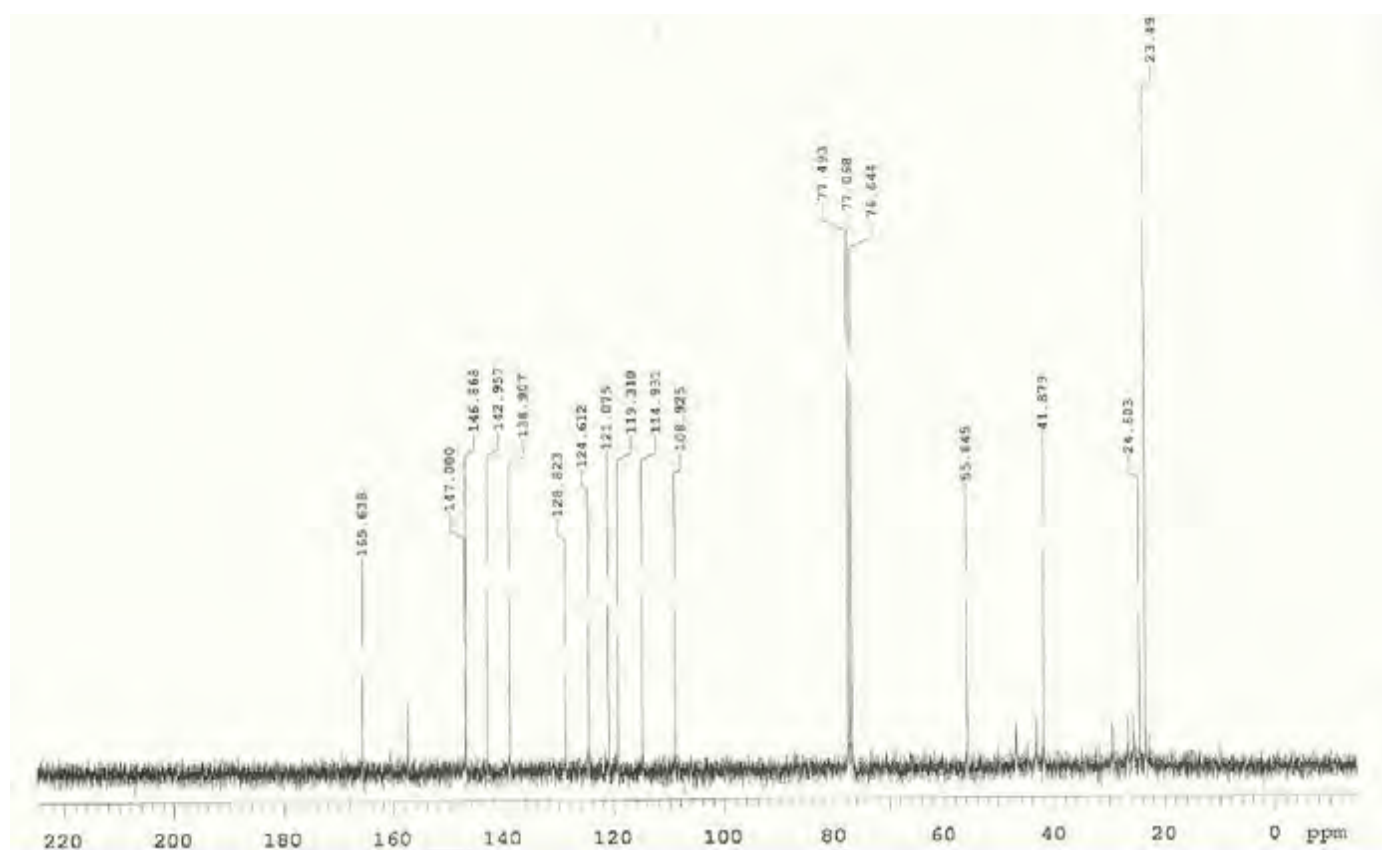
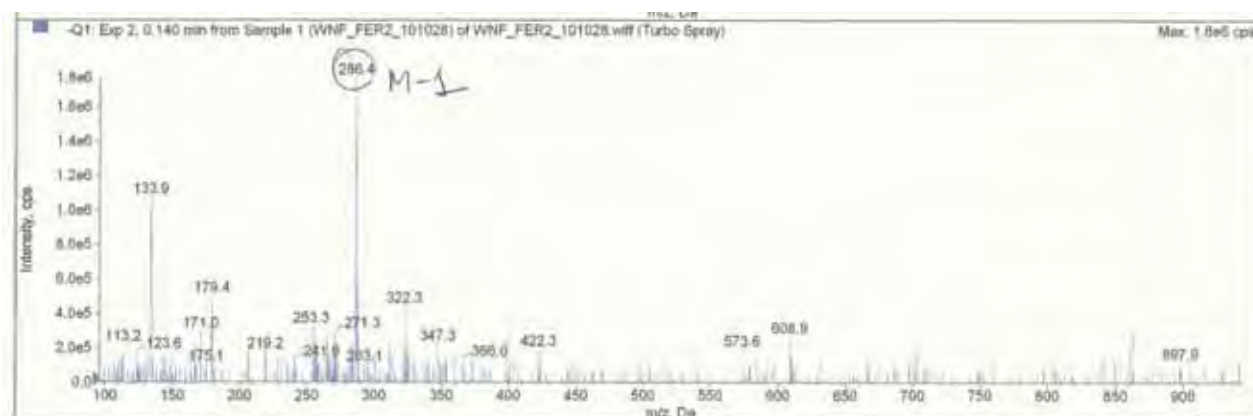
Figura 1.27: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) da substância **g**

Figura 1.28: Espectro de Massas da substância g (modo negativo)



3.3. Monitoramento de atividade enzimática

3.3.1. Monitoramento da atividade da enzima PAL (fenilalanina amônia liase) e TAL (tirosina amônia liase) em folhas de *P. tuberculatum*

A enzima tetramérica **PAL** (fenilalanina amônia liase) é a primeira enzima envolvida na biossíntese de fenilpropanóides (Figura 1.29) e está presente em plantas superiores, mas é extremamente rara em procariotos (MOORE et al., 2002). O único exemplo de atividade da PAL (EC 4.3.1.24) em um procarioto está restrito ao actinomiceto *Streptomyces maritimus*, onde foi demonstrado que o gene *EncP* codifica uma proteína com a atividade PAL (McDONALD e D'CUNHA, 2007; XIANG e MOORE, 2005). Em plantas magnoliopsidas (antigamente denominadas dicotiledôneas) a PAL é extremamente seletiva para fenilalanina como substrato, já em monocotiledôneas, é possível tanto que a fenilalanina quanto a tirosina sejam catalisadas por uma única enzima que reconhece os dois aminoácidos como substrato, caracterizando-se como uma enzima com atividade PAL/TAL (CALABRESE et al., 2004). Enzimas que reconhecem apenas a tirosina como substrato são chamadas TAL (tirosina amônia liase/ EC 4.3.1.23) e a atividade destas foi observada em plantas da família Graminae/Poaceae, que são monocotiledôneas (DEWICK, 2009).

A ordem Piperales apresenta caracteres comuns a várias monocotiledôneas, que são raros ou incomuns em dicotiledôneas, mais especificamente quanto à organização do sistema vascular. Dahlgren e Clifford (1982) destacam a hipótese de que a família Piperaceae representa um grupo de transição entre mono e dicotiledôneas, visto que ambos os grupos originam-se de um tronco comum (ALBIERO et al., 2006). Devido a este fato, analisou-se a atividade enzimática da PAL e da TAL frente aos dois possíveis aminoácidos que podem dar origem ao ácido *p*-cumárico (Figura 1.29), considerando a possibilidade de uma diferenciação na regulação metabólica em relação às outras dicotiledôneas, isto é, a enzima TAL ser ativa em *P. tuberculatum*.

Após experimento de monitoramento de atividade destas duas enzimas (incubação do extrato enzimático com os dois possíveis precursores do ácido *p*-cumárico, os aminoácidos fenilalanina e tirosina), foi constatado que houve intensa conversão de fenilalanina à ácido cinâmico (Figura 1.30), mas não foi observado a conversão da tirosina ao ácido *p*-cumárico (Figura 1.31). Isto indica que apesar da espécie pertencer a uma família que possui aspectos morfológicos das monocotiledôneas, o metabolismo opera como as magnoliopsidas em geral, ou seja, a via fenilpropanoídica opera pela sequência fenilalanina→ácido cinâmico. No entanto, a ausência de atividade da enzima TAL em *P. tuberculatum* só poderá ser descartada se não forem detectados genes que codificam esta enzima.

Figura 1.29: Possibilidades de formação do ácido *p*-cumárico: **PAL** (fenilalanina amônia liase/catalisa conversão da fenilalanina em ácido cinâmico), **PAH** (fenilalanina hidroxilase/catalisa a conversão da fenilalanina em tirosina), **C4H** (cinamato 4-hidroxilase/ catalisa a conversão do ácido cinâmico em ácido *p*-cumárico), **TAL** (tirosina 4-hidroxilase/catalisa conversão da tirosina em ácido *p*-cumárico)

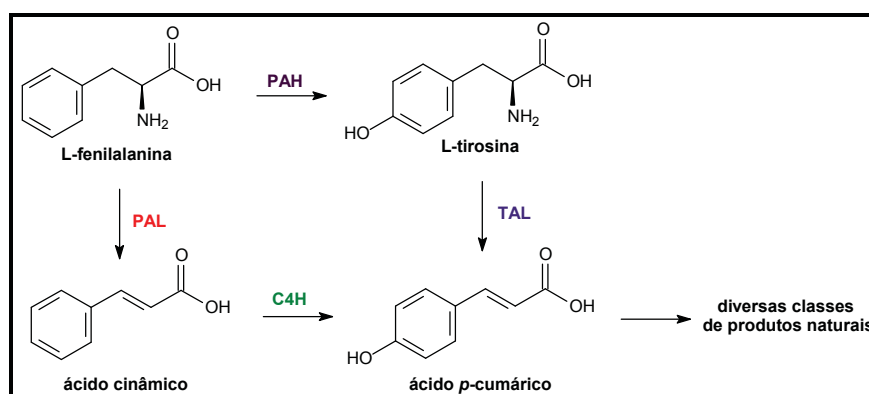


Figura 1.30: **Cromatograma A:** tempo de retenção da fenilalanina ($t_R = 3,05$ min); **Cromatograma B:** tempo de retenção do ácido cinâmico ($t_R = 4,10$ min); **Cromatograma C:** constatação da reação de trans-desaminação da fenilalanina catalisada pela enzima PAL com obtenção do ácido cinâmico.

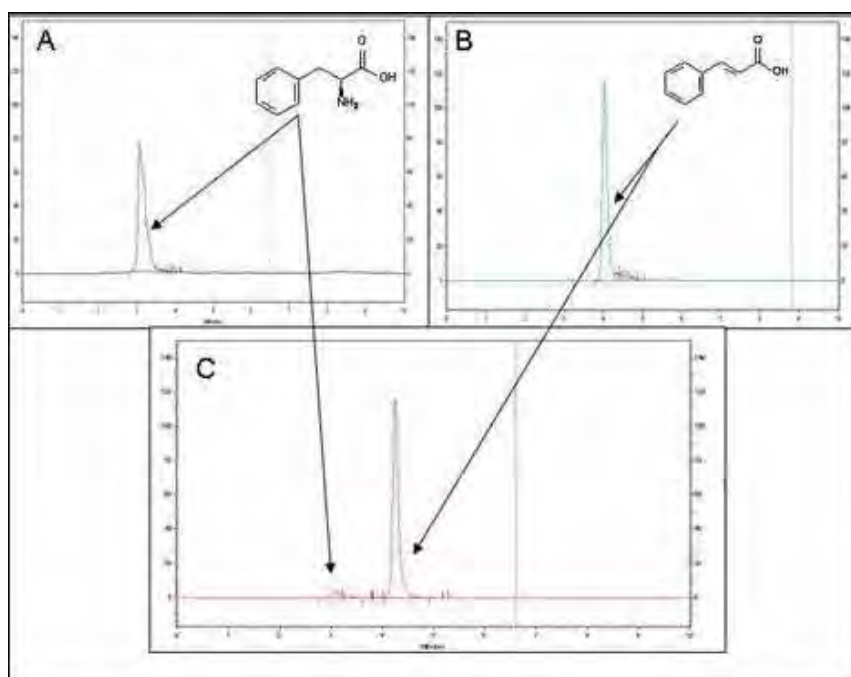
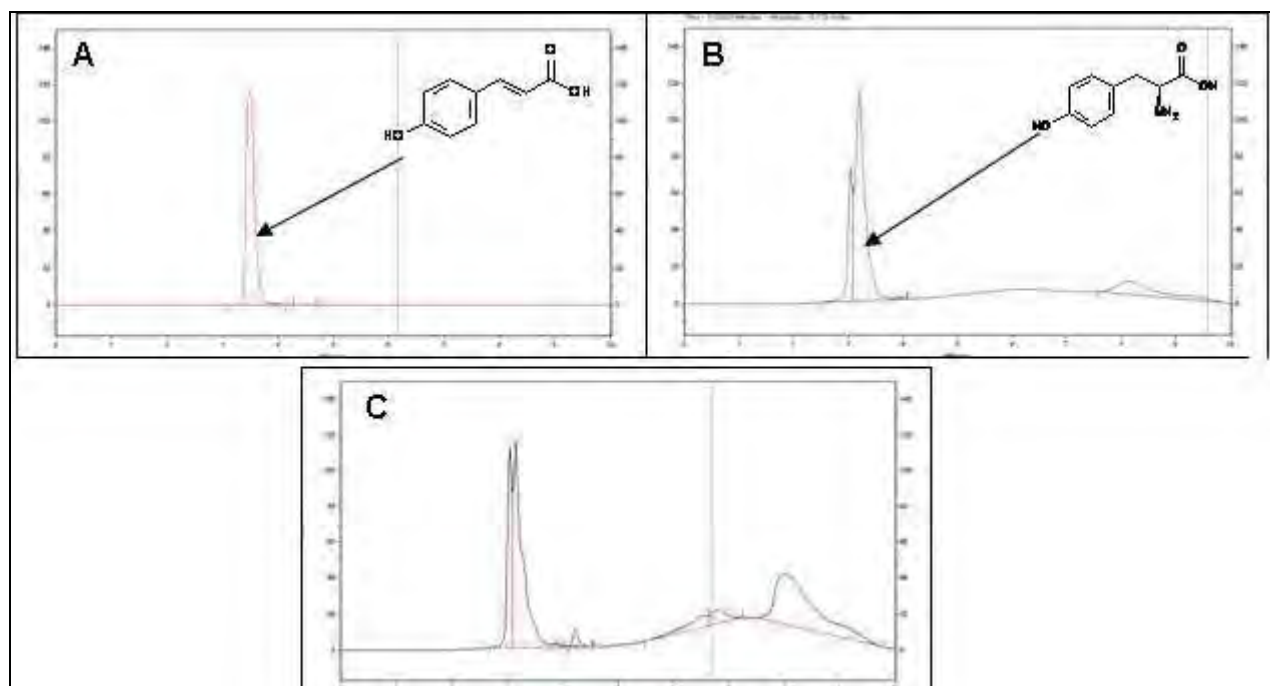


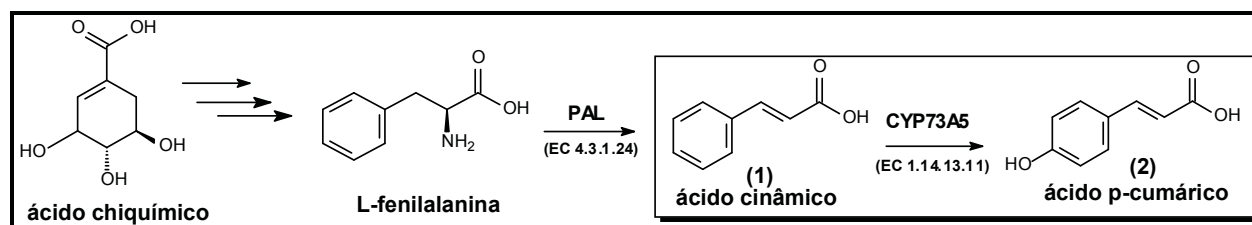
Figura 1.31: Cromatograma A: tempo de retenção do ácido *p*-cumárico ($t_R = 3,40$ min); **Cromatograma B:** tempo de retenção da tirosina ($t_R = 3,10$ min); **Cromatograma C:** reação de trans-desaminação da tirosina catalisada pela enzima TAL realizada com extrato enzimático de *P. tuberculatum* (não foi observado reação)



3.3.2. Monitoramento da atividade da enzima C4H (cinamato 4-hidroxilase) em folhas de *P. tuberculatum*

Cinamato 4-hidroxilase (**C4H**), uma enzima citocromo P450-dependente que catalisa a hidroxilação do ácido cinâmico (Figura 1.32), é a segunda enzima envolvida na biossíntese de fenilpropanóides. O produto da reação é o ácido *p*-cumárico, que é precursor de diversas classes de substâncias como, lignanas, piperamidas, flavonóides, entre outras.

Figura 1.32: Participação da enzima C4H na biossíntese de fenilpropanóides



O experimento para monitorar a atividade da enzima C4H constou da incubação do ácido cinâmico com o extrato enzimático preparado conforme protocolo desenvolvido por Durst (2006) e da comparação do tempo de retenção observado por análise em CLAE entre o produto formado (Figura 1.33b) com o padrão ácido *p*-cumárico (Figura 1.33a). Houve formação de um produto com tempo de retenção semelhante ao padrão e que não era endógeno, ou seja, não

pertencia ao extrato enzimático. O produto foi recolhido e posteriormente concentrado. Realizou-se então a análise utilizando um cromatografia a gás acoplada à um espectrômetro de massas (impacto eletrônico) (CG-EM). O espectro obtido revelou pico do íon molecular em m/z 164, o que pôde ser atribuído ao ácido *p*-cumárico (Figura 1.33c). A amostra também foi analisada por espectrometria de massas de alta resolução (EI) no modo positivo (LC-MS) e o espectro obtido revelou um pico do íon quasi-molecular em m/z 165,0547 $[M+H]^+$ e um fragmento de massa m/z 147,0476 $[M-H_2O+H]^+$ (Figura 1.33d), atribuído a perda de uma molécula de água (OU et al., 2009).

Isto indica que apesar da espécie pertencer a uma família que possui aspectos morfológicos das monocotiledôneas, nas condições utilizadas nesta análise, o metabolismo operaria como as dicotiledôneas em geral, ou seja, utiliza a sequencia fenilalanina→ácido cinâmico→ácido *p*-cumárico.

Figura 1.33: a) Estabelecimento de condição cromatográfica para o ácido *p*-cumárico (padrão). Condições de análise via CLAE: volume de amostra injetado: 10 μ L; fluxo = 1,0 mL/min; λ = 278 nm; coluna: Supelcosil LC-18 (25 cm X 4,6 mm, 5 μ m); fase móvel: H₂O (0,01% de HAc):MeOH/9:1.

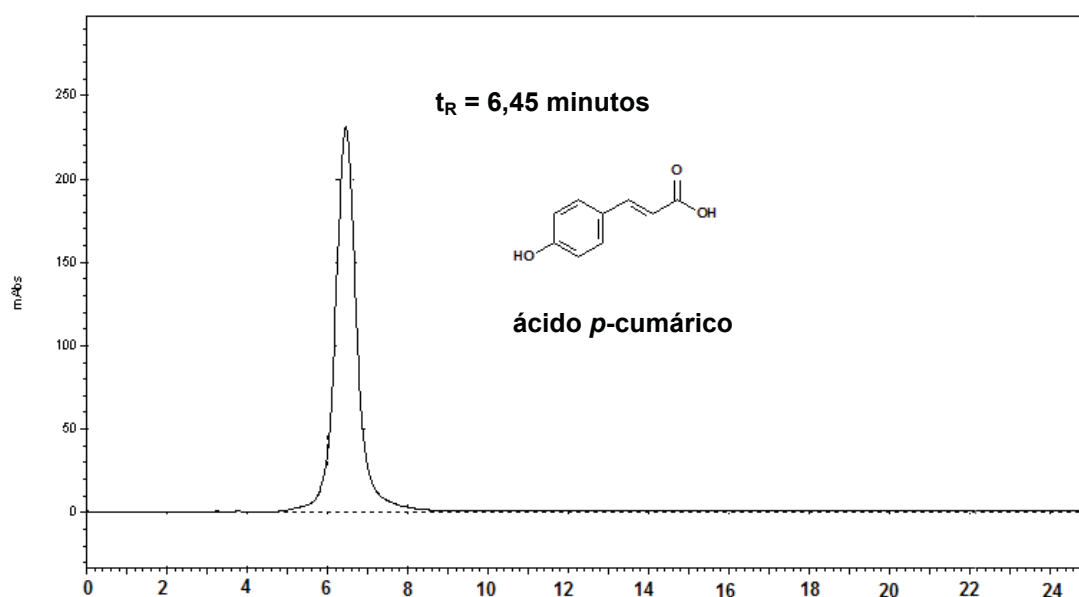


Figura 1.33: b) análise em CLAE do produto reacional (ácido cinâmico + extrato enzimático – linha vermelha) com sobreposição do cromatograma do padrão (ácido cinâmico - cromatograma anterior – linha escura)

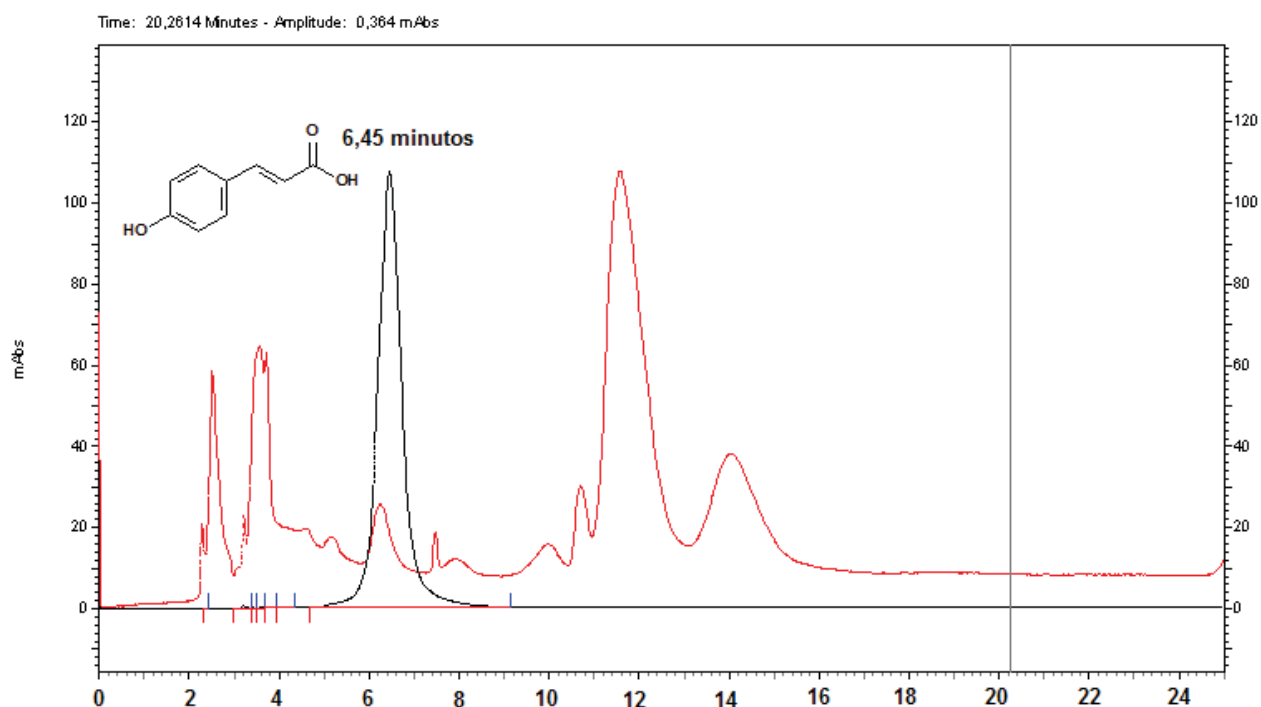


Figura 1.33: c) Espectro de Massas relativo ao produto da reação enzimática (ácido *p*-cumárico) - impacto eletrônico (EI)

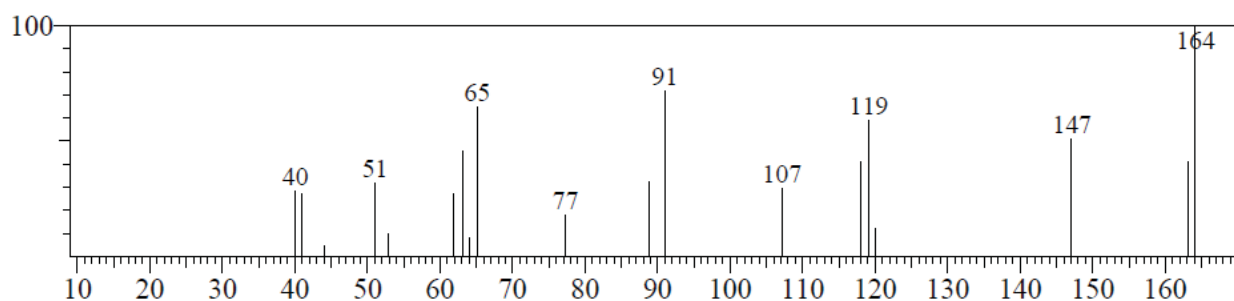
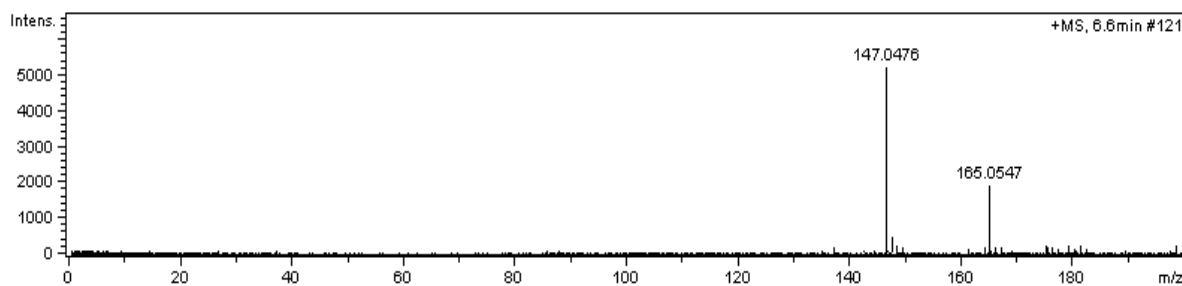


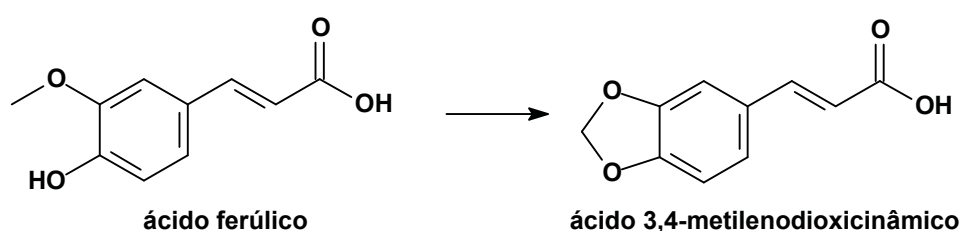
Figura 1.33: d) Espectro de Massas relativo ao produto da reação enzimática (ácido *p*-cumárico) - ionização química (CI).



3.3.3 Utilização de fração microsomal extraída de folhas de *P. tuberculatum* para monitorar atividade da enzima que catalisa a conversão do grupo 4-hidroxi-3-metóxfenil (ácido ferúlico) ao grupo metilenodioxifenil (ácido 3,4-metilenodioxicinâmico)

Com o intuito de averiguar a possibilidade de conversão do grupo 4-hidroxi-3-metóxfenil ao grupo 3,4-metilenodioxifenil, utilizou-se extratos microsomais e frações solúveis obtidos das folhas de *P. tuberculatum*, tendo como precursor o ácido ferúlico (Figura 1.34). Os produtos das reações enzimáticas foram analisados via CLAE-DAD e obteve-se os cromatogramas para os substratos das reações enzimáticas do ácido ferúlico bem como do produto esperado para esta reação: o ácido 3,4-metilenodioxicinâmico (Figura 1.34)

Figura 1.34: conversão do ácido ferúlico ao ácido 3,4-metilenodioxicinâmico



Os cromatogramas das frações microsomal, sobrenadante e dos substratos/cofatores também foram obtidos (**brancos**). A tabela 1.8 relaciona todos os cromatogramas às amostras analisadas

Tabela 1.8: Cromatogramas das análises em CLAE

Cromatogramas	Substâncias analisadas
1	ácido ferúlico (1) ($t_R = 3,40$ min)
2	Mistura do ácido ferúlico e do ácido 3,4-metilenodioxílico (1) ($t_R = 7,40$ min)
3	fração microsomal (branco)
4	sobrenadante (branco)
5	substratos ácido ferulico (1), NADPH e $MgCl_2$
6	substrato 1, NADPH e $MgCl_2$ e a fração microsomal
7	substrato 1, NADPH e $MgCl_2$ e a fração sobrenadante

Nos cromatogramas 6 e 7 mostrados pelas figuras 1.40 e 1.41 foi observado um pico em 8,40 minutos, a qual pode referir-se ao ácido 3,4-metilenodioxicinâmico. A possibilidade de este pico ser um endógeno é descartada devido a análise dos cromatogramas 3 e 4, referentes aos extratos enzimáticos. A figura 1.42 mostra a sobreposição dos cromatogramas 2, 3, 4, 5, 6 e 7. Nota-se que o pico em 7,40 minutos só é observado nos cromatogramas referentes às reações

enzimáticas além do padrão (observar a linha verde traçada verticalmente), reforçando a possibilidade do ácido ferúlico ter sido convertido ao ácido 3,4-metilenodioxicinâmico. As Figuras 1.43 e 1.44 mostram uma comparação por tempo de retenção entre o ácido 3,4-metilenodioxicinâmico (linha tracejada em azul) e o substrato ácido ferúlico (linha tracejada em vermelho).

Figura 1.35: Cromatograma 1 (CLAE) do ácido ferúlico ($t_R = 3,40$ minutos)

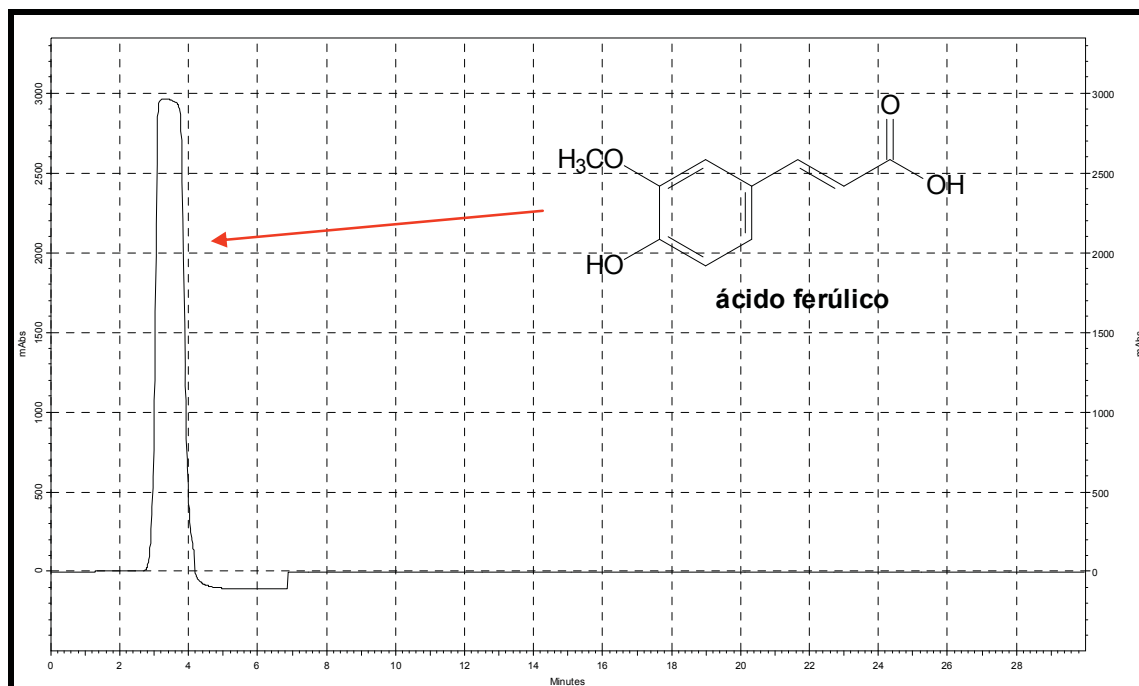


Figura 1.36: Cromatograma 2 (CLAE) da mistura do ácido ferúlico ($t_R = 3,40$ minutos) com o ácido 3,4-metilenodioxicinâmico ($t_R = 7,40$ minutos)

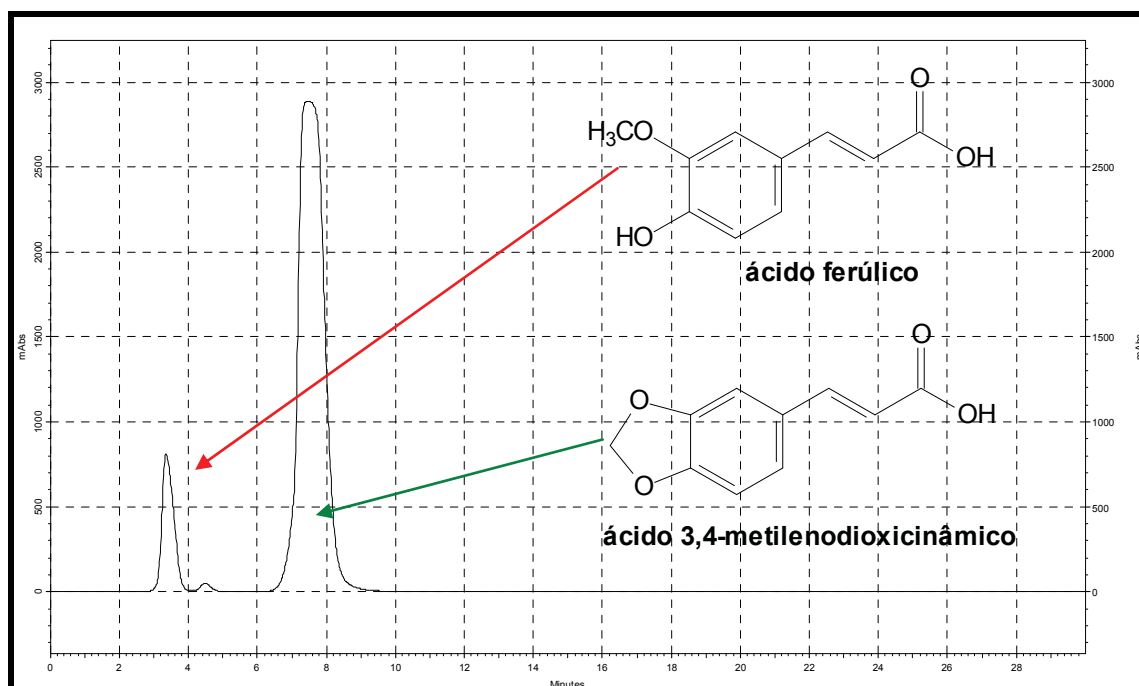


Figura 1.37: Cromatograma 3 (CLAE) da fração microssomal (branco), que mostra a presença de endógenos

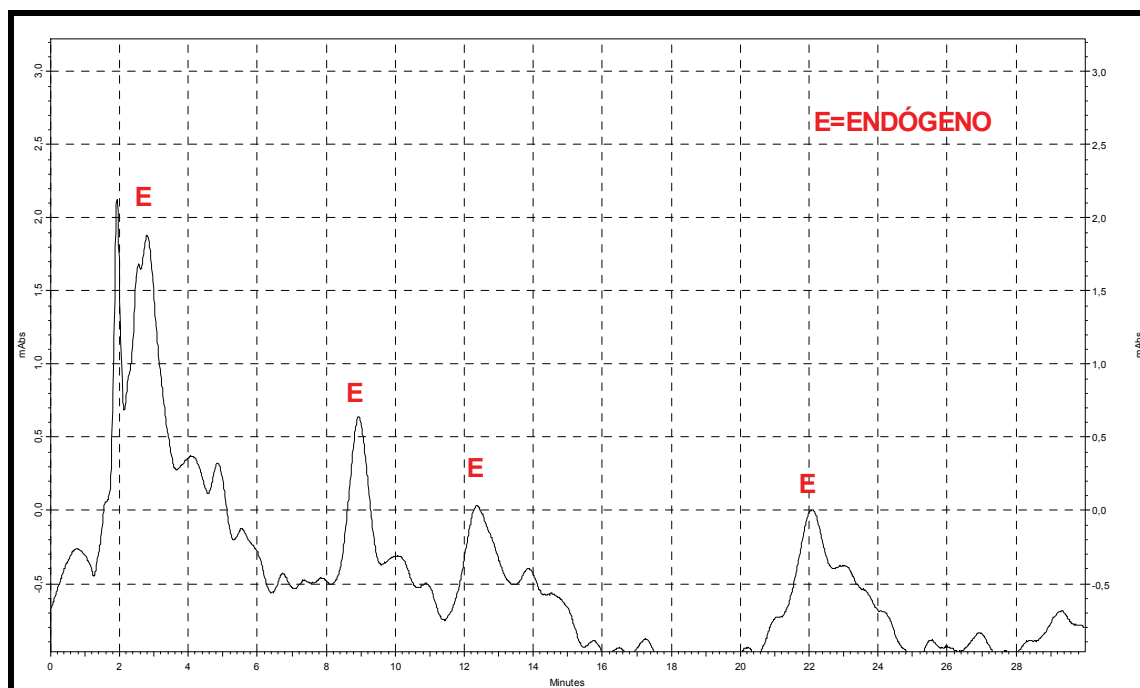


Figura 1.38: Cromatograma 4 (CLAE) do sobrenadante (branco), que mostra a presença de endógenos

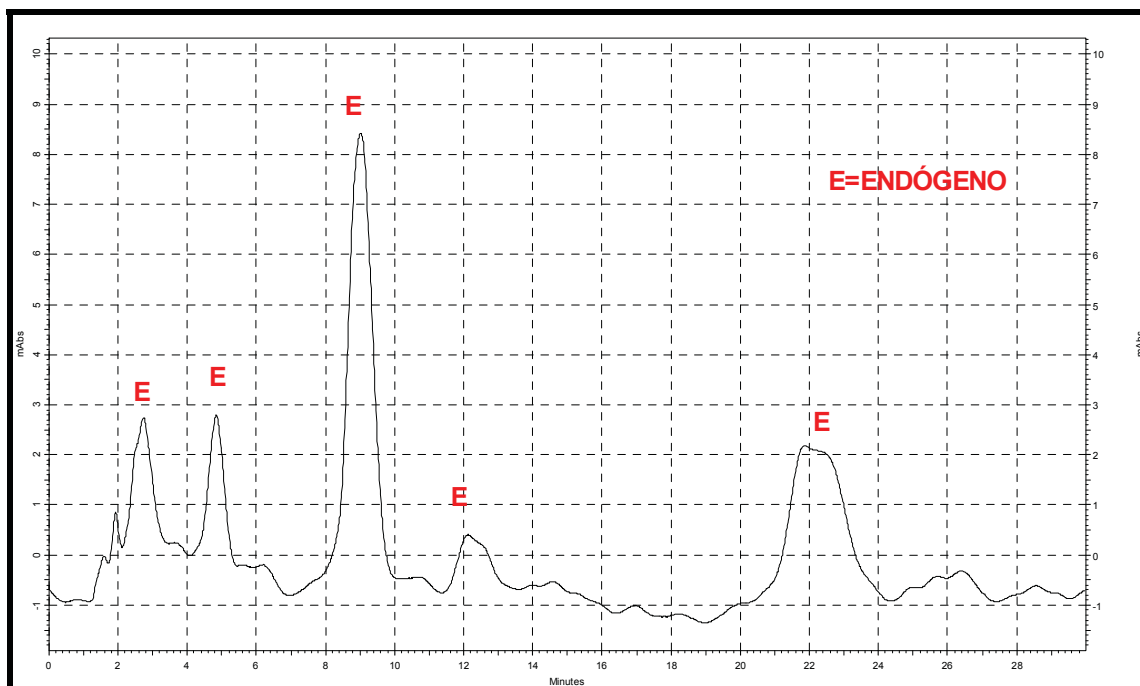


Figura 1.39 – Cromatograma 5 (CLAE) dos reagentes utilizados na reação do ácido ferúlico

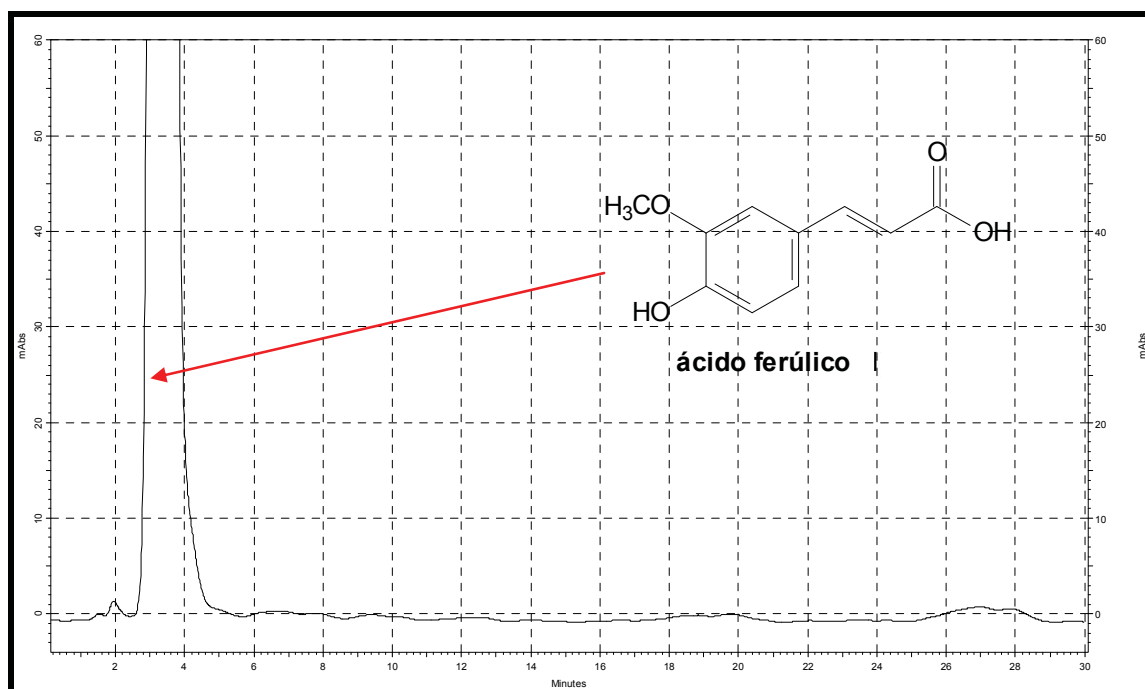


Figura 1.40: Cromatograma 6 (CLAE) da reação do ácido ferúlico (1) com a fração microsomal, onde foi observado a formação do ácido 3,4-metilenodioxicinâmico ($t_R = 7,40$ minutos)

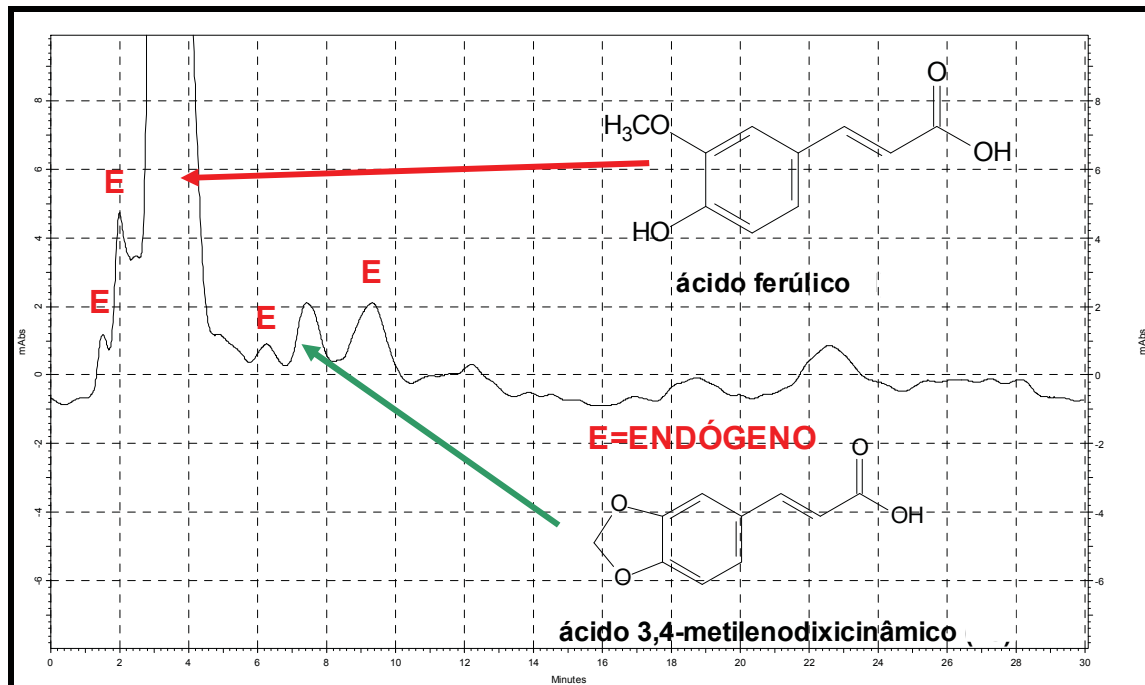


Figura 1.41 – Cromatograma 7 (CLAE) da reação do ácido ferúlico com o sobrenadante, onde foi observado a formação do 3,4-metilenodioxicinâmico ($t_R = 7,40$ minutos)

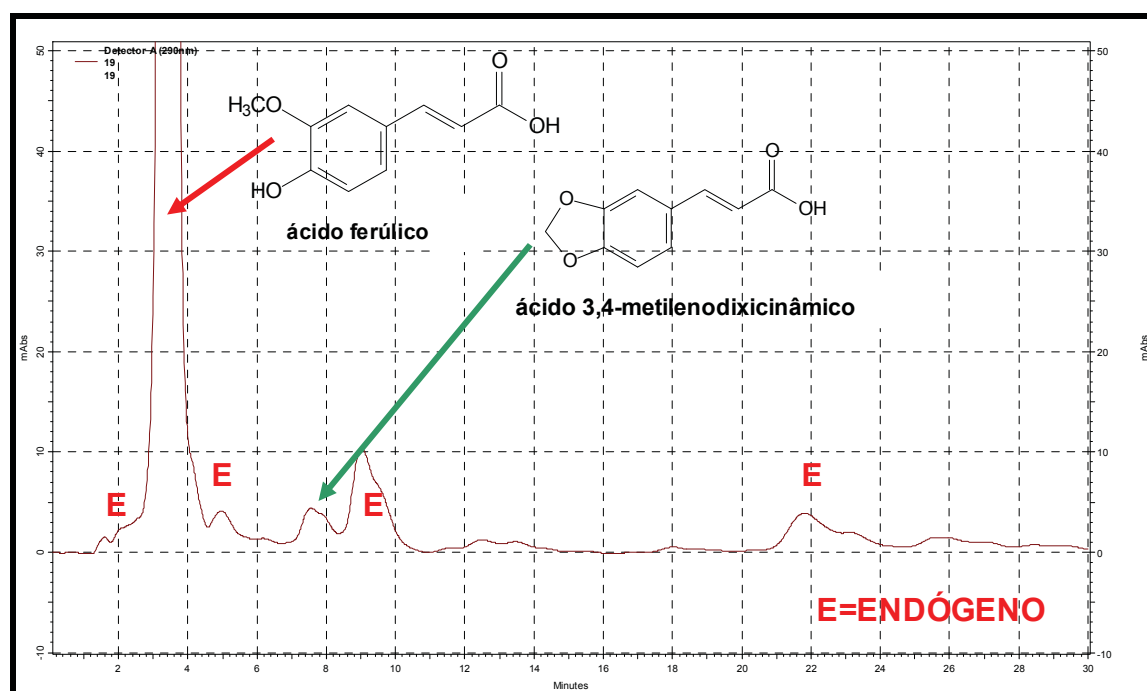


Figura 1.42 – Sobreposição dos cromatogramas 2, 3, 4, 5, 6 e 7.

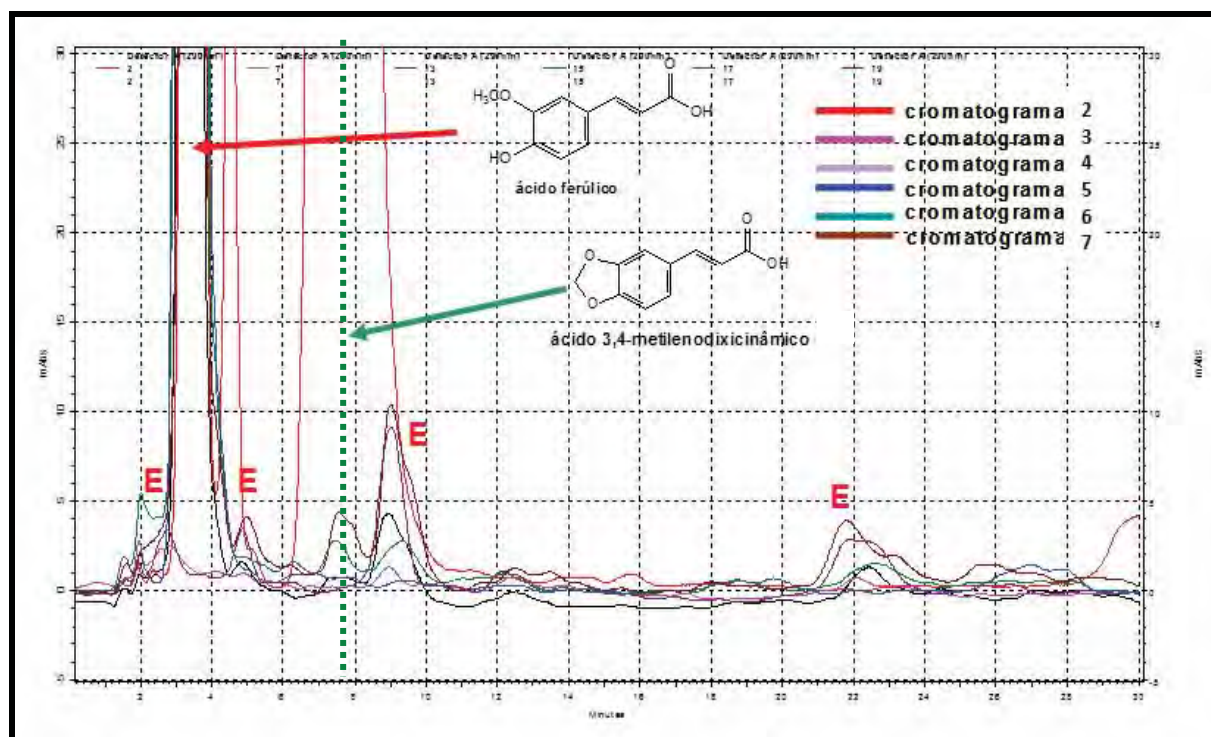


Figura 1.43: Cromatogramas do ácido 3,4-metilenodioxicinâmico/ácido ferúlico (**A**), fração microssomal (**B**) e da reação do ácido ferúlico com a fração microssomal (insolúvel) (**C**) onde foi observado a formação do ácido 3,4-metilenodioxicinâmico ($t_R = 7,40$ minutos, linha azul)

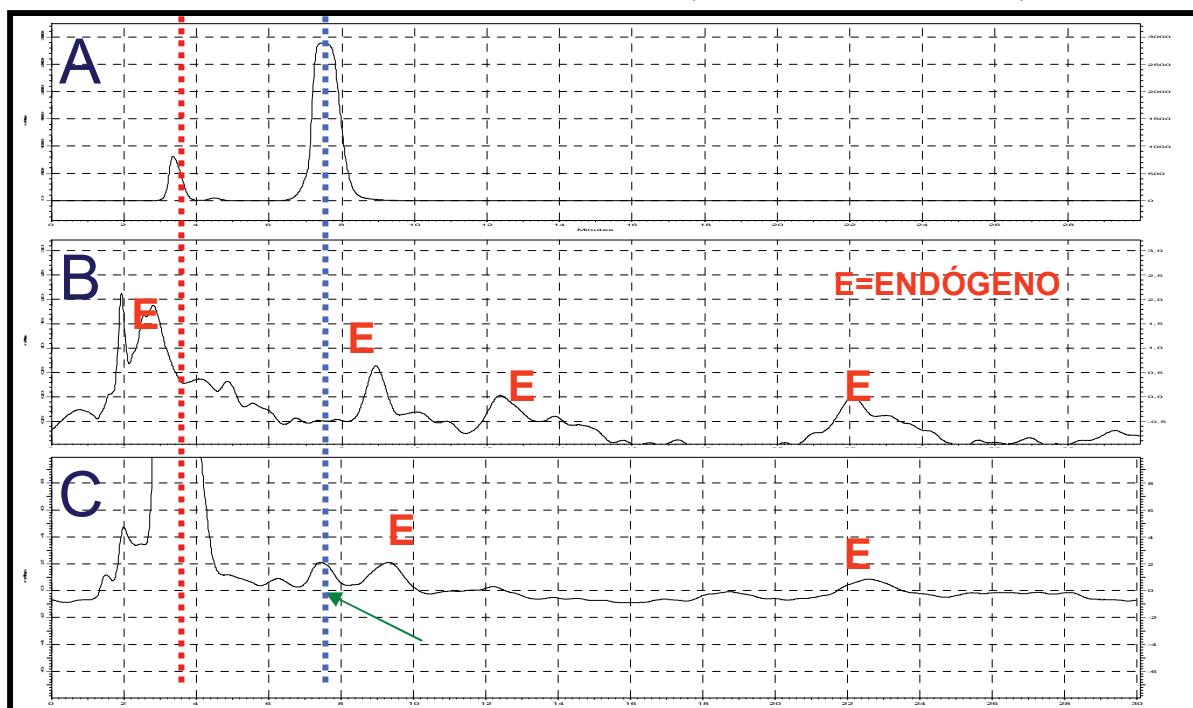
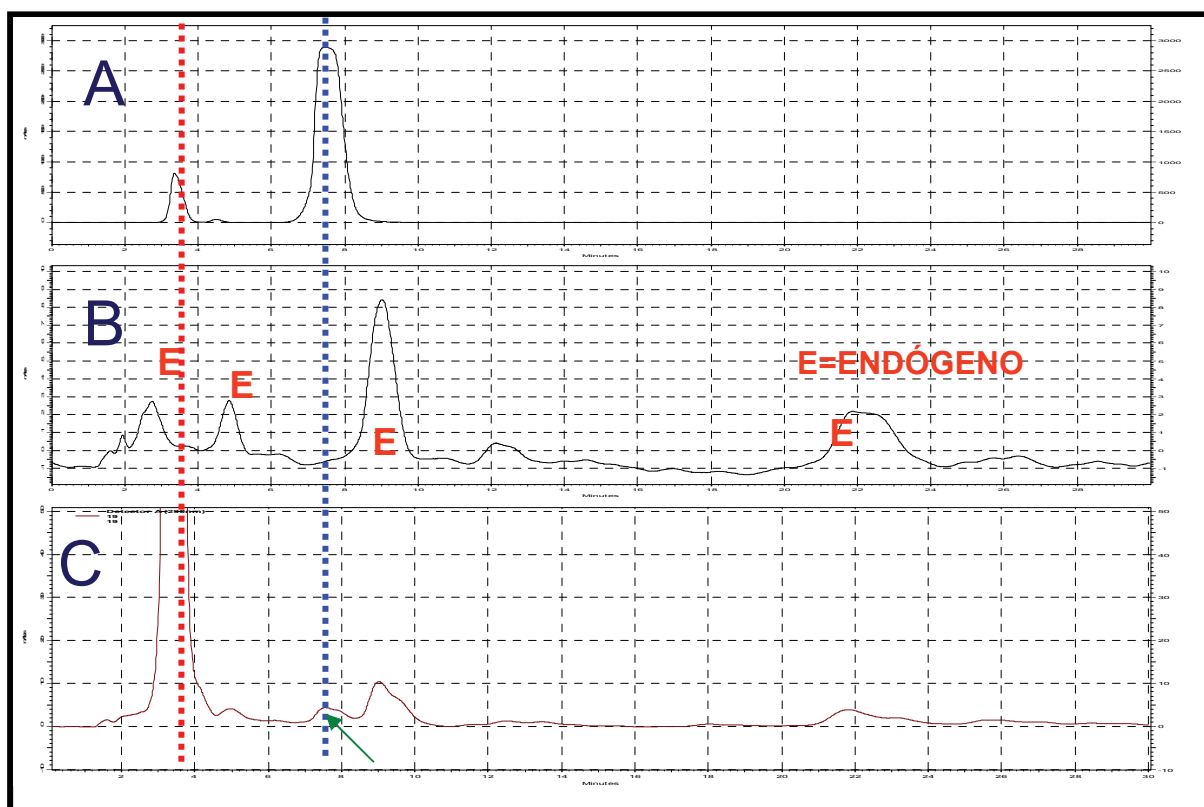


Figura 1.44: Cromatogramas do ácido 3,4-metilenodioxicinâmico/ácido ferúlico (**A**), fração sobrenadante (**B**) e da reação do do ácido ferúlico com a fração sobrenadante (solúvel) (**C**), onde foi observado a formação do ácido 3,4-metilenodioxicinâmico ($t_R = 7,40$ minutos, linha azul)

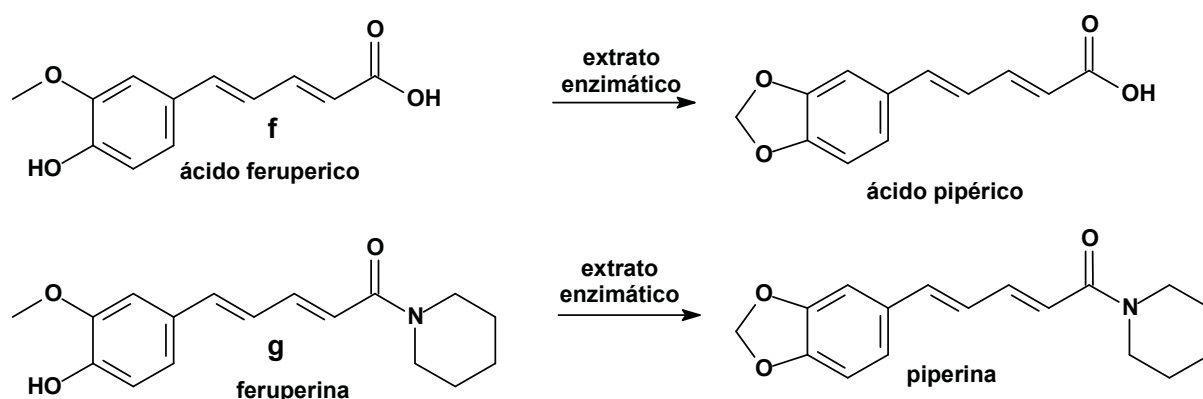


3.3.4 Utilização de fração microssomal extraída de frutos de *P. nigrum* para monitorar atividade da enzima que catalisa a conversão do grupo 4-hidroxi-3-metóxfenil (ácido ferupérico e feruperina) ao grupo metilenodioxílico (ácido pipérico e piperina)

Esta etapa foi realizada no Departamento de Biologia Celular e Metabólica (Instituto Leibniz de Bioquímica de Plantas, Halle (Saale), Alemanha), sob supervisão do Dr. Thomas Vogt. Embora o modelo para os estudos de biossíntese de amidas fosse *P. tuberculatum*, a *P. nigrum* (Figura 1.1) também foi utilizada, pois além de acumular amidas piperidínicas e isobutílicas, foi mais fácil de se encontrar em Jardins Botânicos da Alemanha, permitindo assim que o trabalho pudesse ser realizado.

Com o intuito de estudar as possibilidades de conversão do grupo 4-hidroxi-3-metóxfenil ao grupo 3,4-metilenodioxifenil, utilizou-se extratos microssomais obtidos dos frutos de *P. nigrum*, tendo como precursores o ácido ferupérico (**f**) e a amida feruperina (**g**) (Figura 1.45). Os cromatogramas dos substratos da reação e os produtos foram obtidos após análise por CLAE-DAD. A principal dificuldade nesta etapa foi eliminar a substância piperina dos extratos enzimáticos, presente em grande quantidade nos frutos, o que impediu o monitoramento da reação de conversão da feruperina em piperina. Diante disto, o extrato enzimático foi submetido à uma pré-purificação, utilizando membrana Centricon®, diminuindo assim consideravelmente a concentração de piperina, mas não eliminando-a completamente. Outras metodologias de preparação de microssomos e de eliminação de metabólitos secundários serão testadas, bem como obtenção de microssomos de outras espécies que acumulem piperina, como *P. tuberculatum*.

Figura 1.45: Reações enzimáticas – precursores incubados com extrato enzimático dos frutos de *P. nigrum*



3.4. Monitoramento da presença de ácido 3,4-metilenodioxicinâmico em frutos de *P. nigrum*

Além do monitoramento da conversão do ácido ferúlico ao ácido 3,4-metilenodioxicinâmico utilizando extrato enzimático, verificou-se se havia acúmulo deste último

em frutos de *P. nigrum*. O acúmulo dessa substância pode significar que a formação do grupo metilenodioxílico antecede as etapas de condensação com ácido malônico e a formação de amida.

Os extratos dos frutos de *P. nigrum* (Figura 1.47) mostraram a presença de uma substância com tempo de retenção de 5.90 min. que pode corresponder ao ácido 3,4-metilenodioxicinâmico (Figura 1.46). Os espectros de UV-visível para o padrão e para a substância presente no extrato também foram obtidos e mostraram similaridade.

Figura 1.46: Cromatograma mostrando tempo de retenção ($t_R = 5.90$ min.) do ácido 3,4-metilenodioxicinâmico

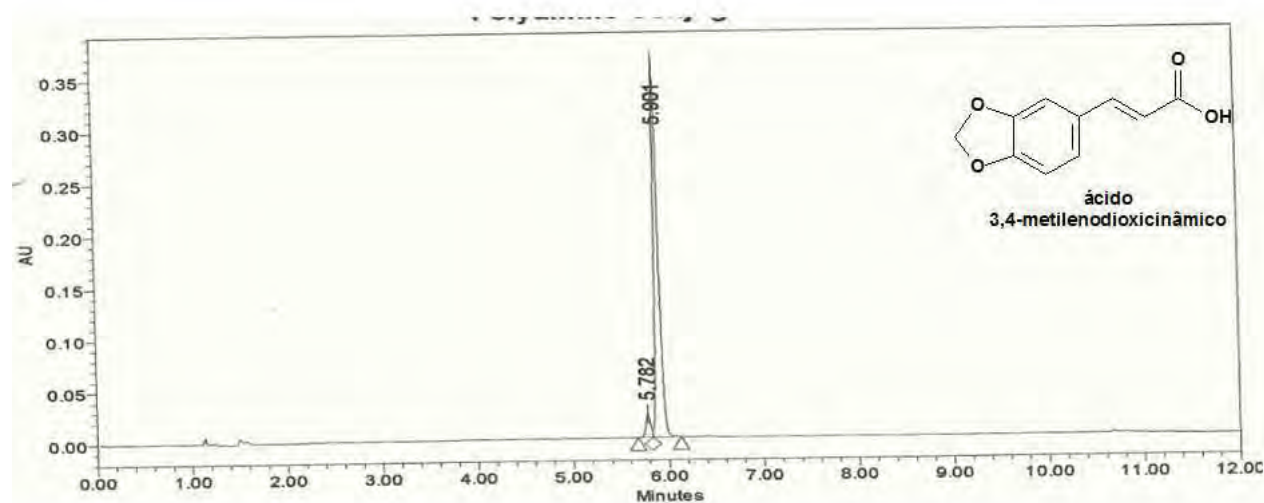


Figura 1.47: Cromatograma obtido para o extrato bruto de frutos de *P. nigrum*, mostrando tempo de retenção semelhante ($t_R = 5.90$ min.) ao do padrão de ácido 3,4-metilenodioxicinâmico

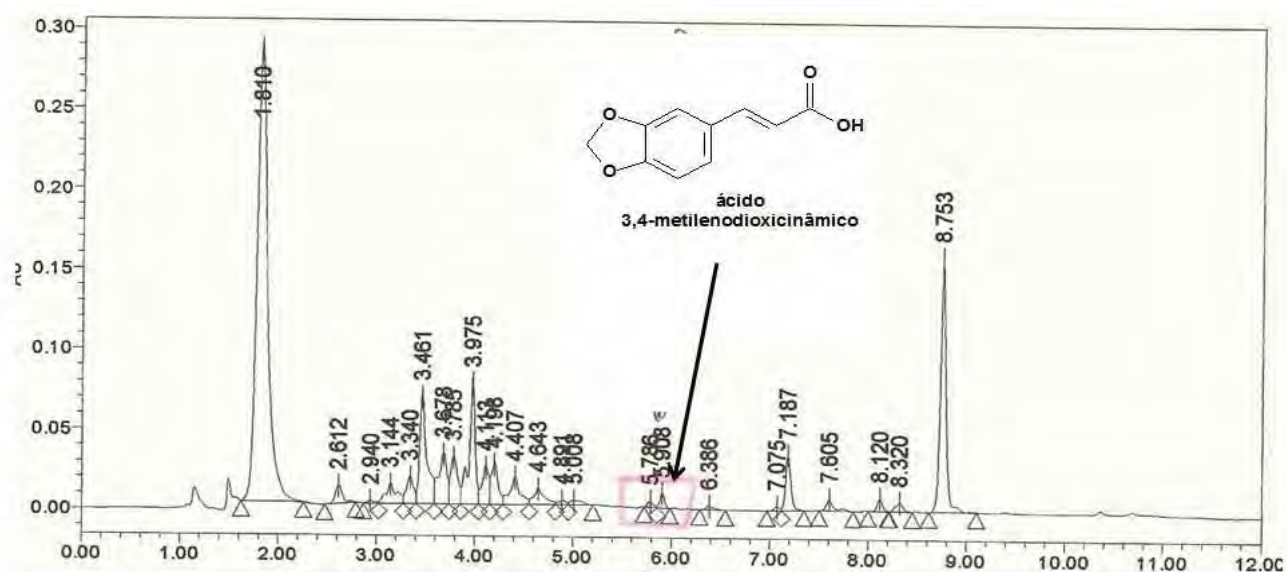
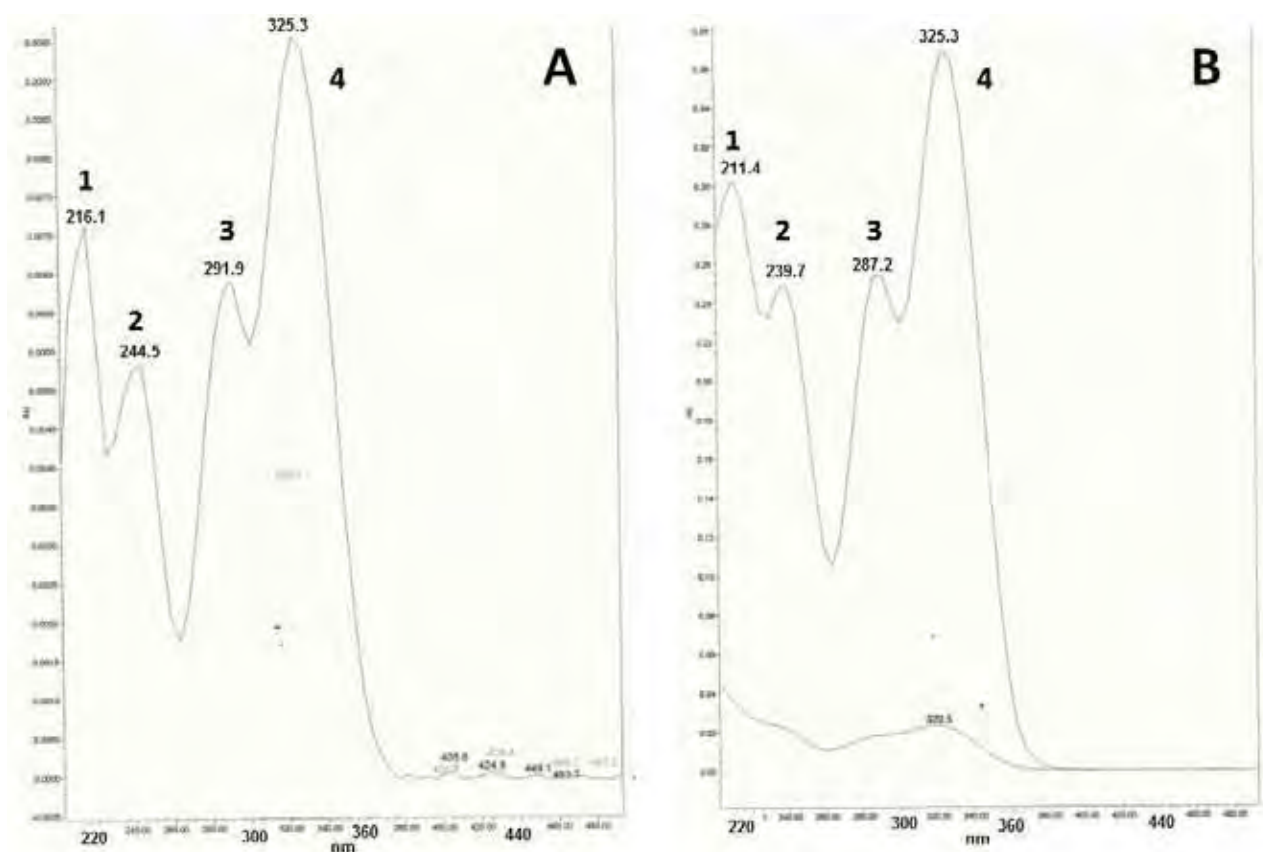


Figura 1.48: Espectro no UV-Visível para o pico em $t_R = 5,9$ min. no extrato bruto (A) e para o padrão ácido 3,4-metilenodioxicinâmico (B): comparação dos valores das bandas de absorção



3.5. Incorporação de precursores marcados com isótopos estáveis em plantas jovens de *P. tuberculatum*

Plântulas de *P. tuberculatum* foram mantidas durante 9 dias em soluções contendo precursores biossintéticos marcados com isótopos estáveis, incluindo o 2- ^{13}C -ácido malônico, o ácido malônico- $\text{U-}^2\text{H}$ e ^{15}N -L-valina. Após incorporação e metabolização destes precursores, os extratos obtidos foram analisados e comparados com os padrões das substâncias isoladas de *P. tuberculatum*, utilizando cromatografia líquida com o intuito de obter informações para a elucidação de questões biossintéticas. A figura 1.49 a seguir mostra os cromatogramas correspondentes às principais piperamidas isoladas de *P. tuberculatum* e dos extratos obtidos após a incorporação dos precursores marcados. Os espectros de massas das substâncias padrão também são apresentados.

Figura 1.49: Cromatogramas para fagaramida ($t_R = 22,08$ min.) pelitorina ($t_R = 45,62$ min.); diidropiperlongumina ($t_R = 32,35$ min.); piperina ($t_R = 42,88$ min.); diidropiperina ($t_R = 43,65$ min.)

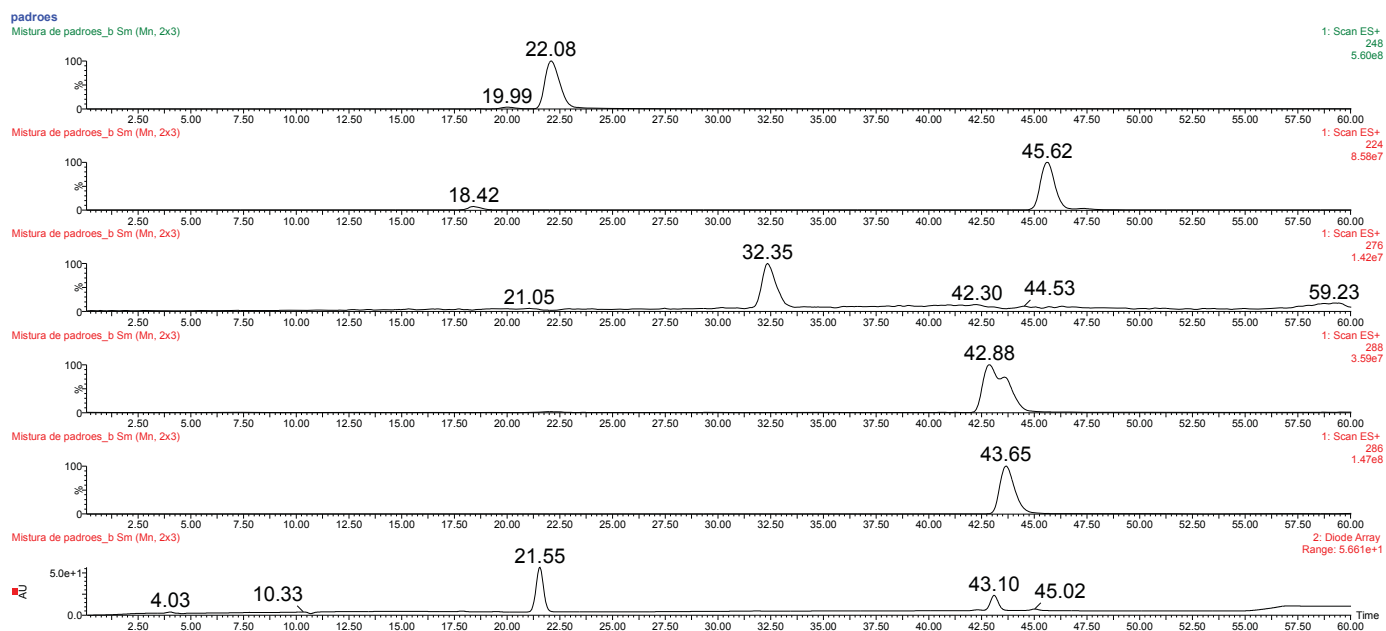


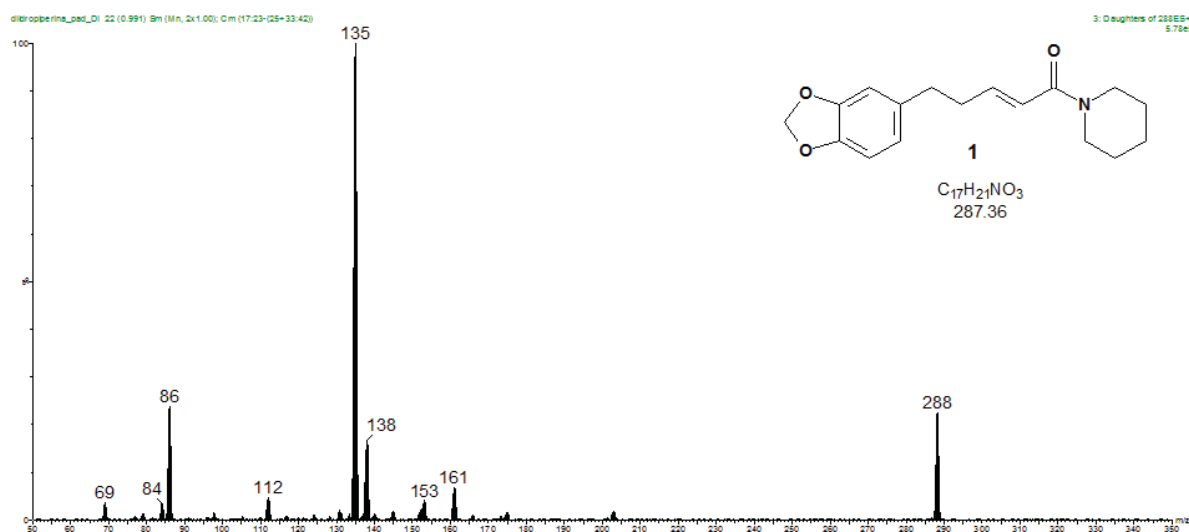
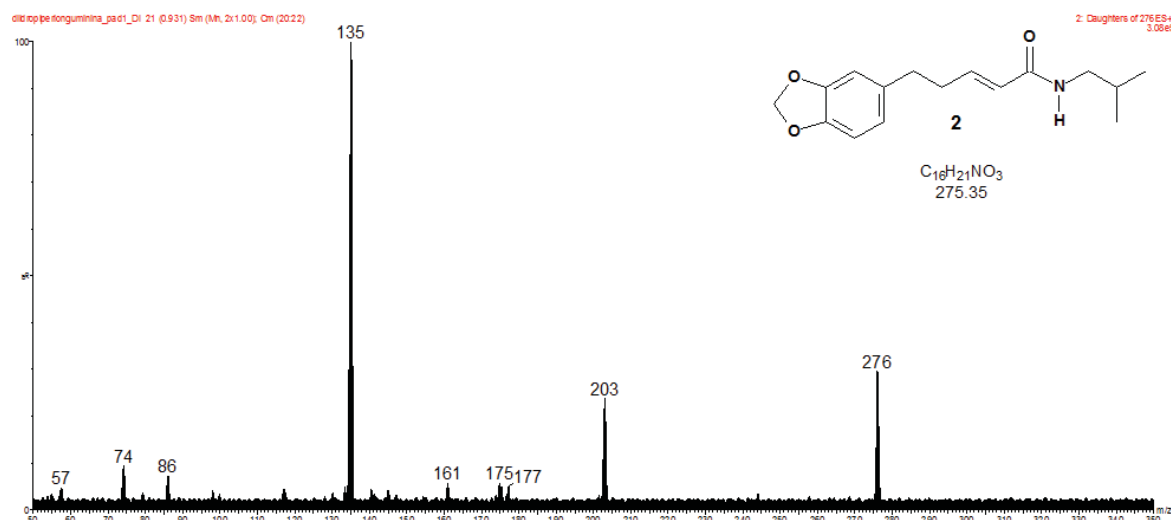
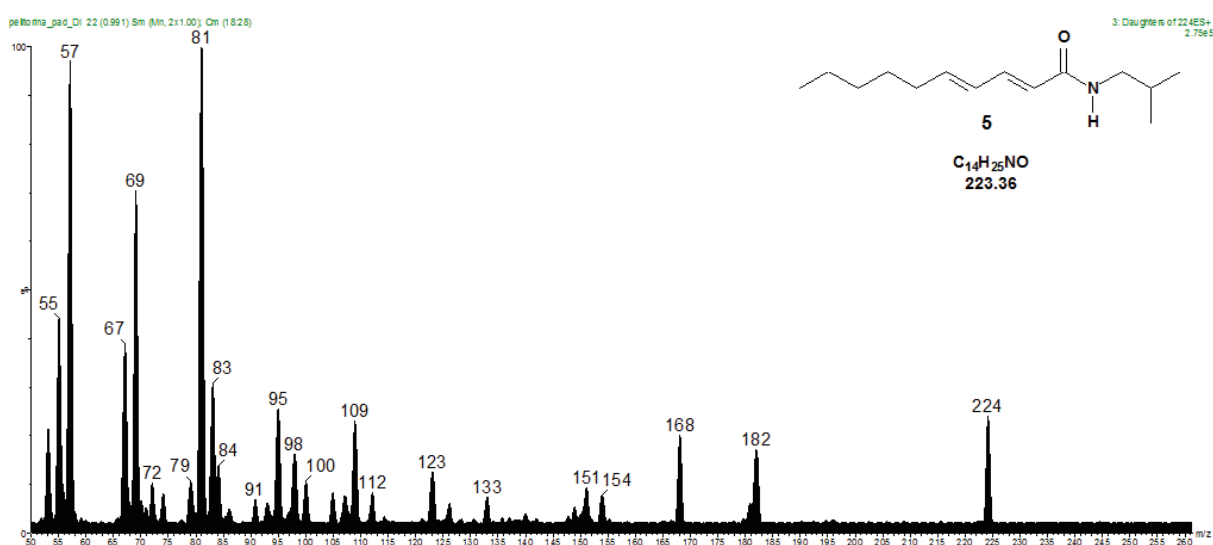
Figura 1.50: Espectro de massas da amida diidropiperina (**1**) (ionização química, energia de colisão 20eV)**Figura 1.51:** Espectro de massas da amida diidropiperlunguminina (**2**) (ionização química, 15eV)**Figura 1.52:** Espectro de massas da amida pelitorina (**5**) (ionização química, 20eV)

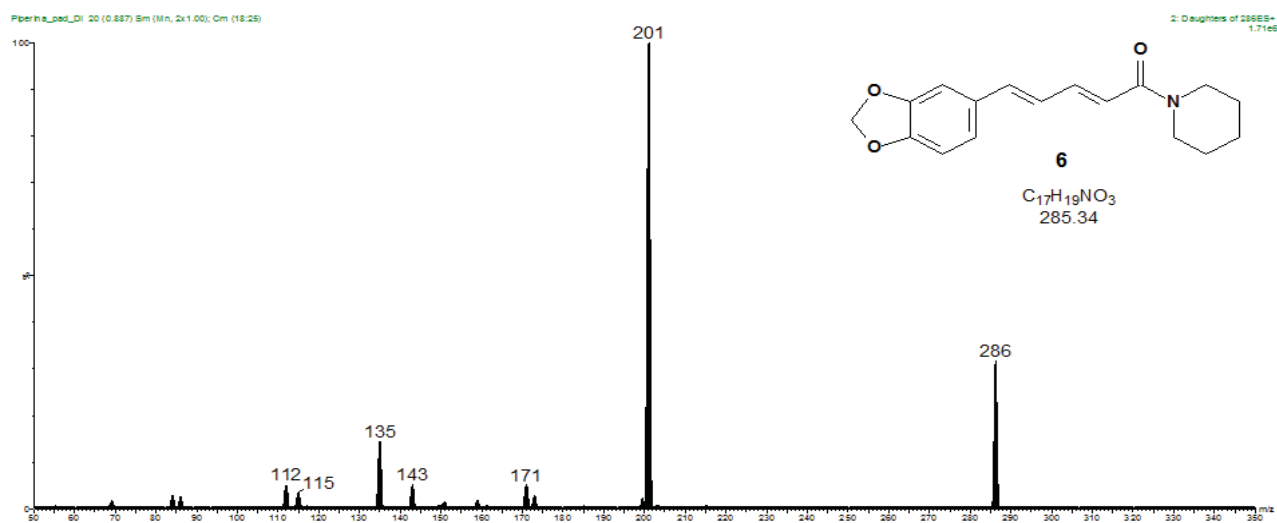
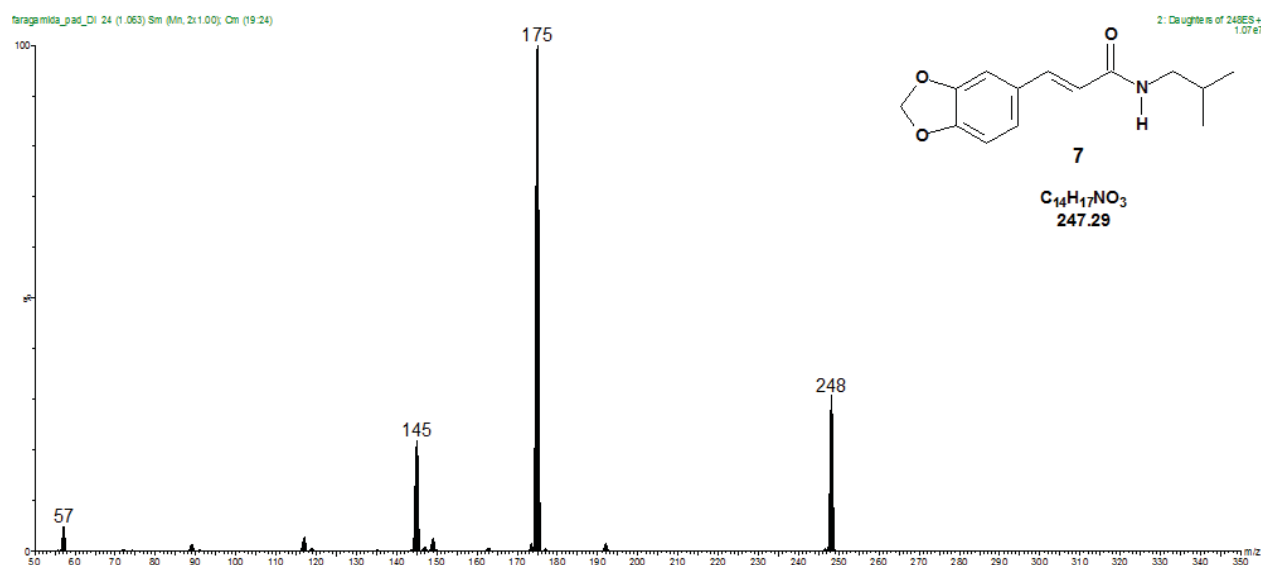
Figura 1.53: Espectro de massas da amida piperina (**6**) (ionização química, energia de colisão 15eV)**Figura 1.54:** Espectro de massas da amida faragamida (**7**) (ionização química, 15eV)

Figura 1.54: Cromatograma do extrato marcado com U-²H-malônico. UV-ViS (superior) e TIC (inferior).

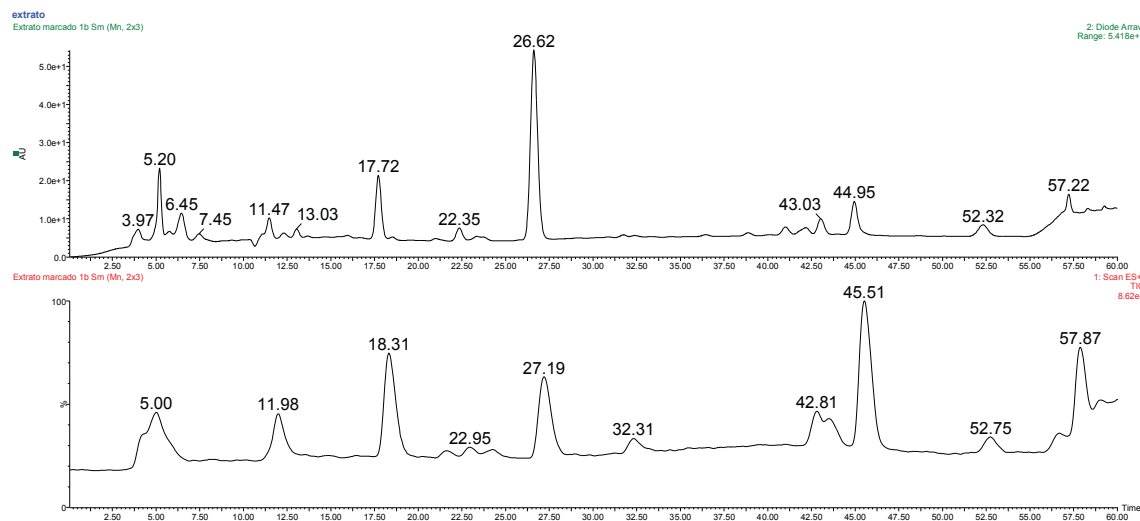
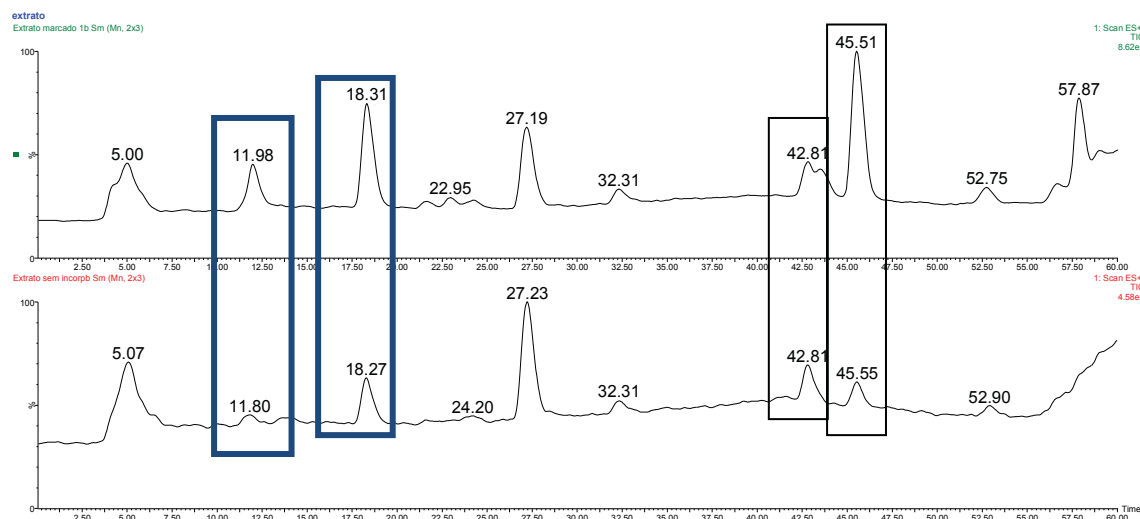


Figura 1.55: Comparação dos TICs do extrato de *P. tuberculatum* sem incorporação (inferior) e marcado com U-²H-malônico (superior).

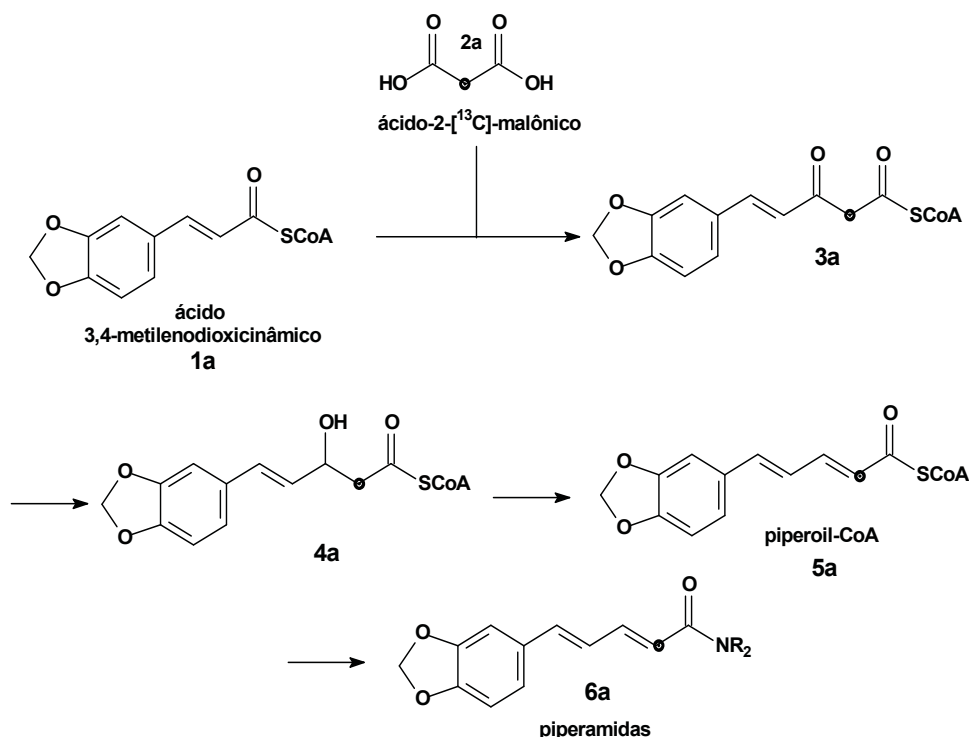


O mesmo perfil foi observado quando comparado o cromatograma do extrato de *P. tuberculatum* sem incorporação com o obtido depois da incorporação de ácido 2-[¹³C]-malônico.

3.5.1. Incorporação de ácido malônico marcado com ¹³C e ²H (deutério)

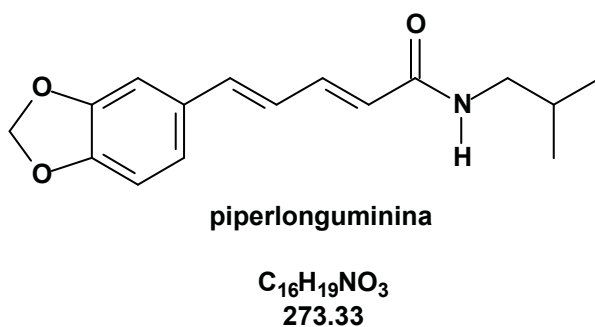
A proposta biossintética para extensão da cadeia alifática insaturada na rota biossintética para a formação da amida piperina é descrita por Dewick (2009) através do acoplamento entre o éster CoA do ácido 3,4-metilenodioxicinâmico (**1a**) e ácido malônico (**2a**). O intermediário **3a** sofre redução da carbonila cetônica à um álcool secundário (**4a**), seguido de uma desidratação, formando assim o intermediário ácido pipérico (**5a**), um derivado C₆-C₅ (Figura 1.56), dando sequencia a formação de piperamidas (**6a**).

Figura 1.56: Proposta biogenética do piperoil-CoA (derivado C6-C5) a partir de um intermediário C6-C3 (ácido 3,4-metilenodioxicinâmico) e ácido malônico.



Após experimento com o ácido malônico marcado e análise do extrato de folhas por CLAE-EM, detectou-se incorporação na substância piperlonguminina (Figura 1.57).

Figura 1.57: Estrutura, fórmula molecular e massa molecular da amida piperlonguminina



O íon m/z 274 foi observado após inspeção dos dados obtidos da análise do extrato de folhas onde foi incorporado ácido malônico, tanto marcado com carbono-13, quando com deutério. Visualiza-se a intensificação do íon m/z 275 no fragmentograma mostrado na figura 1.58, o que é coerente com a incorporação esperada.

Os espectro de massas (MS/MS) do íon m/z 275 (Figuras 1.60 e 1.61) foram obtidos e comparados com o espectro do íon m/z 274 (padrão, sem marcação) (Figura 1.59). Os espectros são semelhantes e diferem por uma unidade de massa, de acordo com o esperado pela incorporação.

Figura 1.58: Fragmentograma mostrando enriquecimento isotópico da substância piperlonguminina

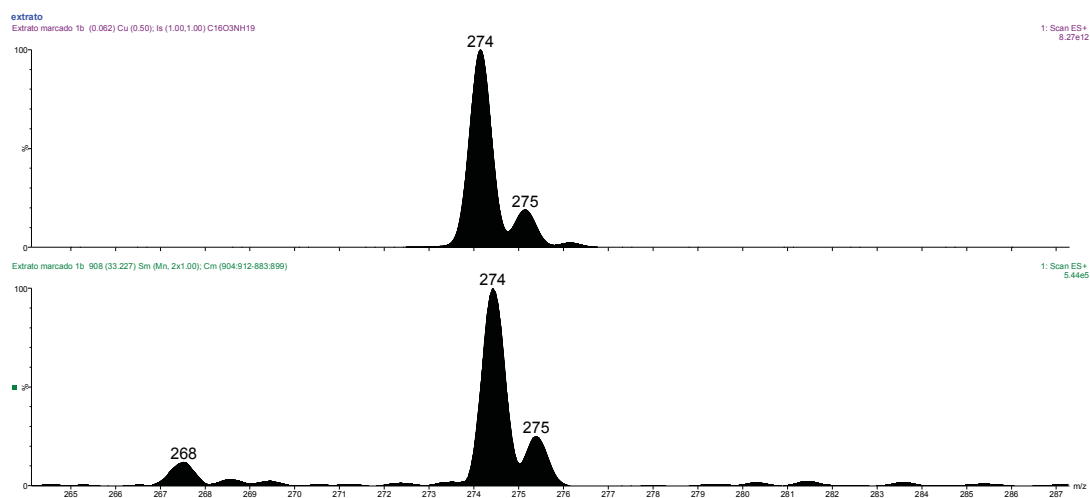


Figura 1.59: Espectro de massas da substância piperlonguminina

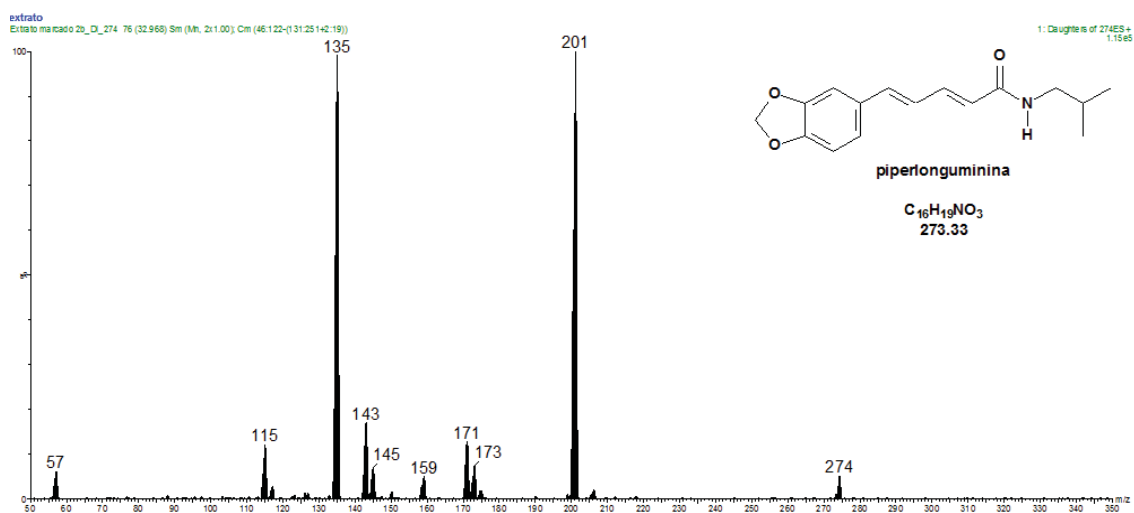
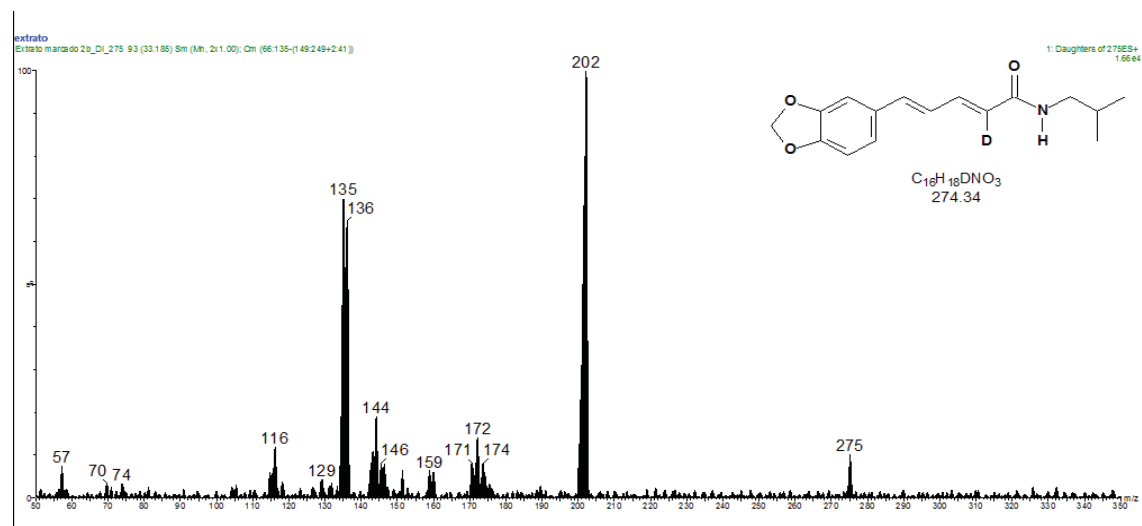
Figura 1.60: Espectro de massas da substância piperlonguminina enriquecida com deutério (proveniente do ácido malônico- $U-^2H$) na posição α -carbonila

Figura 1.61: Espectro de massas da substância piperlongumina enriquecida com carbono-13 (proveniente do 2- ^{13}C -ácido malônico) na posição α -carbonila

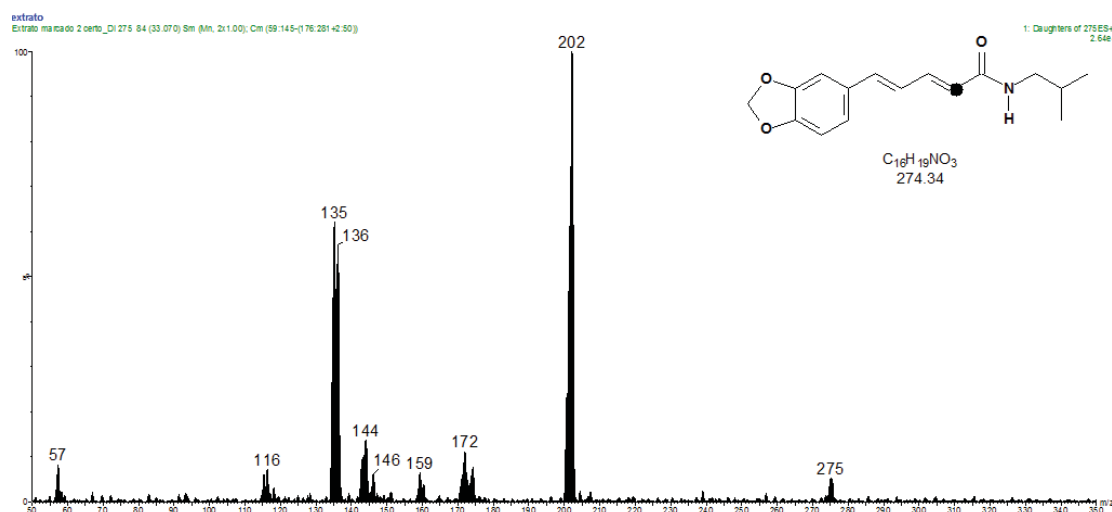
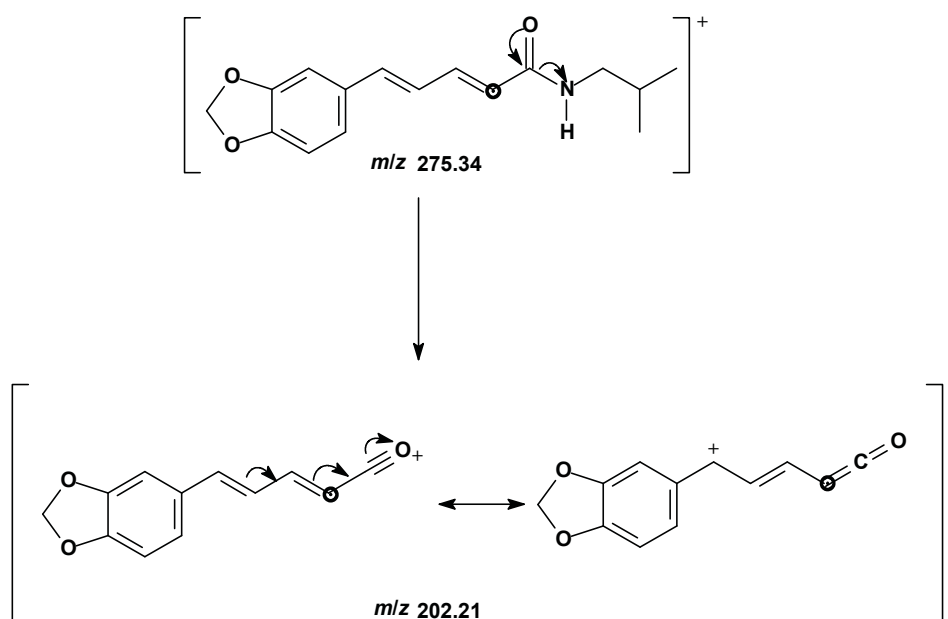
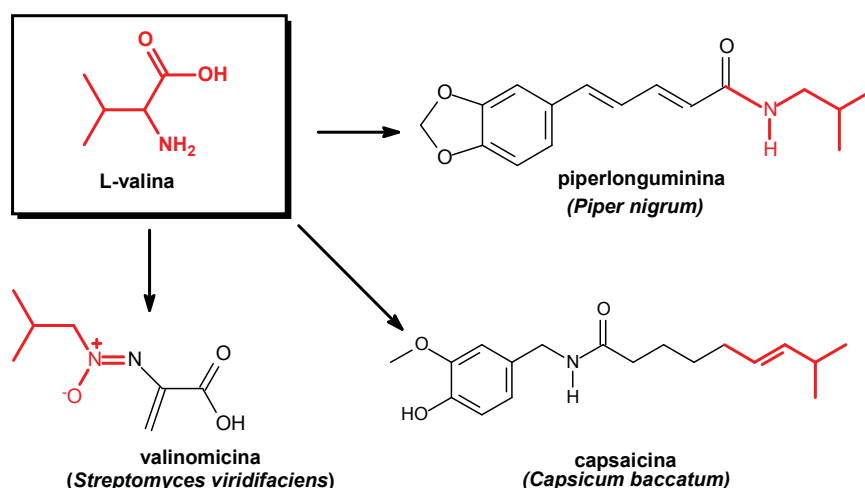
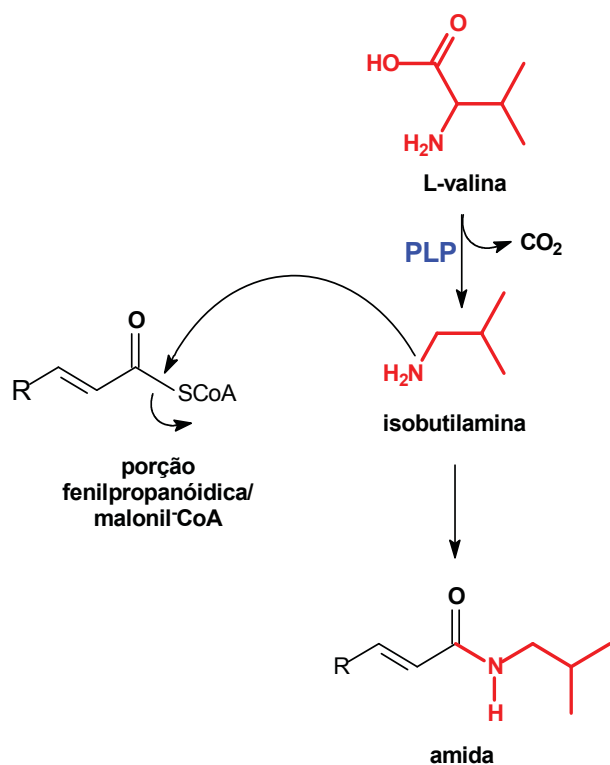


Figura 1.62: Proposta para fragmentação da amida piperlonguminina

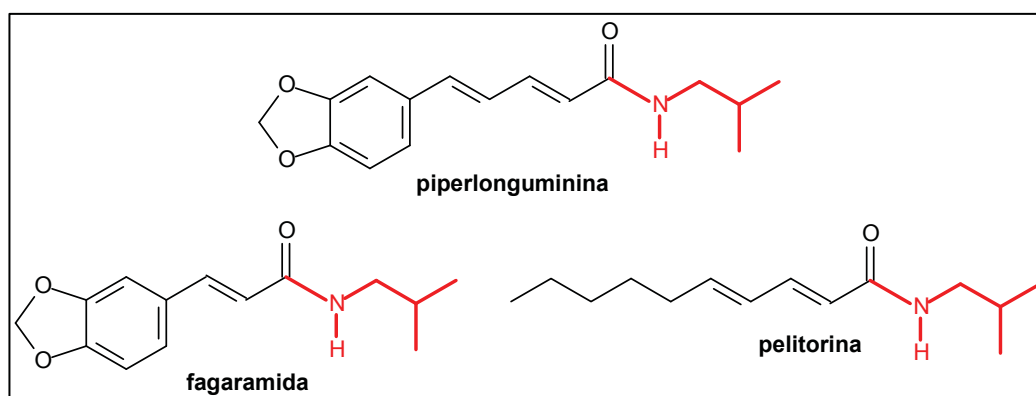


3.5.2. Incorporação de L-valina marcada com ^{15}N

Existem poucos estudos divulgados que mostram a participação do aminoácido L-valina na biossíntese de produtos naturais. Dentre estes foi comprovada a participação na biossíntese da porção isobutílica da capsaicina (MARKAI et al., 2002) e do antibiótico valinomicina (Figura 1.63). Sobre a origem da porção isobutílica comumente presente em piperamidas ainda não existem estudos que comprovem a participação deste aminoácido na formação do grupo. A proposta biogenética é descrita na figura 1.64.

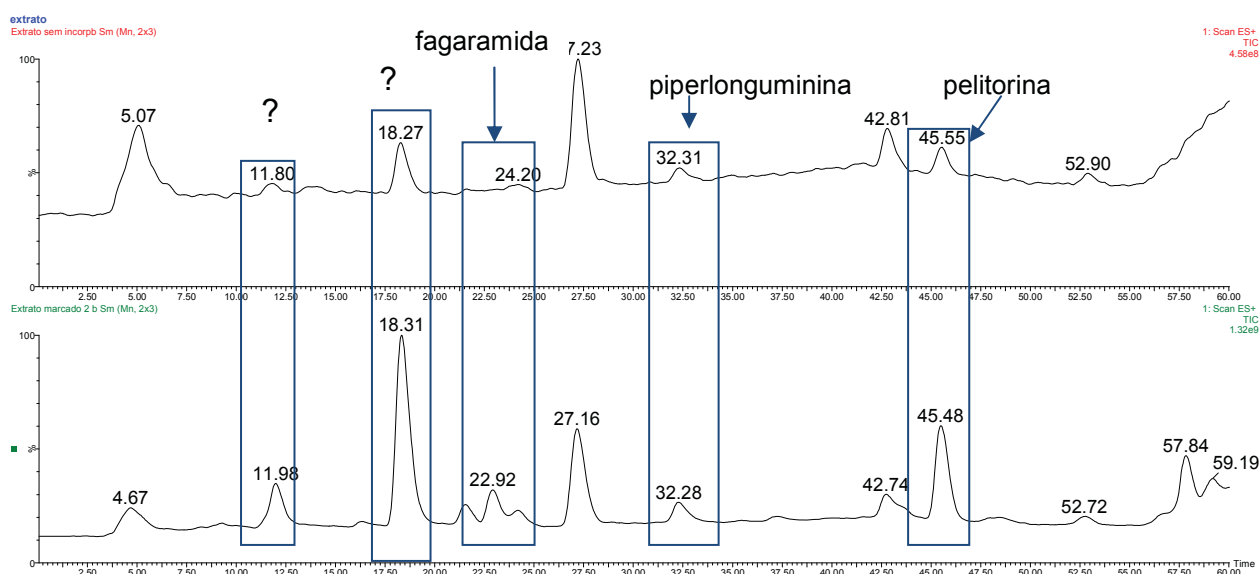
Figura 1.63: Participação da L-valina na biossíntese de alguns produtos naturais**Figura 1.64:** Proposta biogenética de formação de amidas isobutílicas em *P. tuberculatum*

O aminoácido L-valina sofre descarboxilação catalisada pela enzima valina descarboxilase (VmlD/ EC 4.1.1.14), gerando a isobutilamina. A condensação de uma unidade fenilpropanoídica e uma molécula de isobutilamina geram a amida isobutílica. Em *P. tuberculatum* já foram isoladas 3 amidas isobutílicas: diidropiperlonguminina, pelitorina e fagaramida (Figura 1.65) e essas substâncias se configuram em excelentes matrizes para monitorar a possível incorporação da L-valina. Amidas isobutílicas já foram isoladas de outras espécies de Piperaceae, bem como de espécies de *Zanthoxylum* (Rutaceae) e *Aristolochia* (Aristolochiaceae) (GAMBOA-LEON et al., 2000; CHEN et al.1999).

Figura 1.65: Amidas de *P. tuberculatum* que possuem o grupo N-isobutílico.

A incorporação de L-valina em plântulas de *P. tuberculatum* foi realizada conforme descrito por Yamaushi e colaboradores (2003) (protocolo modificado). Foram obtidos os cromatogramas (CLAE) referente às substâncias isoladas (padrões) de *P. tuberculatum* e dos extratos das plântulas após a incorporação. Foram incorporados ácido 3,4-metilenodioxicinâmico e ácido pipérico (ambos sem marcação), para indução da biossíntese das substâncias fagaramida e piperlonguminina, respectivamente, como um modelo de biossíntese *de novo*.

A partir da comparação dos cromatogramas dos extratos de *P. tuberculatum* com e sem incorporação (Figura 1.66), pode-se observar aumento qualitativo na produção das substâncias pelitorina ($t_R = 45,48$ minutos), piperlonguminina ($t_R = 32,28$ minutos), fagaramida ($t_R = 22,92$ minutos), além de outras substâncias não identificadas com $t_R = 18,27$ e $11,98$ minutos respectivamente.

Figura 1.66: Comparação do TIC dos cromatogramas do extrato de *P. tuberculatum* incorporado com L-¹⁵N-valina (inferior) e sem incorporar (superior).

No presente momento, os extratos estão sendo estudados para comparação dos padrões de fragmentação das substâncias cuja abundância foi modificada como consequência dos experimentos de incorporação com L-¹⁵N-valina.

PARTE II

ESTUDO DO TRANSCRIPTOMA DE FRUTOS DE *Piper nigrum* L.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Da genética a biologia molecular: evolução científica

Desde 1865, com a apresentação de estudos de hereditariedade por Gregor Mendel, até 2000, quando foi anunciado o sequenciamento do genoma haplóide humano, a genética teve seu marco como ciência e experimentou um incrível desenvolvimento em um curto espaço de tempo, 150 anos. Diversos eventos marcaram o desenvolvimento dessa ciência (Tabela 2.1):

Tabela 2.1: Eventos que marcaram a evolução da genética e da biologia molecular (MAIA et al., 2010):

Ano	Evento
1869	isolamento do DNA por Johann Friedrich Miescher
1882	constatação da existência de bases nitrogenadas e de função ácida por Albrecht Kossel e Richard Altmann
1909	descoberta dos cromossomos (Walter Flemming) e a introdução dos termos “gene” (para descrever a unidade mendeliana da hereditariedade), “genótipo” e “fenótipo” (Wilhelm Johannsen)
1912	organização dos nucleotídeos em base nitrogenada, pentose e um grupo fosfato por Phoebus Levine e Walter Jacobs
1915	genes estão dispostos em cromossomos (Thomas Hunt Morgan e seus alunos Alfred Sturtevant, Hermann Joseph Muller e Calvin Bridges)
1927	DNA pode sofrer mutações quando exposto ao raio-X por Hermann J. Muller
1927	informação genética está contida em uma molécula específica e não nas proteínas (Griffith)
1941	a teoria "um gene – uma enzima" (Beadle e Tatum)
1943	demonstração de que a resistência de uma bactéria a um vírus específico é uma propriedade adquirida pela bactéria antes de entrar em contato com o vírus (Salvadore Luria e Max Delbrück)
1943	descoberta que o DNA é a molécula responsável pela hereditariedade (Avery, Colin M. MacLeod e Maclyn McCarty)
1953	modelo da dupla hélice do DNA (Crick e Wilkins, junto com Watson)
1961	descoberta de que o RNA mensageiro (ou mRNA) transporta a informação genética "inscrita" na dupla hélice para a maquinaria celular que produz proteínas (Sydney Brenner, François Jacob e Matthew Meselson)
1963	descrição da atuação das enzimas de restrição (Daniel Nathans e Hamilton Smith)
1970	identificação da transcriptase reversa em RNA de vírus (Temin e Baltimore)
1972	descrição do processo de <i>splicing</i> (Mertz e Davis)

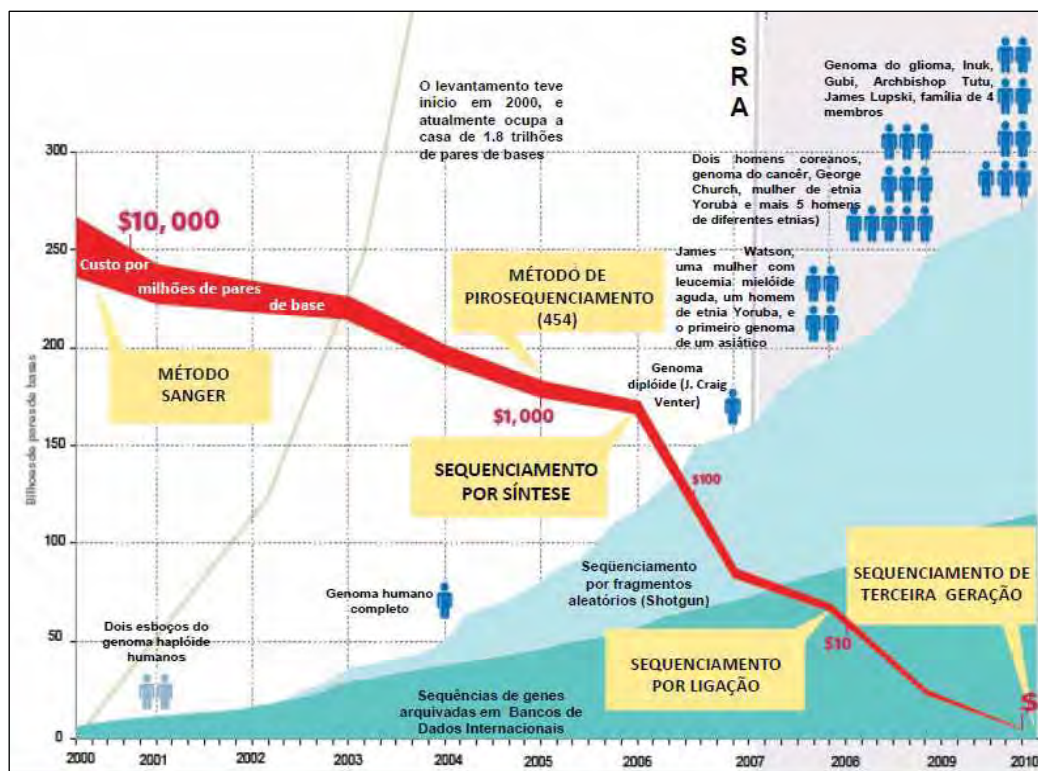
1972	obtenção das primeiras moléculas de DNA recombinante (Paul Berg)
1977	desenvolvimentos de métodos para determinar sequência de nucleotídeos no DNA (Gilbert e Sanger) (SANGER et al., 1977)
1978	produção da primeira proteína humana (insulina) em uma bactéria geneticamente modificada (Genetech)
1983	descrição do método de PCR (reação em cadeia da polimerase), que possibilita a obtenção rápida de bilhões de cópias de um segmento específico de DNA (Kary Mullis)
1985	publicação de um artigo que descreve uma técnica de identificação conhecida como "impressão digital" por DNA ("DNA fingerprint"), que permitiu a elucidação mais precisa de vários crimes (Alec Jeffreys)
1982	NIH (National Institute for Health, USA) aprova diretrizes gerais para a realização de experimentos com terapia gênica em seres humanos
1990	início formal do Projeto do Genoma Humano
1990	utilização, com sucesso, da terapia gênica, em uma menina de quatro anos com um tipo de deficiência no sistema imunológico.
1995	publicação do genoma completo de um organismo não viral, a bactéria <i>Haemophilus influenza</i> (Craig Venter, Smith, Fraser e colaboradores)
1996	nascimento da ovelha Dolly, primeiro mamífero clonado a partir de uma célula de um animal adulto
1998	sequenciamento do genoma do verme <i>C. elegans</i> , primeiro organismo multicelular a ter o seu DNA transcrito (John Sulston e Robert Waterstone)
1999	pesquisadores do Projeto Genoma Humano publicam o sequenciamento completo do DNA encontrado no cromossomo 22
2000	pesquisadores do consórcio público Projeto Genoma Humano e da empresa privada norte-americana Celera anunciam o sequenciamento do genoma haplóide humano
2000	pesquisadores brasileiros anunciam o sequenciamento do genoma da bactéria <i>Xylella fastidiosa</i> , a causadora da doença do amarelinho em cítricos

Para o sequenciamento do genoma humano foi utilizado o método Sanger, que permaneceu usual até meados de 2004, quando houve o surgimento das Plataformas de NGS (Next Generation Sequencing). O Projeto Genoma Humano foi controverso desde o início por diversos motivos, em particular por desviar fundos de outros projetos de pesquisa biológica. Em 1989, o custo de sequenciamento caiu para 1 dólar por par de bases e um dos grupos envolvidos no projeto solicitou ao Congresso dos EUA \$ 3 bilhões de dólares para cobrir os custos de sequenciamento do genoma haplóide (3 bilhões de pares de base), ao invés de \$ 6 bilhões de dólares para cobrir o genoma diplóide de 6 bilhões de pares de bases, que representam todo o conjunto de cromossomos, que foi considerado muito caro. Foi também resolvido que, devido à

natureza altamente ambiciosa do projeto, seria necessário um exército de cientistas para reunir os fragmentos da sequência do genoma. Com a publicação do esboço do genoma haplóide humano em 2001, muitos analistas previram o fim do mercado de tecnologia de sequenciamento de DNA. No entanto, dados de laboratórios de todo o mundo continuaram a adicionar informações ao projeto, resultando na publicação do primeiro genoma diplóide humano de um indivíduo em 2007 (THE HUMAN, 2010).

A corrida pelo sequenciamento do genoma humano inspirou muitos laboratórios de pesquisa básica e empresas a desenvolverem tecnologias de sequenciamento ao longo dos últimos anos. No início de 2010 duas empresas [a Illumina de San Diego (Califórnia) e a Life Technologies de Carlsbad (Califórnia)] anunciaram novos instrumentos que são capazes de sequenciar 25 bilhões/100 bilhões de pares de bases por dia, respectivamente. A empresa Life Technologies também anunciou uma versão futura que pode sequenciar até 300 bilhões de pares de base por dia. Representantes de ambas as empresas afirmaram que estes instrumentos podem sequenciar o genoma humano em um dia e a um custo de \$ 6.000 dólares. Atualmente o genoma pode ser sequenciado 50000 vezes mais rápido do que em 2000 (Figura 2.1) (THE HUMAN, 2010).

Figura 2.1: Evolução dos custos X capacidade dos métodos de sequenciamento

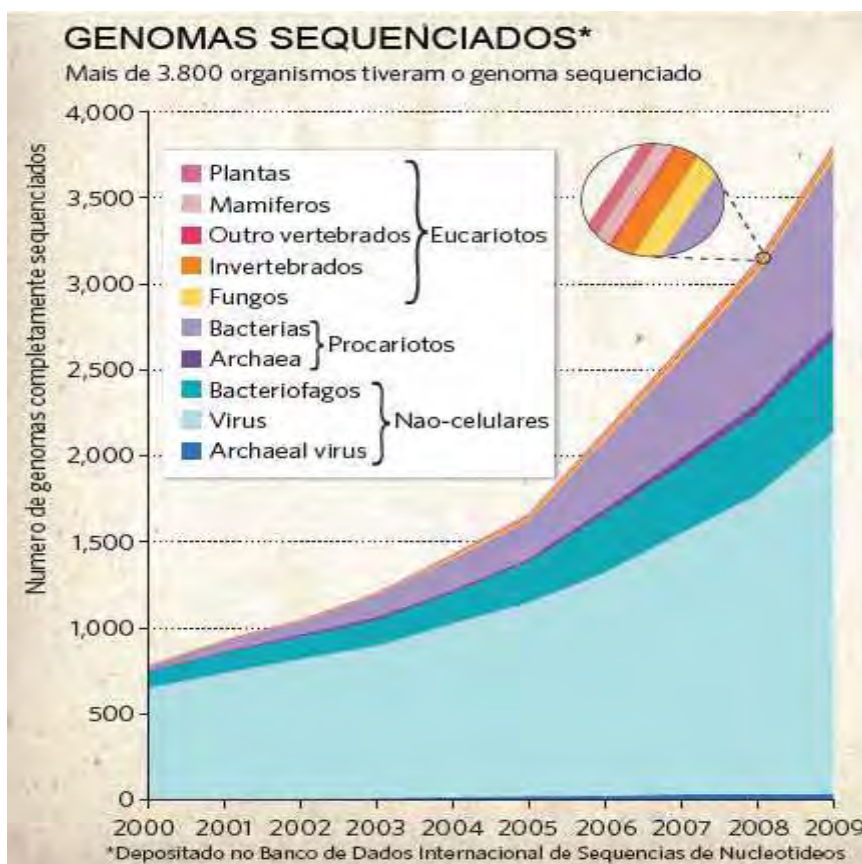


Fonte: THE HUMAN, 2010

O número de genomas sequenciados saltou de pouco mais de 500 em 2000 para aproximadamente 3.800 em 2010 (Figura 2.2), beneficiado diretamente pelo avanço tecnológico e

pela diminuição dos custos dos experimentos. No ritmo atual de progresso tecnológico, o seqüenciamento de DNA logo se tornará uma comodidade, gerando dados de alta qualidade e baratos (VENTER, 2010). Atualmente, poucos genomas de plantas foram totalmente sequenciados. Sob este ponto de vista, foram sequenciadas as espécies *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa*, *Sorghum bicolor*, *Vitis vinifera*, *Zea mays* e mais recentemente *Brachypodium distachyon* (REMMERIE et al., 2011).

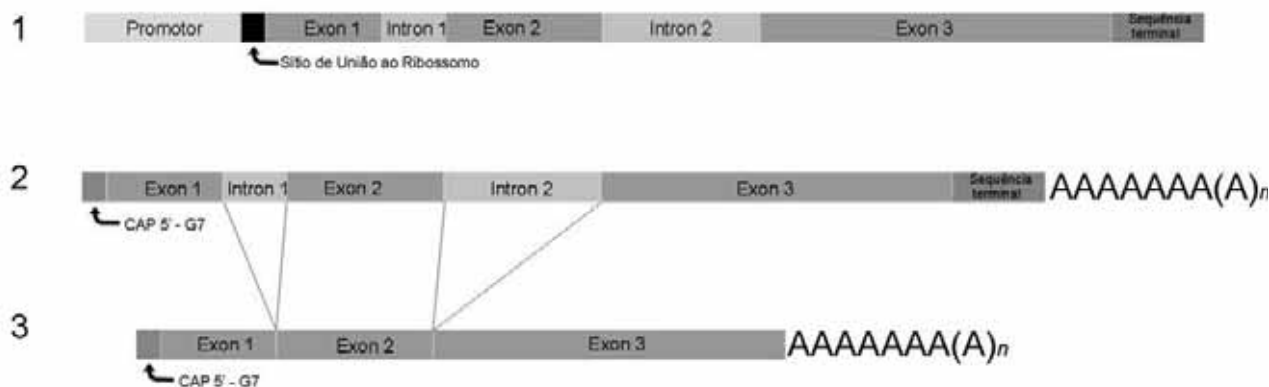
Figura 2.2: Genomas sequenciados



Fonte: (VENTER, 2010)

Estudos funcionais dispensam informações completas do genoma de um organismo, e neste sentido, abordagens envolvendo a análise do transcriptoma deste indivíduo podem ser suficientes. O transcriptoma é o conjunto de todas as moléculas de RNA, incluindo mRNA, rRNA, tRNA e outros RNAs produzidos em uma célula ou uma população de células. Ao contrário do genoma, que é aproximadamente fixo (excluindo mutações), o transcriptoma pode variar com as condições ambientais. Pelo fato de incluir todas as transcrições de mRNA na célula (Figura 2.3), o transcriptoma reflete os genes que estão sendo expressos ativamente em um determinado momento.

Figura 2.3: Esquema geral do processamento de um gene eucarioto. Após a transcrição pela RNA polimerase (1) o RNA heterogêneo nuclear deve ser processado (2 e 3) e isso consiste na retirada dos introns (*splicing*), na adição da cauda Poli-A e do CAP5'. O RNAm é então transferido para fora do núcleo da célula onde será traduzido a proteína.

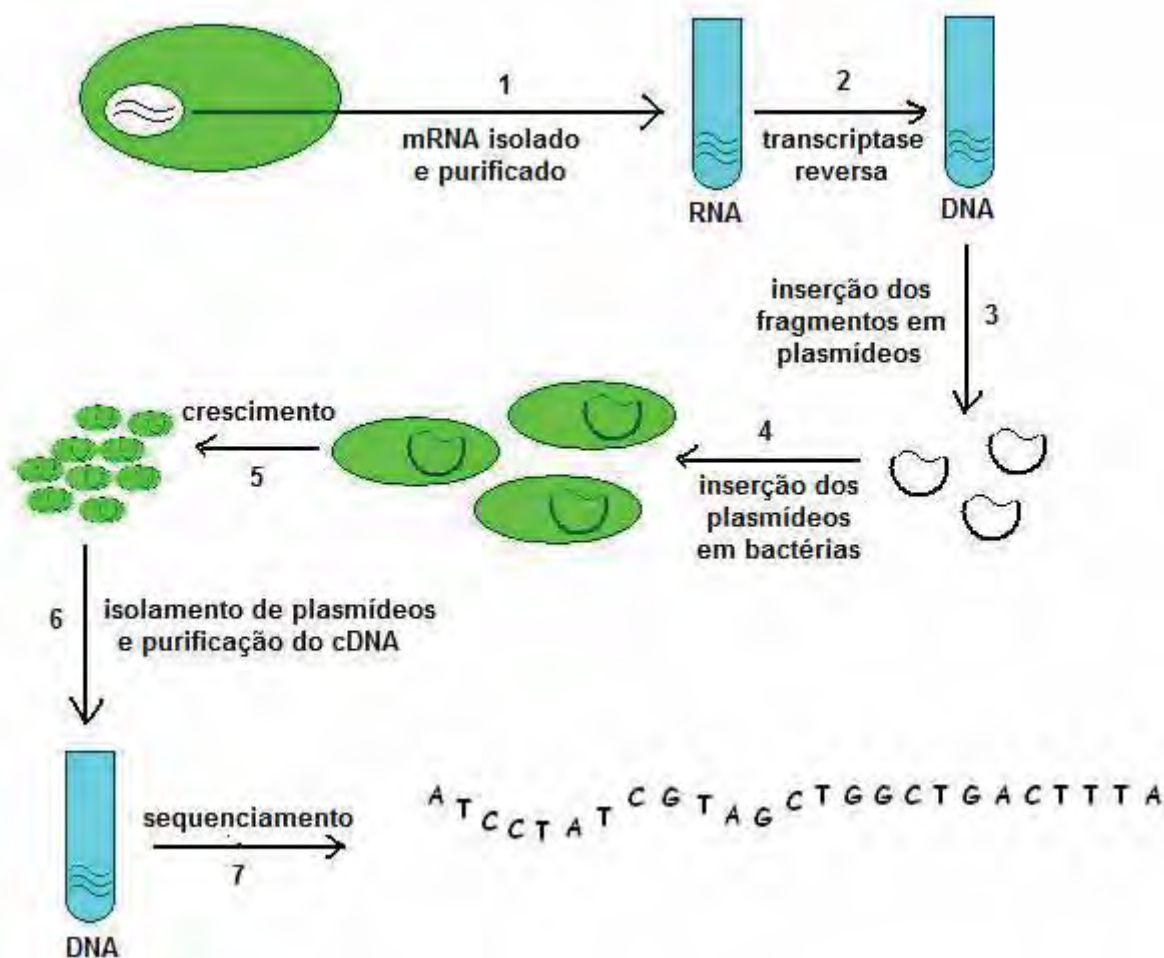


Fonte: (MALONE et al., 2006)

O transcriptoma pode ser visto como precursor direto do proteoma, ou seja, todo o conjunto de proteínas expressas por um genoma. No entanto, a análise dos níveis de expressão relativa de mRNA pode ser complicada pelo fato de que mudanças relativamente pequenas na expressão de mRNA podem produzir grandes mudanças na quantidade total da proteína presente na célula correspondente (VELCULESCU et al., 1997).

Enquanto é esperado que a biblioteca genômica contenha todos os fragmentos de DNA de um organismo, a biblioteca de cDNA contém os genes expressos no tempo e local específicos, o que é adequado para o estudo do transcriptoma (MALONE et al., 2006). Grosseiramente, pode-se afirmar que uma biblioteca de cDNA é um conjunto de colônias de bactérias contendo plasmídeos com os fragmentos de DNA do indivíduo em estudo. A figura 2.4 mostra as etapas para a construção de uma biblioteca de cDNA:

Figura 2.4: Etapas para a construção de uma biblioteca de cDNA: 1. mRNA é extraído do tecido selecionado e purificado; 2. Aplicando a técnica de RT-PCR, cDNA é sintetizado a partir de mRNA; 3. Os fragmentos de cDNA obtidos são então introduzidos em moléculas de DNA plasmidial (ligação); 4. Os plasmídeos contendo os fragmentos de cDNA são introduzidos em células bacterianas (transformação); 5. As bactérias transformadas são cultivadas em meio LB a temperatura controlada; 6. Os plasmídeos são extraídos das colônias bacterianas, digeridos com enzimas de restrição e purificados; 7. O cDNA é submetido a sequenciamento e informações sobre a identidade dos genes podem ser conhecida através de consulta à uma base de dados.



Fonte: (http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e6/Formation_of_a_cDNA_Library.jpg, acessado em 01.11.11)

1.2. Produtos naturais e a biologia molecular

A diversidade de produtos naturais produzidos pelas plantas pode ser vista como uma das mais complexas atividades da natureza em termos de bioquímica combinatória. A compreensão destas vias metabólicas pode conduzir a novas oportunidades para melhorar a resistência das plantas às doenças e a saúde humana pelo incremento de nutracêuticos em culturas alimentares e utilização de plantas transgênicas para a produção de produtos farmacêuticos. Estima-se que um organismo contenha aproximadamente o mesmo número de compostos e genes. Assim, por exemplo, plantas poderiam biossintetizar cerca de 30.000 substâncias (VERPOORTE et al., 2008).

Em meados de 1980, os primeiros genes que codificam enzimas do metabolismo secundário de plantas foram clonados e funcionalmente expressos: 4-cumarato CoA ligase, fenilalanina amônia liase e chalcona sintase. O primeiro cDNA de uma enzima envolvida na biossíntese de alcalóide heterologamente expressa foi a strictosidina sintase (KUTCHAN et al.,

1988) e a primeira enzima da via dos terpenos a ser clonada e funcionalmente caracterizada, a terpeno sintase, aconteceu cinco anos mais tarde por Colby e colaboradores (1993) (HARTMANN, 2007).

Como mais e mais enzimas envolvidas em biossíntese de produtos naturais foram identificadas ao longo dos últimos anos, a organização espacial dessas vias biossintéticas tornou-se mais complexa. Algumas enzimas de uma via podem ser identificadas em culturas *in vitro*, enquanto outras são aparentemente ausentes. Isso levou à idéia de que vários graus de diferenciação celular são necessários para a biossíntese e acúmulo de alguns produtos naturais, tais como terpenos e alcalóides, o que implica que mais de um tipo celular pode estar envolvido nas transformações metabólicas (KUTCHAN, 2005).

O progresso na caracterização molecular de vias do metabolismo secundário no nível genético contribuiu para novas perspectivas. A transferência de genes ou de vias completas entre organismos pode gerar melhorias na produtividade de plantas medicinais ou mesmo criar plantas com novas características. Um exemplo clássico de engenharia metabólica em plantas é a transferência da via biossintética completa de glicosídeos cianogênicos de *Sorghum bicolor* para *Arabidopsis thaliana* (TATTERSALL et al., 2001). Este avanço permitiu o desenvolvimento de novos campos como a Biossíntese Combinatória, biologia de sistemas e até a biologia sintética.

Outra vantagem proporcionada pelas ferramentas moleculares é a localização das vias secundárias em células específicas utilizando a técnica de imunolocalização. Estudos mostram que as vias biossintéticas não são apenas bioquimicamente bem organizadas, mas que também são expressas especificamente em determinados compartimentos celulares. Um dos estudos pioneiros nesta área foi a localização da hiosciamina 6- β -hidroxilase, uma enzima específica da biossíntese de alcalóides tropânicos, no periciclo das raízes de *Hyoscyamus niger* (HARTMANN et al., 2007; HASHIMOTO et al., 1991).

A **Biologia Sintética**, uma das novas possibilidades da Biologia Molecular, promete fazer pela engenharia metabólica de produtos naturais o que o sequenciamento automatizado e sistemas de clonagem padronizados fizeram para a biologia molecular, provocando uma revolução na escala, velocidade e conveniência que irão contribuir para o conhecimento acumulado no âmbito de uma biologia de PN ressurgente (MITCHELL, 2011). O Projeto Artemisinina fornece um exemplo convincente do potencial da Biologia Sintética para revigorar a terapêutica dos produtos naturais. Artemisinina é um antimalárico isolado de *Artemisia annua* que é biossintetizada em múltiplas etapas sequenciais por um conjunto de enzimas funcionalmente relacionadas. Através da transferência de genes biossintéticos para o DNA de um organismo fermentante, a produção dos precursores da artemisinina foi induzida, incluindo o amorfa-4,11-dieno e o ácido artimisinico neste organismo, diminuindo pela metade o custo da produção de artemisinina.

A partir de experimentos realizados na década de 80, um grande número de exemplos utilizando a técnica de **Biossíntese Combinatória** tem surgido na literatura. Este procedimento, o qual é bem aceito como estratégia para aumentar a diversidade de PNs, aplica métodos de engenharia genética para modificar os processos biossintéticos de produtos naturais e produzir novas estruturas usando a maquinaria biossintética existente em cada organismo. Esta possibilidade foi primeiramente demonstrada por Hopwood (1985), que fez a clonagem de genes biossintéticos do antibiótico actinorodina de *Streptomyces coelicolor*. Hopwood e colaboradores (1985) modificaram geneticamente os produtores de medermicina e diidrogranaticina, respectivamente. O actinomiceto *Streptomyces* sp. AM-7161 modificado geneticamente produziu, além de medermicina, grandes quantidades de uma nova substância mederorrodina, a qual contém um grupo hidroxila adicional característico da actinorodina. *Streptomyces violaceoruber* Tü 22, modificado para produzir diidrogranaticina, produziu uma nova substância, diidrogranatirrodina, preservando as configurações dos precursores nos estereocentros da nova molécula. Esse trabalho representa a primeira utilização do conceito de biossíntese combinatorial de produtos naturais e abriu uma nova perspectiva para a diversificação estrutural de produtos naturais de interesse (HOPWOOD et al., 1985; PUPO et al., 2007).

Tendo em vista o veloz desenvolvimento da biologia molecular e área afins, as plantas são admiradas por sua beleza, acúmulo de moléculas bioativas e propriedades curativas, mas também como detentoras de exímia maquinaria química, que pode ser transplantada para outros organismos; fornecendo biocatalisadores de forma a contribuir para a consolidação da Química Verde e produzir compostos de interesse pela manipulação de seus genes.

1.3. *Piper nigrum* e aspectos genéticos

A pimenta-do-reino (*P. nigrum*, Piperaceae) é talvez a mais velha pimenta conhecida no mundo. É uma planta originária das florestas úmidas do sul da Índia, foi domesticada por centenas de anos e agora está dispersa em diversos países como a Indonésia, Malásia, Sri Lanka, Vietnam e China. Essa espécie foi introduzida no Brasil por imigrantes portugueses no século XVII e sob o ponto de vista econômico, seu cultivo se desenvolveu a partir de 1933 pelos imigrantes japoneses, que trouxeram 20 mudas da cultivar Kucing, conhecida como Cingapura, em referência ao porto de embarque desses imigrantes. Essas mudas foram cultivadas na fazenda Açaizal, propriedade do colono Koso Yoshida, no município paraense de Tomé-Açu, sendo que apenas três delas lograram sobreviver. Dessa base genética comum ocorreu a expansão comercial do cultivo da pimenta-do-reino, no Pará, através da propagação vegetativa desse material botânico. O germoplasma da pimenta-do-reino responsável pela ampliação dos cultivos, caracteriza-se por estreita variabilidade genética (devido ao reduzido material botânico originário e a ampla reprodução assexuada do mesmo), tem baixa resistência à principal enfermidade, a fusariose. Tal

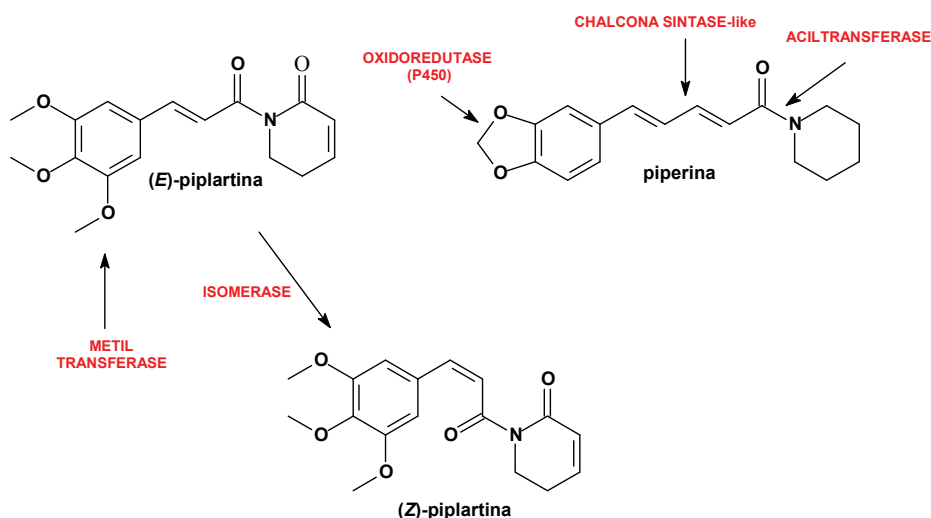
doença se caracteriza como fator importante na redução da produção brasileira de pimentado-reino, pois influencia de forma significativa a longevidade das plantas, reduzindo o ciclo produtivo e ocasionando a redução da área cultivada e da produtividade. Estudos são realizados no intuito de aumentar a variabilidade genética desta espécie, e assim possibilitar o desenvolvimento de novos sistemas de produção (BARBOSA, 2002; LEMOS, 2003).

Estudos morfométricos revelaram a existência de uma extensa variabilidade fenotípica em cultivares de *P. nigrum*. Diferenças proeminentes nas folhas e frutos são observadas dentro e fora de variedades locais. Sete cromossomos são reportados para esta espécie, $2n = 36, 48, 52, 60, 65, 78$ e 128 , indicando a contribuição da variação citológica na diversidade genética (PRADEEPKUMAR et al., 2003). Estudos citológicos sugerem que o número de cromossomos básico de *Piper* é $x=13$, enquanto que *Piper nigrum* é tetraplóide ($2n = 52$) (JOY et al., 2007).

Diversos estudos sobre filogenia de *Piper* foram publicados nos últimos 10 anos. Em 2006 foi publicado o sequenciamento do genoma do plastídeo de *Piper nigrum* em comparação com *Drimys* e *Liriodendron*. As magnoliídas com 4 ordens, 19 famílias e 8.500 espécies representam um dos maiores clados das angiospermas. Embora várias análises filogenéticas das relações sugeridas entre as ordens, o número limitado de genes analisados resultou em apenas um fraco suporte, e questões de classificação filogenética permanecem controversos (CAI et al., 2006).

Em termos de estudos genéticos, praticamente todos os trabalhos que constam na literatura sobre Piperaceae estão circunscritos à filogenia e nenhum está focado em metabolismo secundário. Este projeto então é uma possibilidade para a compreensão, sob o aspecto molecular, de uma diversidade de enzimas, incluindo as oxidorreduções, isomerases, aciltransferases (Figura 2.5), envolvidas na biossíntese de substâncias que estão acumuladas apenas em espécies de Piperaceae e podem contribuir para o avanço do conhecimento focando na Biossíntese Combinatória e Biologia Sintética.

Figura 2.5: Diversidade de enzimas de interesse biotecnológico envolvidas nas vias biossintéticas de amidas em *P. nigrum* e *P. tuberculatum*



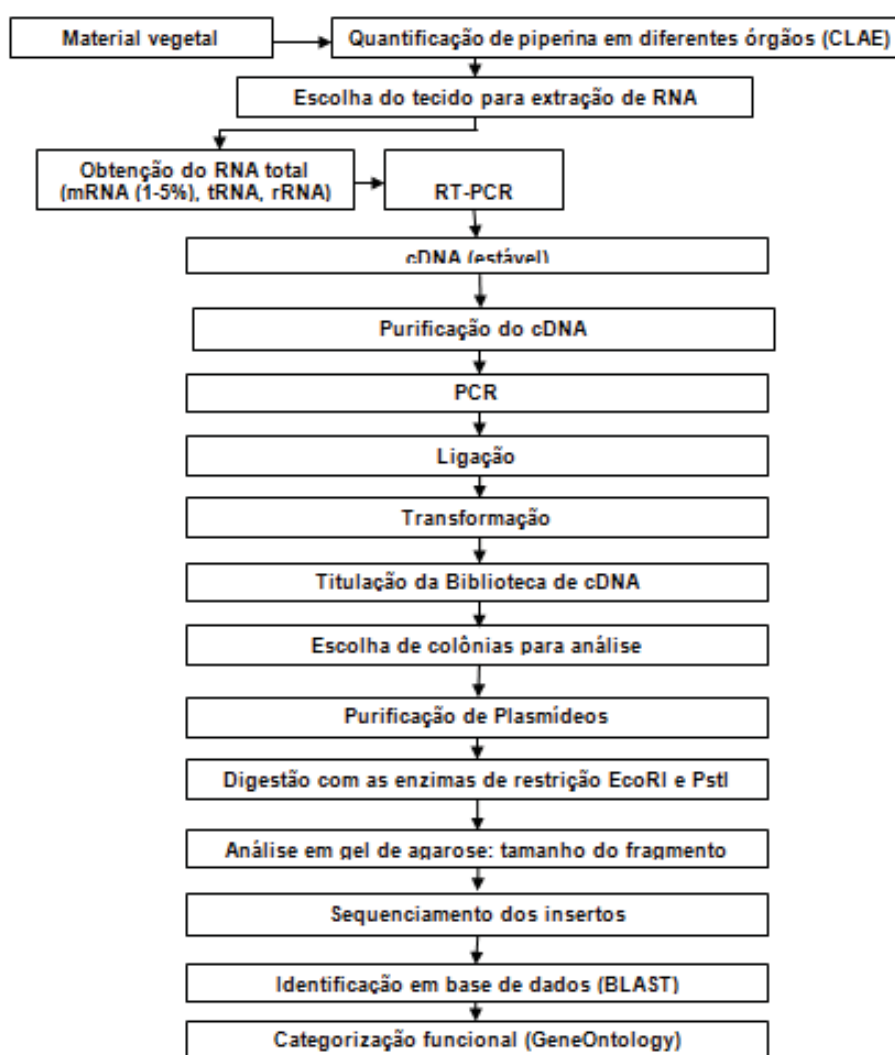
2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Todas as etapas experimentais descritas a seguir foram realizadas durante o estágio de doutorado sanduíche no grupo de Bioquímica de Proteínas e Perfil Metabólico, sob orientação do Dr. Thomas Vogt [Departamento de Biologia Celular e Metabólica, Instituto Leibniz de Bioquímica de Plantas, Halle (Saale), Alemanha].

2.1. Construção de uma biblioteca de cDNA

O fluxograma 2.1 a seguir ilustra as etapas realizadas desde a escolha do tecido vegetal para extração do mRNA até a classificação ontológica dos genes identificados na biblioteca de cDNA.

Fluxograma 2.1: Diagrama de fluxo simplificado das etapas envolvidas na obtenção de uma biblioteca de cDNA a partir do RNA total de frutos de *P. nigrum*



2.1.1 Preparação de extrato de tecidos de *P. nigrum* para quantificação de piperina

20 gramas de folhas, frutos e caules de *P. nigrum* foram transferidas para um almofariz previamente resfriado e congeladas com nitrogênio líquido. O material vegetal foi triturado separadamente com auxílio de pistilo e almofariz; nitrogênio líquido foi adicionado quando necessário. Após a trituração, as amostras foram mantidas dentro de tubos tipo Eppendorf à 80 °C.

Preparação do extrato vegetal

As amostras congeladas foram pesadas em balança analítica (aproximadamente 100 mg cada amostra). Adicionou-se metanol aos tubos tipo Eppendorf, de modo que a concentração final da solução atingisse 0,2 mg/mL (Tabela 2.2). Em seguida, as amostras foram mantidas em banho de ultra-som por 10 minutos para auxiliar no processo de extração. As amostras foram centrifugadas a 20.000 g, por 2 minutos.

Tabela 2.2: Amostras analisadas

Nome da amostra (pó congelado a -80°C)	Peso da amostra congelada	Volume de metanol (100%)
Galhos (Halle*)	99,1 mg	495,5 µL
Folhas (Köln*)	101,0mg	506,0 µL
Folhas (Witzenhausen*)	101,0mg	506,0 µL
Folhas (Halle*)	101,2 mg	506,5 µL
Folhas (Frankfurt*)	101,5 mg	507,5 µL
Frutos (Witzenhausen*)	114,6 mg	573 µL
Frutos (Frankfurt*)	60,5 mg	302,5 µL
Frutos (Köln*)	59,6 mg	298 µL

* cidade de origem das amostras

Diluição das amostras de extratos vegetais

As amostras (somente frutos) foram diluídos na proporção de 1:100. (1 mL da amostra e 99 mL de metanol puro) e homogeneizadas num micro-vial.

Análise das amostras em CLAE

Todas as amostras dos extratos vegetais e as soluções em diversas concentrações de piperina foram analisadas por CLAE no modo gradiente, conforme tabela abaixo:

Tabela 2.3: Condições de análise por CLAE

	Tempo (min.)	Fluxo (mL/min.)	% A (água e ácido fosfórico) (0,5%)	% B (Acetonitrila)
1	0.0	1,0	90	10
2	6.50	1,0	10	90
3	7.50	1,0	10	90
4	7.51	1,0	90	10
5	10.00	1,0	90	10

Condições de análise: CLAE-DAD: volume de amostra injetado: μL ; detector UV-visível = 210-380 nm; coluna: Supelcosil LC-18 (25 cm X 4,6 mm, 5 μm); fase móvel:

Preparação de soluções de piperina para construção de curva analítica

Preparou-se inicialmente uma solução 10 mM de piperina (Merck, 99%). A partir desta, por diluição uma solução de 1 mM foi obtida e em seguida soluções nas concentrações de 5 μM , 10 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM foram preparadas por diluição da solução-mãe, construindo-se assim a curva analítica.

2.1.2 Extração de RNA total de frutos de *P. nigrum*

Primeira etapa

- a.** Frutos de *P. nigrum* foram congelados com nitrogênio líquido e triturados em moinho de bolas (*Kugelmühle*);
- b.** Adicionou-se 6 mL de tampão de lise (uréia-LiCl) à 1 grama de pó congelado, misturado em um tubo de centrifuga de 30 mL (à temperatura ambiente). O tubo foi agitado moderadamente por 10 minutos em agitador (*Schüttler*) até a solução aparentar homogeneidade (As peças de metal, tubos e espátulas utilizadas no experimento foram previamente resfriados em nitrogênio líquido);
- c.** Adicionou-se 6 mL de solução fenol/clorofórmio (PCIA) e os tubos foram mantidos sob agitação por 20 minutos em agitador (*Schüttler*), sendo posteriormente centrifugados por 5 minutos (10000 g, 20°C, rotor F-28/50);
- d.** A fase aquosa foi cuidadosamente removida sem perturbar a interfase, e a esta adicionou-se novamente com 6 mL de PCIA e agitou-se por mais 10 minutos e centrifugou-se por 5 minutos a 5000g;
- e.** A fase superior foi removida e transferida para um tubo de 50 mL;

- f. Adicionou-se 400 µL de uma solução 3 M de acetato de sódio à amostra e agitou-se vigorosamente (esta quantidade de solução adicionada corresponde à 1/10 do volume total de amostra);
- g. Mediu-se o volume resultante, e foi adicionou-se 11 mL de etanol (-20 graus) (Esta quantidade corresponde à 2.5 do volume existente de amostra no tubo). O tubo foi invertido 3-4 vezes e este permaneceu 2 horas em refrigerador à - 20 °C, para precipitação dos ácidos nucleicos;
- h. O excesso de DNA foi retirado com auxílio de uma espátula (previamente limpa e resfriada com nitrogênio líquido);
- i. A amostra foi então centrifugada (5 minutos, 4 °C) e o precipitado (*pellet*) resultante foi lavado novamente com 2 mL de etanol 70% e deixado secar com a boca do tubo invertida sobre um papel absorvente. Caso necessário, pode-se secar sob fluxo leve de gás nitrogênio,
- j. Dissolveu-se o sólido em 500 µL de solução TE (Tris-EDTA-Mg²⁺) agitando-se manualmente. A dissolução pode demorar minutos, então deve-se esperar ou tentar dissolver com auxílio de micropipeta e ponteira, até total dissolução;
- k. Adicionou-se o mesmo volume de uma solução de LiCl 6M para precipitação de RNA. A solução foi mantida em refrigerador a 4 °C durante toda a noite, para a precipitação do RNA.

Segunda etapa

- l. A solução contendo RNA foi transferida para um tubo tipo Eppendorf e centrifugada (5000 rpm, 4 °C, 10 minutos, Centrifuga Eppendorf 5417R). O sobrenadante foi transferido para um tubo tipo Eppendorf de 2 mL e adicionou-se isopropanol na proporção 1:1 (o DNA foi precipitado à -80 °C, durante 30 minutos). O *pellet* de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 70% e o tubo contendo o sólido foi centrifugado durante 15 minutos a 8000g. O excesso de etanol foi removido e a amostra sólida seca a temperatura ambiente (pode-se inverter o tubo por alguns minutos sobre um papel limpo e absorvente. A amostra também pode ser seca usando fluxo de nitrogênio seco, por alguns segundos).
- m. O RNA foi dissolvido em 50 µL de tampão TE. Após, adicionou-se mais 50 µL, para dissolver melhor as amostras.
- n. O RNA foi quantificado pelo acompanhamento da absorbância a 260 nm em NANODROP. Calculou-se a razão A260/A280.

2.1.3 Purificação e concentração de RNA (Clean-up, kit QIAGEN®)

- a. Utilizou-se 100 µL de amostra de RNA extraído de frutos de *P. nigrum*. Para volumes de amostra menores, pode-se adicionar água (RNase-free) até atingir o volume de 100 µL.
- b. Adicionou-se 350 µL de tampão RLT®, e misturou-se com a ponta da pipeta;

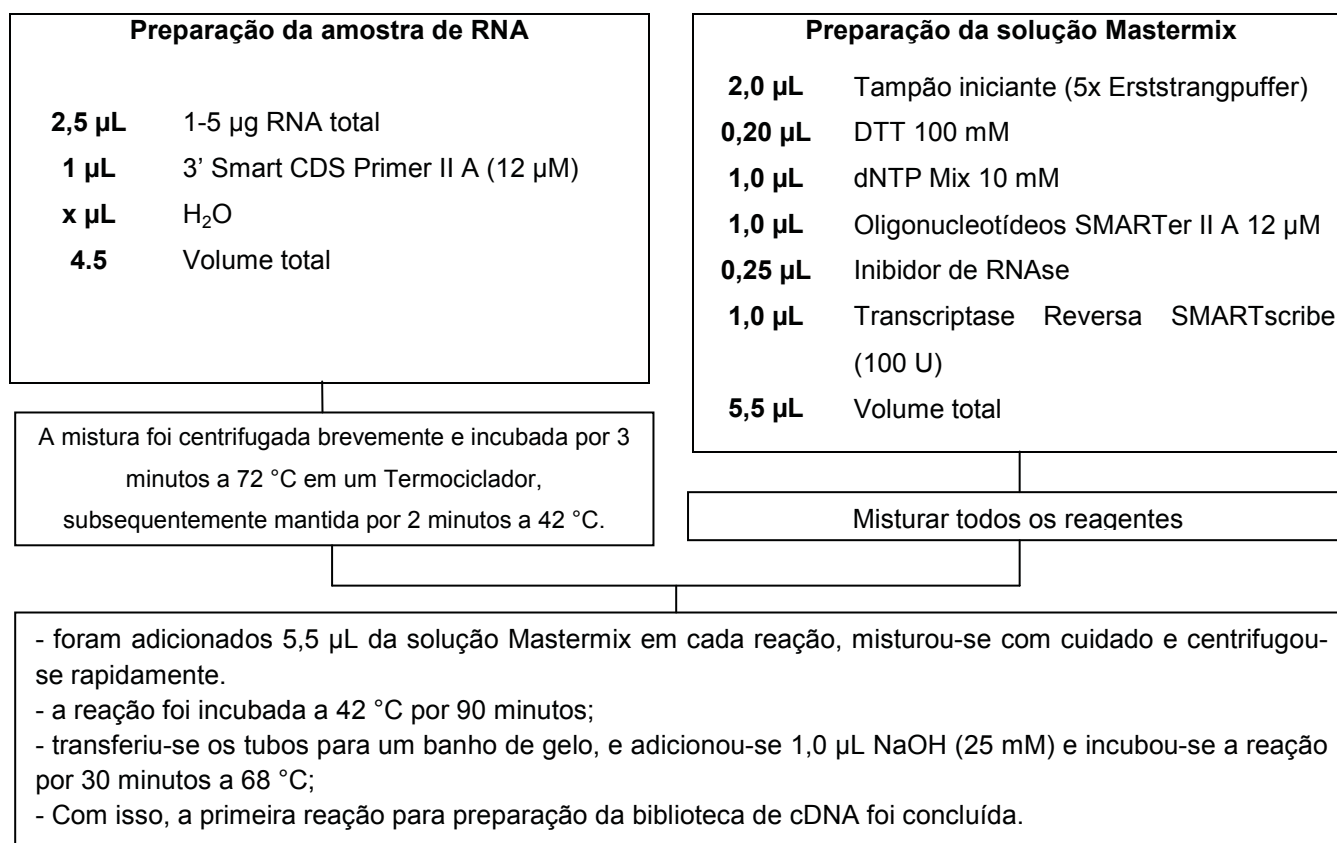
- c. Adicionou-se 250 μ L de etanol (não resfriado, 96-100%) para diluir o RNA, e misturou-se cuidadosamente com pipeta.
- d. A amostra foi aplicada em mini-coluna para purificação de RNA (RNeasy, pink QIAGEN). Esta coluna estava anexada em um tubo de 2 mL.
- e. O tubo da coluna foi fechado, centrifugado por 15 segundos a 8000g. Descartou-se o líquido;
- f. Transferiu-se a mini-coluna para outro tubo de 2 mL. Adicionou-se 500 μ L de tampão RPE® a esta coluna. Fechou-se a coluna e esta foi centrifugada por 1 minuto a 14000 rpm para lavagem. O líquido de lavagem foi descartado.
- g. Adicionou-se mais 500 μ L de tampão RPE® RNeasy na coluna. Fechou-se o tubo, e este foi centrifugado por 2 minutos a 8000g para secar a membrana de sílica-gel da coluna;
- h. O líquido foi desprezado, e a coluna foi alocada em um novo tubo de ensaio. Centrifugou-se em rotação máxima (20000.g) por 20 minutos.
- i. Transferiu-se a coluna para um novo tubo de coleta (2 mL);
- j. Adicionou-se 14 mL água Rnase-free diretamente no centro da membrana de sílica-gel. Fechou-se o tubo e centrifugou-se por 1 minuto a 20000.g.

2.1.4. RT-PCR: Síntese de cDNA pela técnica de extensão do *primer* (Kit Clontech In-Fusion™ SMARTer™ cDNA Library Construction).

Nesta etapa, foi realizada a síntese de cDNA com auxílio da enzima transcriptase reversa, uma enzima de origem viral que tem a capacidade de sintetizar uma molécula de DNA dupla fita a partir da cópia de uma molécula de RNA.

Primeira etapa:

Para cada reação:

Fluxograma 2.2: Primeira etapas para obtenção de cDNA para construção da biblioteca

O termociclador foi ajustado para 95°C e os seguintes reagentes foram combinados:

11 µL	cDNA sintetizado na reação anterior
73 µL	H ₂ O
10 µL	Advantage 2 PCR Puffer
2 µL	50x dNTP mix
2 µL	5'-primer II A (12 µM)
2 µL	50x Advantage 2 Polymerase Mix
100 µL	Volume total

Misturou-se rapidamente e o tubo foi centrifugado em seguida. No termociclador ajustou-se a seguinte programação:

Programa cDNA2		
1.	72°C	10 min
2.	95°C	15 seg
3.	65°C	30 seg
4.	68°C	6 seg
5.	16 ciclos	
6.	4°C	
2h 32 minutos		

Após o termino da reação a amostra foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, com padrão de 1 kb.

2.1.5. Purificação de cDNA (em mini-colunas de CromaSpin 1000)

A figura 2.7 mostra os componentes do kit para purificação do cDNA sintetizado. O componente 1 é uma coluna cromatográfica que contem uma resina pastosa onde será purificado o cDNA. O lacre da coluna 1 foi cortado com uma tesoura e imediatamente encaixada no tubo 2. Este conjunto então, foi adaptado ao tubo 3 para centrifugação.

Figura 2.7: Integrantes do kit: 1. coluna cromatográfica; 2. tubo de adaptação; 3. tubo para adaptação ao rotor



O conjunto foi então centrifugado (5 minutos, 700 g, Centrífuga Eppendorf 5810 R, 4°C), tornando-se então a coluna semi-seca. Adicionou-se 95 µL da amostra sob a fase estacionária da coluna, sendo esta centrifugada novamente por mais 5 minutos.

Eluição do cDNA

Adicionou-se sobre a coluna para eluição do cDNA, uma mistura de:

- 1,5 µL** glicogênio (20 µg/µl)
- 10 µL** solução 3M de acetato de sódio
- 250 µL** de etanol (100%, gelado)

O líquido foi mantido em refrigerador à -20°C por 2 horas para precipitação do cDNA. A amostra então foi submetida à centrifugação em temperatura ambiente (20 minutos, 20000 g, Centrífuga Eppendorf 5810 R). Em seguida o sobrenadante foi removido e o *pellet* lavado cuidadosamente com 100 µl de etanol 70%. O *pellet* foi então centrifugado à temperatura ambiente (5 minutos, 20000 g, Centrífuga Eppendorf 5810 R) e o cDNA resultante foi então diluído em 15 µL de tampão TE.

2.1.6. Ligação

Nesta etapa, realizou-se a ligação, que consiste na inserção do material genético cDNA proveniente de *P. nigrum* no vetor linearizado pSmart2IF (Figura 2.8), ocorrendo assim a clonagem.

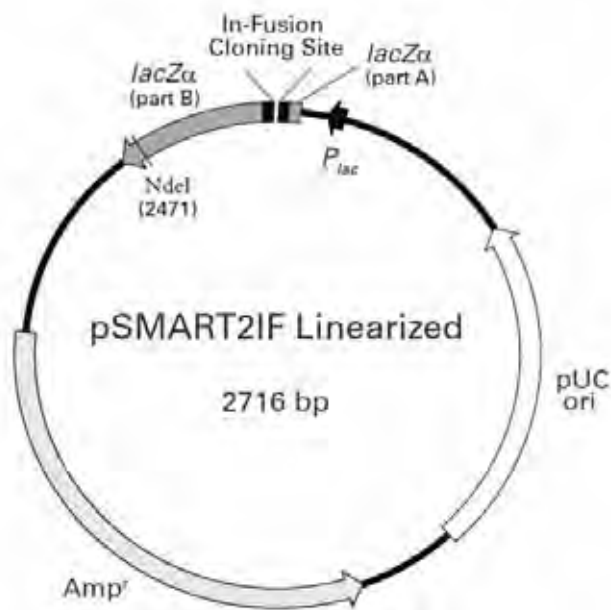
Misturou-se em um tubo tipo Eppendorf:

- 2 µL** Tampão 5x In-fusion Reaktion Puffer (Tampão de reação)
- 2 µL** vetor linearizado pSmart2IF (150 ng/µL) 2716 bp
- 4 µL** cDNA (150 ng/ µL)
- 1 µL** Enzima DNA ligase
- 1 µL** Água
- 10 µL** Volume total

A solução foi homogeneizada por inversão e centrifugada rapidamente. Os tubos permaneceram 15 minutos a 37°C e 15 minutos a 50°C; adicionou-se 90 µL de água ultrapura e 1,5 µL de glicogênio, misturou-se bem; adicionou-se 280 µl de etanol absoluto gelado; os tubos

foram mantidos por 17 horas à -80°C e posteriormente centrifugados (20.000 g, 35 minutos). O sobrenadante foi removido e o *pellet* seco ressuspensionado em 10 µl de H₂O.

Figura 2.8: Vetor (pSMART2IF) utilizado no processo de clonagem



Fonte: Manual do kit Clonentech

2.1.7. Transformação

Nesta etapa os vetores contendo insertos de DNA de *P. nigrum* foram introduzidos em células da bactéria *Escherichia coli* por eletroporação (Figura 2.9).

Parte 1

Tubos tipo Eppendorf contendo 50 µL de células eletrocompetentes (*Escherichia coli*, linhagem XL2 Blue) foram retirados do freezer -80°C e condicionados em gelo. A cubeta de eletroporação foi resfriada em gelo e as ponteiras e pipetas foram separadas e o aparelho de eletroporação (eletroporador Bio-Rad, MicroPulser) ligado. Após o descongelamento das células eletrocompetentes, adicionou-se 5 µL de produto de ligação (vetor + DNA de interesse), agitou-se levemente o tubo, por inversão, para homogeneização da solução e secou-se o exterior da cubeta de eletroporação. Os 55 µl da solução anterior foram introduzidos em uma cubeta própria para eletroporação (0,1 cm de distância entre os eletrodos) com auxílio de uma micropipeta. A cubeta foi encaixada no aparelho de eletroporação coberto com a tampa verde e aplicou-se um pulso Ec2 (V = 2.5 kV). As células transformadas foram imediatamente ressuspensionadas em 1 mL de meio

SOC (triptona, extrato de levedura, NaCl e glicose). A solução foi misturada com auxílio de uma pipeta de Pasteur (vidro) e transferida para um tubo Falcon de 12 mL. O tubo foi incubado por 1 hora à 37 °C, 179 rpm.

Parte 2

Após 1 hora de agitação, espalhou-se 250 µL da suspensão de células em placa de Petri contendo meio LB ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina, 1 mM IPTG (isopropil β-D-1-tiogalotopiranosídeo) e 75 mg/mL X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galotopiranosídeo). As placas permaneceram em incubadora à 37°C durante a noite.

Figura 2.9: Transformação: 1. Aparelho de eletroporação; 2. Câmara de agitação; 3. Incubadora (37°C)



2.1.8. Preparação do meio LB-ampicilina e seleção de colônias para crescimento.

Após o período de incubação, algumas colônias foram escolhidas aleatoriamente e transferidas para meio de cultura líquido para crescimento. Em tubos de 50 mL adicionou-se 50 mL de meio LB e mais 100 µL de solução de ampicilina (50 mg/mL), atingindo a concentração final de 100 µg/mL do antibiótico. Misturou-se bem por agitação e transferiu-se 3 mL deste meio para 20 tubos de 12 mL.

2.1.9. Preparação do meio LB-ampicilina e placas para plaqueamento

Em um frasco de vidro com tampa contendo 500 mL de meio LB Agar 1,5% adicionou-se 1 mL de uma solução de ampicilina (100 µg/mL), misturando por agitação. Esta solução foi distribuída em placas de Petri, evitando a formação de bolhas.

2.1.10. Titulação da biblioteca de cDNA

- a. 10 μ L do banco de cDNA (suspensão de todas as colônias contendo os fragmentos de cDNA de *P. nigrum*) foi diluído em 1 mL de meio LB (diluição 1:100);
- b. 100 μ L desta solução preparada foram novamente diluídos em 1 mL de meio LB (diluição 1:1000);
- c. 100 μ L desta última solução preparada foram diluídos novamente em 1 mL de meio LB (diluição 1:10000);
- d. O plaqueamento foi feito no prazo de 1 hora;
- e. Respectivamente, 10 μ L de cada suspensão preparada anteriormente foi diluída em 50 μ L de meio LB, e espalhadas sobre placas de LB ampicilina;
- f. As placas foram incubadas durante uma noite a 37 °C;
- g. Contou-se o número de colônias (Figura 2.10) e, assim, foi determinado o título do banco original.

Figura 2.10: Contagem visual para estimativa do número de colônias de bactérias modificadas



2.1.11. Purificação de plasmídios (kit GeneJET™ Plasmid Miniprep Fermentas)

- a. Após proliferação das colônias selecionadas (item 2.1.8), parte do meio de cultura contendo as bactérias foi transferida para um tubo de 1,5 mL, esta solução foi centrifugada (13000g, 1 minutos);
- b. O líquido foi descartado e o excesso de líquido ainda restante no tubo foi retirado com ajuda de uma micropipeta;

- c. O *pellet* foi ressuspensionado em 250 μ L de solução de ressuspensão, com agitação em Vortex; d. os tubos foram incubados com agitação por 5 minutos à 24 °C no Thermomix;
- d. Adicionou-se 250 μ L da solução de lise e misturou-se cuidadosamente por inversão 6 vezes;
- e. Adicionou-se 350 μ L da solução de neutralização e misturou-se imediatamente e cuidadosamente 4-6 vezes por inversão do tubo;
- f. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos (13000 *g*, 1 minutos);
- g. O sobrenadante foi transferido para uma minicoluna contida no kit. Evitou-se misturar a solução com o precipitado branco, pois pode causar entupimento da coluna;
- h. Centrifugou-se a coluna, adaptada a um tubo tipo Eppendorf de 2,0 mL.
- i. O líquido foi descartado e a coluna foi retornada ao tubo;
- j. Adicionou-se 500 μ L de tampão de lavagem (diluído previamente com etanol antes do uso).
- k. Centrifugou-se (13000 *g*, 30 segundos) e descartou-se o líquido; repetiu-se o passo anterior; centrifugou-se adicionalmente, para eliminar resíduos de etanol; a coluna foi então transferida para um tubo de 1,5 mL.
- l. Adicionou-se 50 μ L do tampão de eluição; incubou-se por 2 minutos a temperatura ambiente, então centrifugou-se (13000 *g*, 2 minutos); a coluna foi descartada e o líquido contendo o DNA foi estocado a 4 °C.

2.1.12. Digestão dos vetores com enzimas de restrição

Após a purificação do DNA plasmídial, estes foram submetidos a processo de digestão utilizando duas enzimas de restrição. O protocolo a seguir descreve a preparação da solução Mastermix e o procedimento para digestão:

Solução Mastermix (para 13 amostras):

52 μ L	10x tampão (Tango)
13 μ L	Enzima <i>EcoRI</i> (10u/ μ L)
13 μ L	Enzima <i>PstI</i> (10u/ μ L)
156 μ L	Água ultrapura
234 μ L	Volume final

Após o preparo da solução Mastermix, esta foi distribuída em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL (18 μ L/12 tubos) e posteriormente adicionou-se 2 μ L de DNA proveniente das culturas (item 2.1.11) em cada tubo. Os tubos foram agitados para promover a homogeneização da solução e posteriormente incubados à 37°C por 2 horas.

Preparação do gel de agarose (1%) para análise dos fragmentos

Em um frasco de Enlenmeyer pesou-se 1 grama de agarose e adicionou-se 100 mL de tampão 1xTBE. Aqueceu-se em microondas para dissolução total. Adicionou-se 10 µL de brometo de etídio (marcador de ácidos nucleicos) e agitou-se o frasco para dissolução. O frasco foi resfriado sob fluxo de água corrente e o conteúdo então despejado sobre uma forma (14,5 cm X 14 cm) e introduzido os pentes apropriados.

Eletroforese

Uma vez o gel solidificado e na cuba eletrolítica, aplicou-se uma corrente de 400 mA e 75 V durante 2 minutos antes de aplicar a amostra (aparelho E-Gel™ Base Invitrogen 810972, Ethrog Biotechnologies Ltd.); aplicou-se 10 µL do loading buffer; aplicou-se 20 µL de cada amostra nos sulcos do gel. Os géis foram documentados no aparelho BioDocAnalyze Biometra.

Preparação de meio LB e plaqueamento

Um frasco contendo 500 mL de meio de cultura LB (1,5 % de agar) esterilizado foi fundido em microondas por 15 minutos à baixa potencia (260 W) para plaqueamento. Após total liquefação do meio, o frasco foi transferido para um banho de água a 20 graus por 2 horas. Adicionou-se 1 mL de solução de ampicilina (50 µg/mL) à este volume de LB-agar, e distribuiu-se esta quantidade em 20 placas de Petri de plástico transparente.

2.1.13 Sequenciamento de DNA

Soluções contendo 2 µg de DNA foram diluídas com água ultra-pura até atingir o volume máximo de 20 µL. Apenas amostras de DNA com concentração mínimo de 100 ng/µL foram sequenciadas. O sequenciamento foi realizado pela empresa Eurofins (Ebersberg, Alemanha), utilizando o método Sanger (SANGER et al., 1977).

2.1.14 Bioinformática: identificação das sequencias e categorização funcional

A identificação das sequencias foi obtida utilizando o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), através de comparação com sequencias depositadas em banco de dados e parâmetros como score e cobertura. Para a categorização funcional utilizou-se o programa GeneOntology (<http://www.geneontology.org/>).

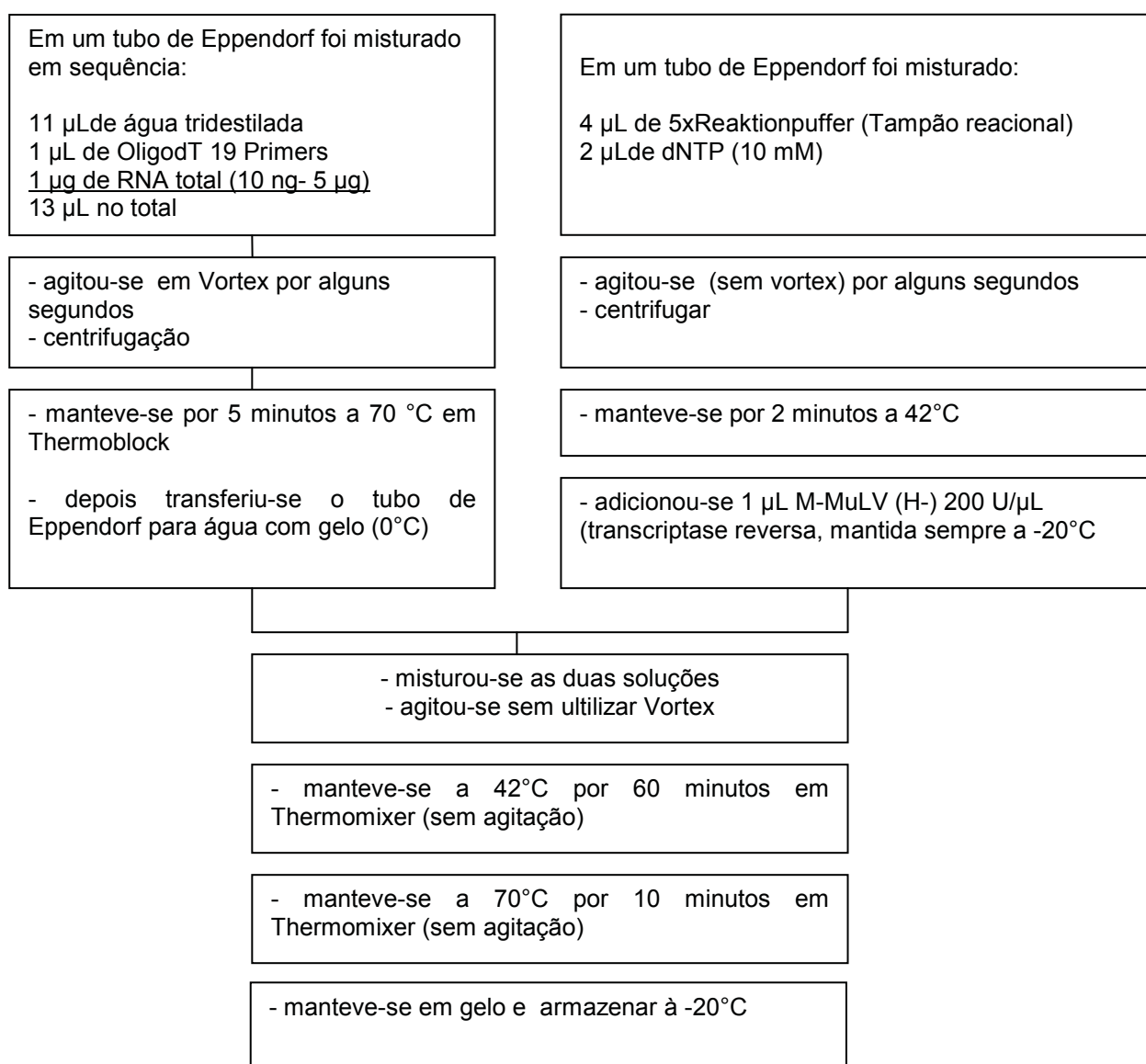
2.2. Tentativas de amplificação utilizando primers degenerados

Os *primers* foram adquiridos da Empresa Eurofins MWG. A partir das informações fornecidas pelo fabricante, foram preparadas soluções com concentração de 10 pmol/ μ L.

2.2.1. Protocolo para obtenção de cDNA a partir de RNA total (Fermentas)

O protocolo a seguir foi utilizado para obtenção do cDNA dos experimentos de amplificação com *primers* degenerados.

Fluxograma 2.3: Protocolo para obtenção de cDNA a partir de RNA total (Fermentas)



2.2.2. Desenho de *primers*

Foram desenhados diversos *primers* degenerados para CHS (chalcona sintase), COMT (Cafeoil CoA metiltransferase), BAHD (aciltransferase), PAL (fenilalanina amônia liase) e C4H (cinnamoil 4-hidroxilase) (PARK et al., 2010).

2.2.3. *Primers* de controle positivo para os experimentos de PCR

Um par de *primers* (forward e reverse) foi desenhado a partir do gene para NADH desidrogenase (subunidade F) de *Piper nigrum*. Este par de *primers* foi utilizado como padrão positivo em todos os experimentos de PCR.

Primer “Forward” = 5'-TAATCACAGTATTATTG-3' (18 bp) (44°C)

Primer “Reverse” = 5'-GCGGTAAACCAGCTGTG-3' (18 bp)

2.2.4. PCR (modo gradiente): Reação em cadeia da polimerase (kit BioMix™ Red Bioline®)

Mastermix (quantidade suficiente para 26 amostra)

52 µL Banco de cDNA/ cDNA

390 µL Tampão Redmix Bioline®

286 µL água Milli-Q

28 µL Mastermix

1 µL Reverse *Primer*

1 µL Forward *Primer*

30 µL volume total

Programa

etapa	temperatura	tempo
1.	95 °C	1 minuto
2	94 °C	10 segundos
3.	50 °C GRADIENTe 6°C	30 segundos
4.	72 °C	01:15
5.	Volta para etapa 2	34 repetições
6.	72 °C	10 minutos
7.	4 °C	-

Os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5 %, conforme item 2.2.5.

2.2.5. Preparação de gel de agarose (1,5 %) para análise dos produtos de PCR

Montou-se o sistema para preparação de gel agarose (a forma, 1 pente e 2 placas de contenção). Pesou-se 0,750 g de agarose (grau Biologia Molecular, Eurogentec) dentro de um Erlenmeyer e adicionou-se 50 mL de tampão 1xTBE. Aqueceu-se por 2 minutos em forno de microondas até a agarose dissolver. Após total dissolução, adicionou-se 4 µL de uma solução de brometo de etídio (1% ,10 mg/mL, Roth) e agitou-se o Erlenmeyer por mais alguns instantes sob água corrente. Esta solução foi despejada na forma e o pente introduzido. O aparelho utilizado na corrida foi Amersham Pharmacia Biotech. Aplicou-se 10 µL de amostra e 5 µL do padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Construção da biblioteca de cDNA a partir de RNA isolado de frutos de *Piper nigrum*, sequenciamento de DNA e análise das informações obtidas

O passo inicial para investigação de aspectos moleculares em *P. nigrum* foi a construção de uma biblioteca de cDNA a partir de RNA total extraído de frutos e a identificação de um conjunto de genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo primário e secundário.

A escolha do tecido para a extração do material genético foi a etapa mais importante para a construção de uma biblioteca de cDNA que representasse adequadamente o transcriptoma a ser estudado. Como uma das metas principais é a identificação de genes envolvidos no metabolismo secundário, monitorou-se a concentração da amida piperina em diversos tecidos vegetais como galhos (Figura 2.12), folhas (Figura 2.13), e frutos (Figura 2.14) utilizando-se CLAE-UV. As análises qualitativas, comparando-se o tempo de retenção do padrão revelou que apenas o extrato dos frutos contem quantidade significativa de piperina. Em contraste, piperina está ausente em outros órgãos, indicando que possivelmente a maquinaria enzimática responsável pela biossíntese deste composto deve ser restrita aos frutos. Um estudo semelhante realizado por Semler e Gross (1988) apresentou o mesmo resultado. A princípio cogitou-se a possibilidade de translocação do produto natural, mas como este não foi detectado em outros órgãos, após inspeção dos cromatogramas a possibilidade foi descartada. Deste modo, o RNA total foi extraído dos frutos, utilizando o método do fenol-clorofórmio.

Figura 2.11: Cromatograma: piperina (padrão) – tempo de retenção

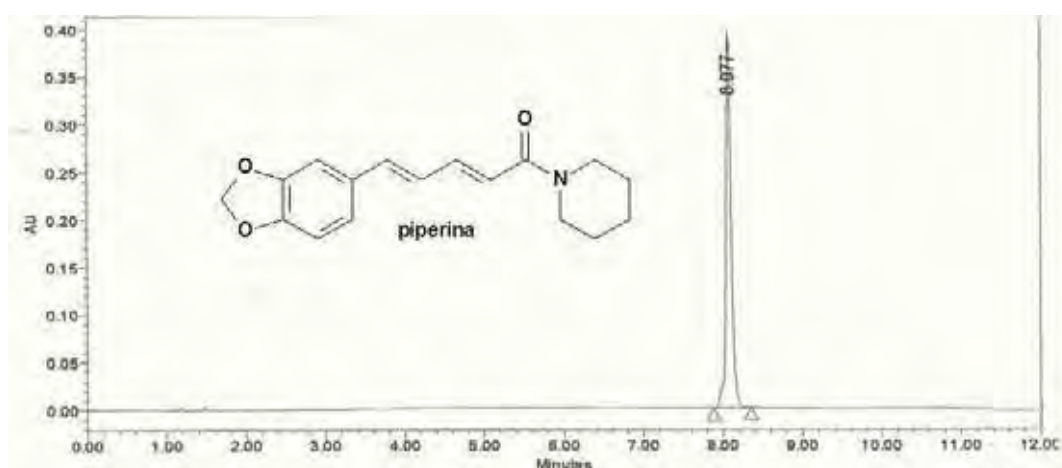
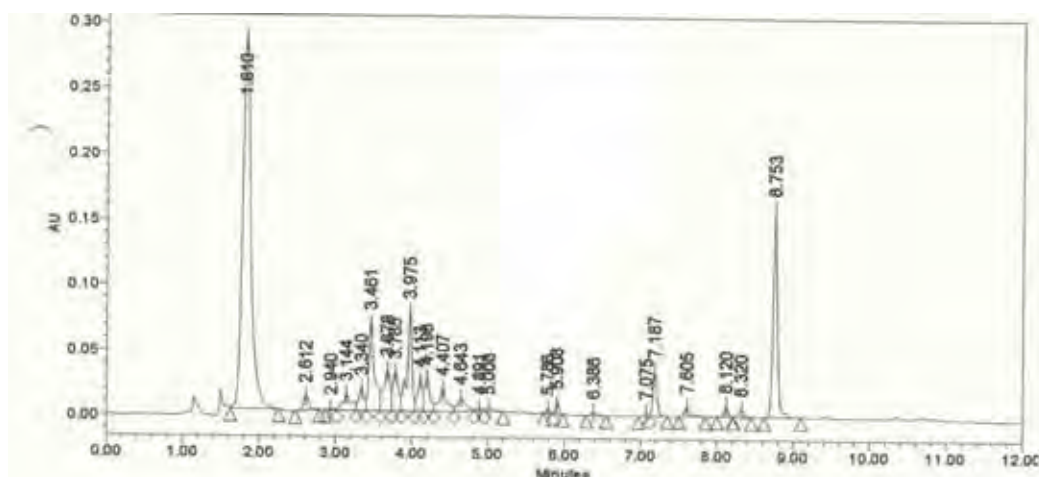
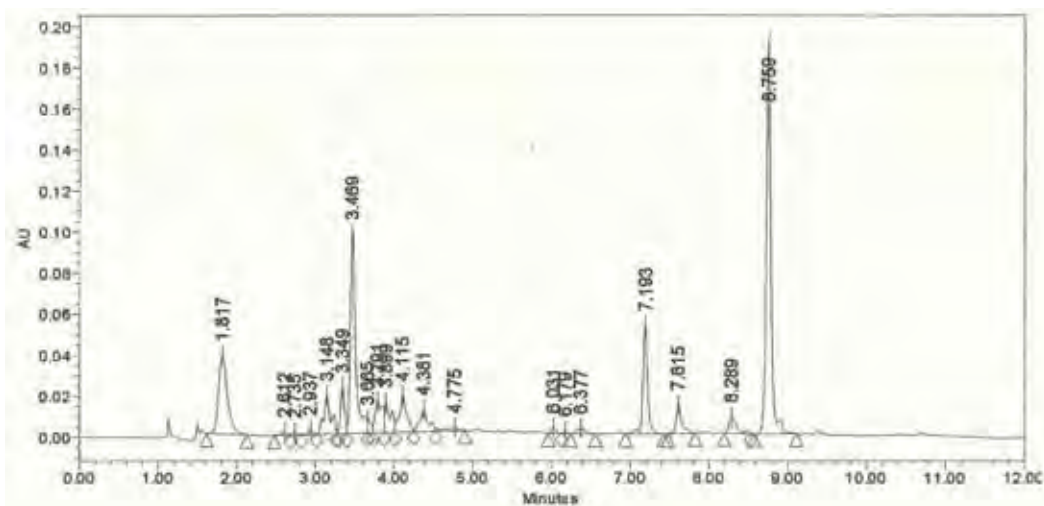
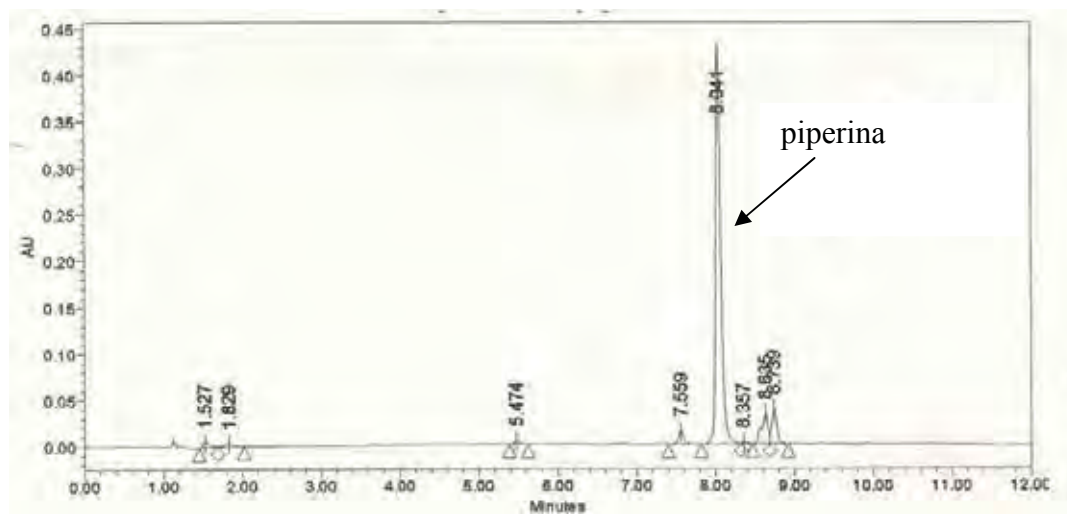
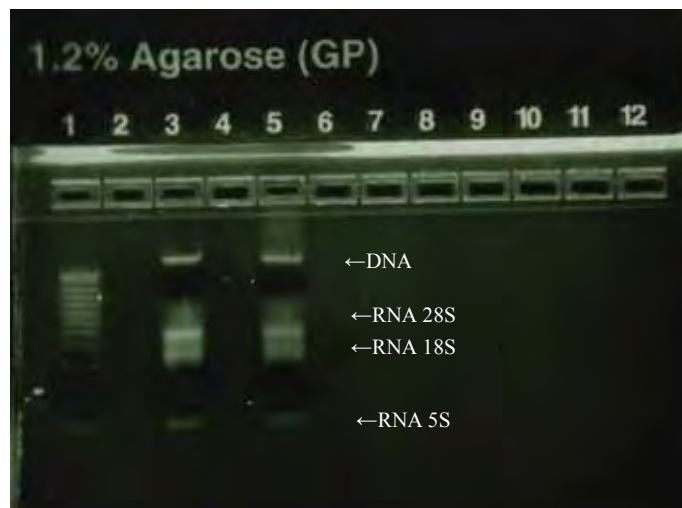


Figura 2.12: Cromatograma: Análise do extrato de galhos jovens de *P. nigrum* – ausência de piperina**Figura 2.13:** Cromatograma: análise do extrato de folhas jovens de *P. nigrum* – ausência de piperina**Figura 2.14:** Cromatograma: análise do extrato de frutos jovens de *P. nigrum* – alta concentração de piperina

A concentração de RNA total foi de 1040 µg/µL e o material apresentou-se translúcido. Após averiguação do perfil eletroforético em gel de agarose (Figura 2.15), observou-se que as bandas referentes à RNA ribossômico (28S, 18S e 5S) se apresentaram intactas e concentradas, indicando que o RNA não estava degradado, assim a amostra poderia ser utilizada como fonte de mRNA para a síntese de cDNA.

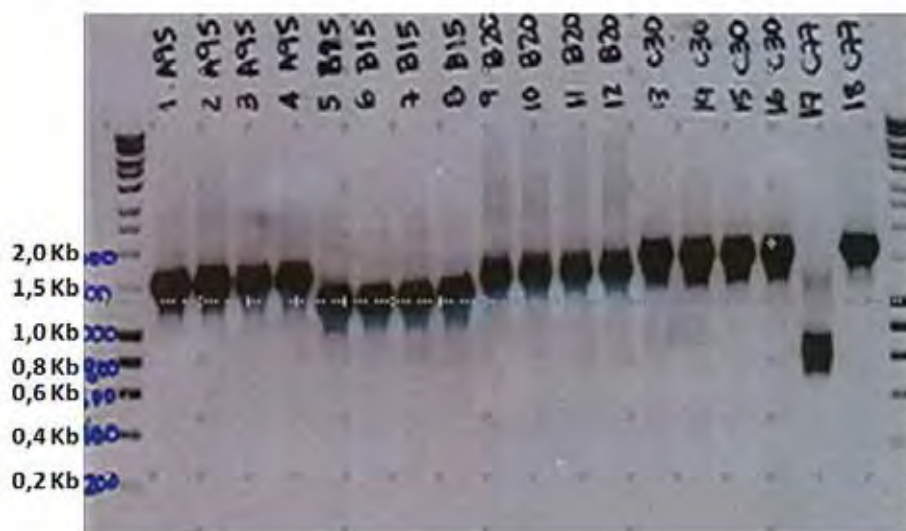
Figura 2.15: Perfil eletroforético do RNA total extraído de frutos de *P. nigrum* em gel de agarose 1,2%



A amostra de RNA total foi então purificada em coluna e, através da técnica de RT-PCR realizou-se a síntese de cDNA, seguido pela PCR, obtendo-se desta maneira maior quantidade de material genético para a etapa de clonagem molecular.

Para a construção da biblioteca de cDNA utilizou-se o kit “Clontech In-Fusion™ SMARTer™ cDNA Library Construction”, que é apropriado para a construção de bibliotecas contendo sequências “full-length”, usando como material de partida RNA poli A⁺ ou RNA total que estejam em baixa concentração. Na primeira etapa realizou-se a **ligação** entre os fragmentos de cDNA da planta (inserto) com o vetor (pSMART2IF), obtendo-se assim moléculas de DNA recombinante. Na segunda etapa, a molécula de DNA recombinante foi introduzida no interior da célula hospedeira (neste caso utilizou-se a bactéria *Escherichia coli*) ocorrendo o processo de **transformação** celular. As bactérias transformadas foram submetidas a incubação durante uma noite (14 horas) à 37°C. Após diversos ciclos de divisão, estas células transformadas produziram diversas cópias do DNA recombinante. A biblioteca produzida apresentou qualidade com cDNAs de tamanhos variados, cujos insertos variaram entre 100 pb até 4,0 Kb. A titulação da biblioteca de cDNA foi estimada em aproximadamente de 2,0 X10⁴ clones recombinantes.

Após a purificação dos plasmídeos (lise alcalina), digestão utilizando as enzimas de restrição PstI e EcoRI, os fragmentos observados através da análise em gel de agarose, foram classificados com base no comprimento. Dos 220 fragmentos, 18% possuem até 1,3 Kb, 64% entre 1,4-1,8 Kb, 11% entre 1,9-2,3 Kb e 7% são maiores que 2,3 Kb (Figura 2.16).

Figura 2.16: Análise dos clones após digestão e purificação; dados estatísticos: 230 fragmentos analisados

40 clones foram sequenciados (fragmentos entre 1,7 e 4,0 Kb), fornecendo informações iniciais sobre o transcriptoma de frutos de *P. nigrum*. As sequências foram comparadas com banco de dados e identificadas por meio do programa BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)). Os principais dados estão descritos na tabela 2.4:

Tabela 2.4: Genes identificados (até o momento) em *Piper nigrum* [Busca realizada na página <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>, modo blastn (Database: nucleotide collection (nr/nt); more dissimilar sequences (discontiguous megablast))]

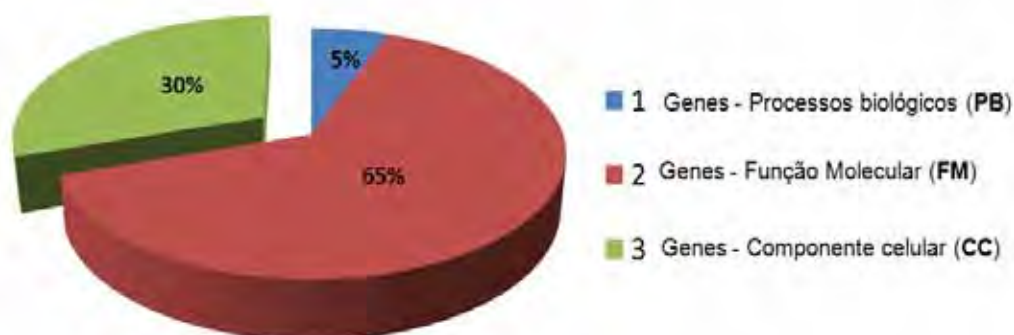
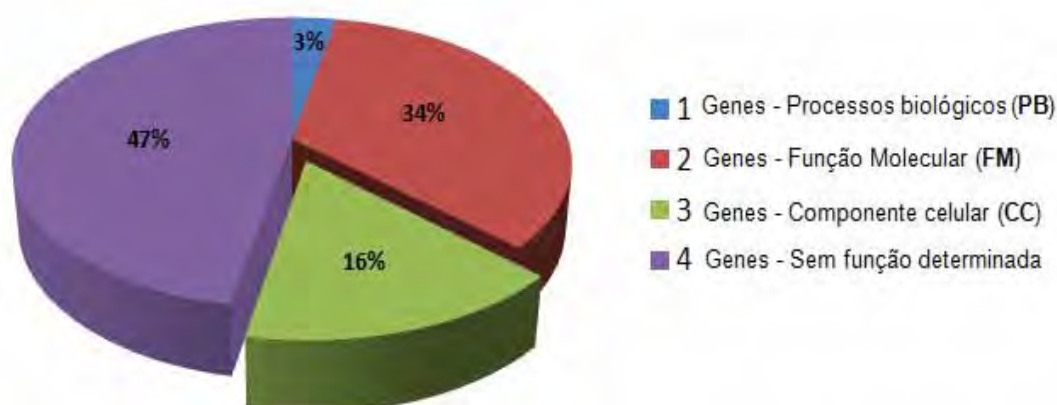
Código da amostra (Biblioteca de cDNA)	Identificação sugerida pelo programa BLAST	Organismo comparado	Semelhança (%)	PB (identidade em número de pares de bases)	ontologia
11	Proteína hipotética	<i>Ustilago maydis</i> (Hefe)	78	639	FM
11	Carbamoil fosfato sintase	<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama (basidiomycete)	68	505	FM
11	Carbamoil fosfato sintase	<i>Cryptococcus neoformans</i>	66	520	FM
18	RNA ribossômico 18S	<i>Piper betle</i>	93	830	FM
18	RNA ribossômico 18S	<i>Piper mullesua</i>	93	831	FM
18	RNA ribossômico 18S	<i>Piper excelsum</i>	93	827	FM
25	Nenhuma similaridade significativa encontrada	-	-		-
31.1	tio redoxina redutase B	<i>Arabidopsis</i>	70	637/909	FM

	(NADPH-dependente)	<i>lyrata</i>			
31.2	Fosforibosilantranilato transferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	70	647-923	FM
31.3	sinaptotagmina	<i>Ricinus communis</i>	71	647-910	CC
34	Nenhuma similaridade significativa encontrada	-	-	-	-
68	retrotransposon (transcriptase reversa Tib31)	<i>Vitis vinifera</i>	12*	95/129	CC
80	actina	<i>Ricinus communis</i>	86	748/870	CC
80	actina	<i>Betula luminifera</i>	85	747/870	CC
80	actina	<i>Brassica napus</i>	82	722/870	CC
99	predicted protein	<i>Populus trichocarpa</i>	4*	34/41	-
99	Cromossomo 7	<i>Medicago truncatula</i>	8*	53/73	-
A71	cloroplasto	<i>Piper cenocladum</i>	96	858/907	CC
A71	cloroplasto	<i>Liriodendron tulipifera</i>	93	713/871	CC
A71	cloroplasto	<i>Drimys granadensis</i>	92	713/893	CC
B1	DKEY-170H15	Zebrafish	4*	35/42	-
X1	Cinamoil CoA redutase	<i>Piper nigrum</i>	100		FM
B6	desidroflavonol 4-reductase	<i>Humulus lupulus</i>	44	44	FM
B93	β -glicosidase	<i>Ricinus communis</i>	79	526/708	FM
B93	β -manosidase	<i>Lycopersicon esculentum</i>	79	506/704	FM
B93	glicosil hidrolase	<i>Arabidopsis lyrata</i>	79	502/711	FM
B93	β -glucosidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	79	501/709	FM
B98	NADP-isocitrato desidrogenase	<i>Elaeis guineensis</i>	58	376/456	FM
B98	isocitrato desidrogenase	<i>Daucus carota</i>	58	369/456	FM

B98	NADP- isocitrato desidrogenase	<i>Glycine max</i>	57	358/446	FM
B98	NADP-specific isocitrato desidrogenase	<i>Eriobotrya japonica</i>	36	235/283	FM
C45	Proteína hipotética	<i>Ricinus communis</i>	37	266/380	-
C45	Proteína hipotética LOC100258902	<i>Vitis vinifera</i>	35	246/355	-
C54	Subunidade pequena do RNA ribossômico	<i>Piper betle</i>	94	872/876	CC
C79	cloroplasto	<i>Piper cenocladum</i>	96	810/853	CC
C81	Proteína ligante de DNA	<i>Ricinus communis</i>	70	547/697	FM
D1	transgenic GMO cassette genomic sequence	<i>Glycine max</i>	74	665/665	-
D1	vector pFCM1	-	74	665/665	-
D55	Nenhuma similaridade significativa encontrada	-	-	-	-
D64a	Nenhuma similaridade significativa encontrada	-	-	-	-
D64B	Fosfatase 2C	<i>Medicago truncatula</i>	33	213/293	FM
D64B	Fosfatase 2C	<i>Ricinus communis</i>	37	238/329	FM
D84	Nenhuma similaridade significativa encontrada	-	-	-	-
E13	Nenhuma similaridade significativa encontrada	-	-	-	-
E74	Proteína hipotética LOC100251610	<i>Vitis vinifera</i>	94	692/873	-
E74	Proteína transportadora de ATP	<i>Ricinus communis</i>	94	690/873	-
E93	Proteína hipotética	<i>Vitis vinifera</i>	92	664/875	

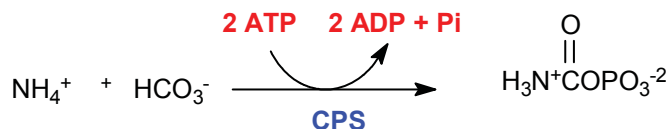
	LOC100241076				-
E93	FatoR de splicing U2AF (subunidade grande)	<i>Ricinus communis</i>	88	645/851	PB
F12	frutose-bifosfato aldolase	<i>Persea americana</i>	68	496/637	FM
F18	Nenhuma similaridade significativa encontrada	-	-	-	-
F24	Nenhuma similaridade significativa encontrada	-	-	-	-
S122A	Nenhuma similaridade significativa encontrada	-	-	-	-
S132G	bzdN gene, bzdO gene, bzdP gene,	<i>Azoarcus evansii</i>	3*	29/32	-
S140	Nenhuma similaridade significativa encontrada	-	-	-	-
S148a	Nenhuma similaridade significativa encontrada	-	-	-	-
A165A	heat shock protein,	<i>Ricinus communis</i>	94	646/779	FM
S165A	70 kDa heat shock protein (T16H11.7) (mRNA),	<i>Arabidopsis thaliana</i>	94	638/780	FM
S20A	contig VV78X125097.3, whole genome shotgun sequence	<i>Vitis vinifera</i>	67	561/836	-
BX2	Acetil CoA carboxilase	<i>Piper nigrum</i>	100		FM

Os genes identificados foram organizados, de acordo com o programa Gene Ontology (GO), em três categorias: processo biológico (PB), função molecular (FM) e componente celular (CC) (SALES et al., 2008). Considerando os genes identificados, 5% codificam proteínas que participam de processos biológicos, 30% são de componentes celulares e 65% codificam enzimas com funções moleculares (Figura 2.17). Se forem considerados os genes sem identificação, as porcentagens são de 3, 16 e 34%, respectivamente (Figura 2.18)

Figura 2.17: Categorização da biblioteca de cDNA de *P. nigrum* de acordo com o Gene Ontology.**Figura 2.18:** Categorização da biblioteca de cDNA de *P. nigrum* de acordo com o Gene Ontology (considerando os genes sem identificação).

A seguir serão descritos os fragmentos de genes identificados até o momento na biblioteca de cDNA.

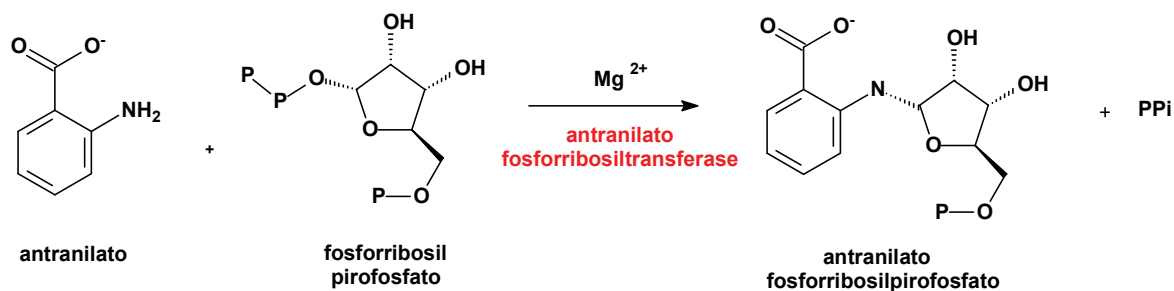
O **gene 11** foi caracterizado como codificador para a enzima **carbamoil fosfato sintetase** (CPS), que produz fosfato de carbamoila (CP) utilizando bicarbonato (HCO_3^{2-}), ATP e amônio (EC 6.3.4.16) ou o grupo amida da glutamina (EC 6.3.5.5) (Figura 2.19). A proteína isolada de *E. coli* é um heterodímero composto de uma subunidade pequena (42 kDa) e outra maior (118 kDa) (FAN et al., 2009). Estas subunidades formam uma enzima heterodimérica capaz de fornecer CP como um precursor para a síntese de arginina e pirimidina (STAPLETON et al., 1996).

Figura 2.19: Reação catalisada pela enzima carbamoil fosfato sintase (CPS)

O **gene 18** foi caracterizado como codificador para a **subunidade pequena (SSU) 18S rRNA**, que é um dos genes mais frequentemente utilizados em estudos filogenéticos e como um importante marcador para a triagem de biodiversidade ambiental. Em geral, sequências deste gene são de fácil acesso, devido à elevada conservação das regiões flanqueadoras permitindo o uso de *primers* universais. Seu arranjo repetitivo dentro do genoma fornece quantidades excessivas de modelo para reações de PCR. Quando os primeiros estudos filogenéticos com base em sequências de 18S foram publicados, este gene foi celebrado como o principal candidato para construir a árvore da vida de metazoários (MEYER et al., 2010).

Peróxido de hidrogênio é um subproduto do metabolismo aeróbico que, quando se acumula em níveis elevados, pode causar danos oxidativos às células. Apesar desse potencial efeito tóxico, peróxido de hidrogênio também é um importante mensageiro, em especial em organismos eucariotos. Portanto, a fim de equilibrar estes efeitos tóxicos, a concentração de peróxido de hidrogênio intracelular precisa ser rigorosamente controlada. Para isto, as células são equipadas com diferentes sistemas enzimáticos para a redução de peróxido de hidrogênio, incluindo as peroxirredoxinas (Prxs), dentre estas a **tiorredoxina redutase B (TrxR) (gene 31.1)** (EC 1.81.9) (PASCUAL et al., 2011).

Antranilato é uma amina aromática usada industrialmente como um intermediário para a síntese de corantes, perfumes, produtos farmacêuticos e outras classes de produtos. A síntese de antranilato é um processo insustentável, pois implica o uso de benzeno além da geração de subprodutos tóxicos. Em *Escherichia coli* a biossíntese de antranilato é mediado pela enzima corismato sintase antranilato (TrpED) e então convertido em antranilato fosforribosil pela enzima **antranilato fosforribosiltransferase (gene 31.2)** (EC 2.4.2.18) (Figura 2.20) para continuar a via do triptofano, tirosina ou fenilalanina. Estudos de modificação genética de *E. coli* para a produção desta última enzima foram relatados (BALDERAS-HERNANDEZ et al., 2009).

Figura 2.20: Reação catalisada pela enzima antranilato fosforribosiltransferase (APT)

O gene **31.3** foi caracterizado como codificador para uma enzima da classe das **sinaptotagminas**, que atuam como sensores para a regulação de cálcio e na secreção de hormônios. Embora estas enzimas possam compartilhar uma estrutura de domínio semelhante e um alto grau de homologia, nem todas as sinaptotagminas se ligam ao cálcio. Na verdade, apenas oito das quinze sinaptotagminas são capazes de ligação de cálcio (SCHAPIRE et al., 2008).

O **gene 68** foi caracterizado como codificador para **retrotransposons**, que são os maiores geradores de diversidade genética e também são ferramentas para a detecção de alterações genômicas associadas à sua atividade, porque eles criam grandes e estáveis inserções no genoma. Após a demonstração de que retrotransposons estão presentes, ativos e abundantes no genoma da planta, diversos sistemas de marcadores foram desenvolvidos para explorar polimorfismos nos padrões de inserção dos retrotransposons. Estes sistemas de marcadores são aplicados desde o mapeamento de genes responsáveis por traços particulares até a gestão de programas de retrocruzamento para a análise da estrutura populacional e diversidade de espécies selvagens (KALENDAR et al., 2011).

O **gene 80** foi caracterizado como codificador para a **actina**, que é uma proteína globular, com cerca de 42 kDa. Esta proteína é encontrada na maioria das células eucarióticas, onde podem estar presentes em concentrações de mais de 100 mM. É também conhecida por ser uma das proteínas mais conservadas, que não diferem mais de 20% em espécies tão diversas como as algas e seres humanos. Actina é a subunidade monomérica de dois tipos de filamentos nas células: os microfilamentos, um dos três principais componentes do citoesqueleto, e os filamentos finos, parte do aparato contrátil das células musculares. Assim, actina participa em muitos processos celulares importantes, incluindo a contração muscular, motilidade celular, divisão celular e citocinese, vesícula e movimento de organela, sinalização celular, e a criação e manutenção de junções celulares e forma da célula. Muitos destes processos são mediados por interações entre a actina com as membranas celulares (BLANCHON et al., 2010).

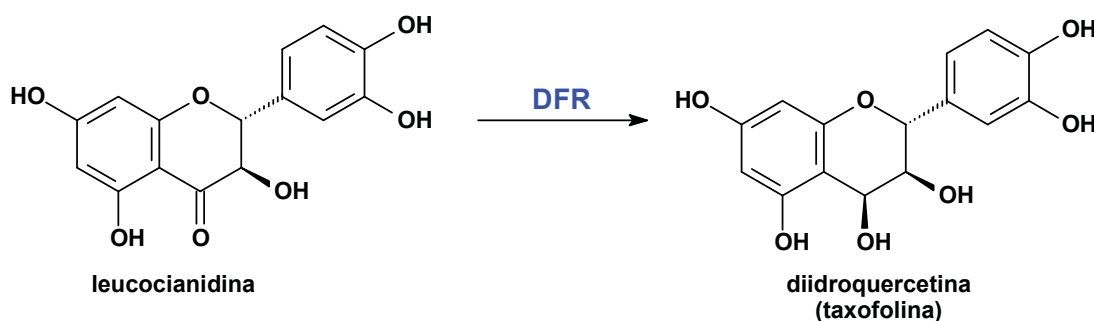
O **gene A71** foi caracterizado como um gene do **cloroplasto**. Os dados da sequência de DNA do cloroplasto são uma versátil ferramenta para identificação de plantas e servem como um código de barras (*barcoding*), possibilitando deste modo estabelecer relações genéticas entre diferentes espécies de plantas (NOCK et al., 2011). Embora o conceito de transformação de cloroplastos tenha sido desenvolvido três décadas atrás, o enorme potencial biotecnológico desta organela apenas recentemente foi reconhecido. Isto é evidente pela gama de produtos que podem ser produzidos nos plastídios (CLARKE et al., 2011).

Os ésteres cinnamoil-CoA são gerados pela via fenilpropanoídica e então são convertido à monolignóis por duas enzimas: a **cinnamoil-CoA redutase (CCR)** (**gene BX1**) e cinnamoil álcool desidrogenase (CAD). As ligninas, um dos principais componentes da parede celular, é resultante da polimerização oxidativa destes monolignóis. Recentes estudos utilizando *Oryza sativa* (arroz) como modelo mostrou que CCR é um efetor da *OsRac1* (KAWASAKI et al., 2006). A proteína

OsRac1 tem reconhecida função em estimular a produção de ROS e morte celular no processo de defesa das plantas (SERENO et al., 2009).

O gene **B6** foi caracterizado como codificador para a **desidroflavonol 4-redutase (DFR)**, que é uma enzima membro da família das desidrogenase de cadeia curta e catalisa o último passo em comum na biossíntese de flavan-3-ols e taninos condensados (Figura 2.21) (TRABELSI et al., 2011). A sequência de DNA que codifica esta enzima apresenta alta similaridade com a cinamoil álcool desidrogenase (CAD) e cinamoil-CoA redutase (CCR) e CCR-like (BARAKAT et al., 2011).

Figura 2.21: Reação catalizada pela enzima desidroflavonol 4-redutase (DFR)



O gene **B93** foi caracterizado como codificador para a enzima **β -glicosidase** (EC 3.2.1.21) que ocorre amplamente em procariotos e eucariotos. Ela catalisa a hidrólise das ligações β -glicosídicas de di e/ou oligossacarídeos, glicose ou outros conjugados. Nas plantas, a atividade da β -glicosidase está envolvida em diversos processos biológicos importantes. As β -glicosidases específicas de planta estão envolvidas na defesa química contra patógenos e herbívoros através do processo de cianogênese, pelo qual HCN (ácido cianídrico) e outros compostos tóxicos são liberados pela hidrólise de glicosídeos cianogênicos. Outras β -glicosidases atuam na regulação da atividade biológica de fitormônios vegetais, tais como citocinina, giberelina e auxina liberando formas ativas a partir de hormônio glucoside-conjugados inativos. Em fungos e bactérias, β -glicosidase está envolvida na hidrólise da celobiose em duas moléculas de glicose. Celobiose em si é o produto de degradação da celulose e sua acumulação inibe a atividade de celulasas, portanto, β -glicosidase desempenha um papel importante na sacarificação de celulose (YILMAZ e CAN, 2009). Estudos neste sentido foram realizados, mostrando que a β -glicosidase (BG) pode atenuar inibição da produção de etanol celulósico a partir da celobiose através da conversão da celobiose em glicose (HOOD et al., 2011; LEE et al., 2010).

O gene **B98** foi caracterizado como codificador para a enzima **isocitrato desidrogenase citosólica NADP-dependente (ciCDH)** (1.1.1.41) e (1.1.1.42), que participa no ciclo do ácido cítrico. Catalisa a terceira etapa do ciclo: a descarboxilação oxidativa do isocitrato, produzindo α -cetoglutarato e CO_2 , com conversão de NAD^+ para NADH (MHAMDI et al., 2010). Este é um

processo de duas etapas, que envolve a oxidação de isocitrato (um álcool secundário) para oxalosuccinato (uma cetona), seguido pela descarboxilação do grupo carboxila beta ao grupo cetona, formando α -cetoglutarato. Outra isoforma da enzima catalisa a mesma reação, no entanto esta não está relacionada com o ciclo do ácido cítrico, é realizado no citosol, bem como na mitocôndria e nos peroxissomos e utiliza NADP^+ como cofactor em vez de NAD^+ .

O **gene D64b** foi caracterizado como codificador para a **enzima fosfatase 2C (P2C)** (EC 3.1.3.16), que está envolvida em reações de fosforilação. A fosforilação de proteínas é um mecanismo importante que regulam processos celulares em animais e as plantas. Em particular, a fosforilação e desfosforilação de proteínas e enzimas reguladoras é um mecanismo geral para transmitir sinais a partir do ambiente extracelular para o interior da célula. As proteínas fosfatases, por oposição à ação de proteínas quinases, fornecem modulação e reversibilidade do mecanismo fosforegulatório. A função essencial da proteína fosfatase na natureza é refletida na sua estrita conservação ao longo da evolução. De fato as três principais classes de proteínas fosfatases serina/treonina relatadas em plantas são homólogas aos 1, 2A e 2C de mamíferos (RODRIGUEZ, 1998).

O **gene SX2** foi caracterizado como codificador para a enzima **acetil-coenzima carboxilase (ACC)** (EC 6.4.1.2) que catalisa a primeira etapa na biossíntese de ácidos graxos em bactérias e eucariotos. Nos últimos tempos esta enzima tornou-se alvo de desenho de drogas para o tratamento de doenças metabólicas em humanos e de herbicidas que atuem especificamente sobre a isoforma eucarióticas desta enzima em gramíneas (KROEGER et al., 2011).

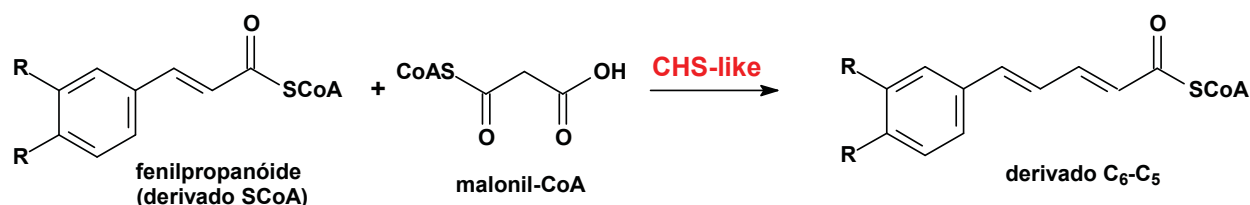
3.2. Tentativa de amplificação do cDNA utilizando *primers* degenerados

Primers degenerados para amplificação de genes de aciltransferase (BAHD), cafeoil-CoA O-metiltransferase (COMT), chalcona sintase (CHS), cinamato 4-hidroxilase (C4H) e fenilalanina amonia liase (PAL) foram desenhados utilizando sequencias conservadas de aminoácidos de outras plantas.

A superfamília das chalcona sintase policetídeo sintases (PKSs) do tipo III geram precursores de metabólitos secundários em plantas, incluindo chalconas, estilbenos, floroglucinóis, resorcinóis, benzofenonas, cromonas, acridonas, pironas e curcuminoides. Desde que o primeiro gene foi isolado de salsa (*Petroselinum hortense*) em 1983, mais de 900 genes de PKS do tipo III foram relatados em bases de dados (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.gov/>). As enzimas PKS do tipo III compartilham entre 30-95% de identidade de sequência de aminoácidos, mas esta identidade é de apenas 21-31% para as de origem bacteriana. As enzimas PKS tipo III, um homodímero de tamanho relativamente modesto (40-45 kDa), catalisam a montagem de policetídeos através da condensações de unidade de malonil-CoA, em um processo biossintético misto, que se aproxima bastante da biossíntese de ácidos graxos, mas sobre um substrato

diferente ao gupo acetil e sem o envolvimento da proteína transportadora de acila (ACP) (ABE e MORITA, 2010). Em *Piper nigrum* é proposto que uma enzima CHS-like, assim como em flavonóides, estilpironas e chalconas, catalize a condensação entre uma unidade fenilpropanoídica e malonil-CoA, fornecendo assim um derivado C₆-C₅ (Figura 2.22).

Figura 2.22: Possibilidade de participação de uma enzima com a mesma função de chalcona sintase



Considerando a similaridade das sequências de aminoácidos em plantas, foram selecionadas duas regiões para o desenho de *primers* degenerados: DLAENM (para *primer forward* e (E/D)YGNMS (para *primer reverse*) (ABE e MORITA, 2010). Após testes de PCR combinando diversos *primers* e gradiente de temperatura, não foi observado a formação de produtos em análise de gel de agarose.

BAHD é uma classe de aciltransferases recentemente descrita como responsável pela formação de uma grande variedade de metabólitos secundários em todo o reino vegetal. Os membros desta família catalizam a reação entre um ácido carboxílico ativado (neste caso, a forma tioéster CoA do ácido) ou álcool ou, mais raramente, uma amina, obtendo-se deste modo um éster ou uma amida, respectivamente (D'AURIA, 2006). Em *P. nigrum* existe a possibilidade de participação de uma enzima desta classe na reação mostrada na figura 2.23, para formação de grupo amida. Algumas regiões da sequência genética que codificam esta enzima são bastante conservadas (Figura 2.24), e assim desenhou-se *primers* degenerados. Após reações de PCR utilizando (cDNA e a biblioteca de cDNA) e análise dos produtos em gel de agarose. Novamente neste caso, não foi observada a formação de produtos. Geisler e Gross (1990) isolaram a enzima piperidina piperoiltransferase (EC 2.3.1.-), que tem função BAHD e catalisa o acoplamento entre o piperoil-CoA e piperidina, porém nossa análise foi negativa para a amplificação de tal sequência.

Figura 2.23: Possível reação catalizada por uma aciltransferase

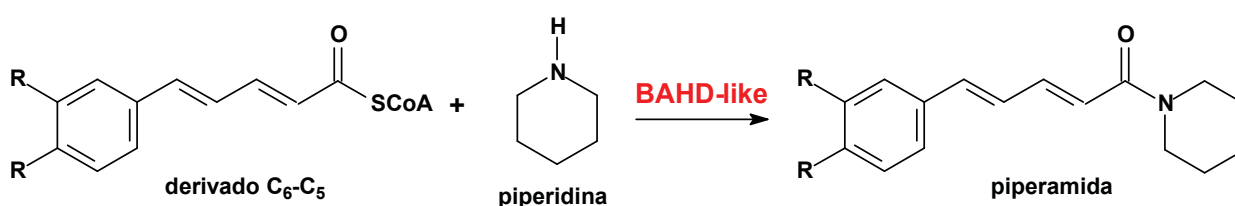
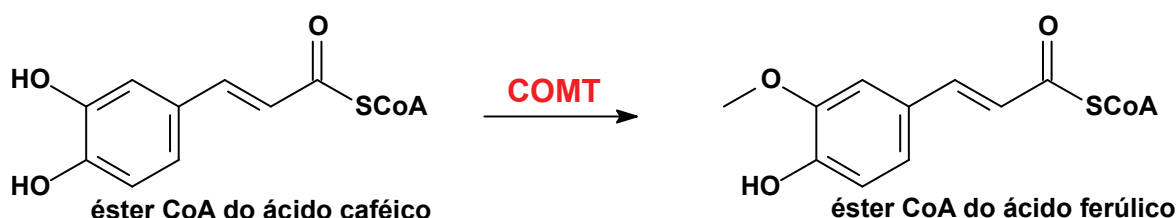


Figura 2.24: Comparação entre sequências de aminoácidos para BAHD para várias espécies vegetais

378	- - - -	LTDWRNI	GI	FGS	MDFGWDEPVNI	VPVVPSETARTVNMFM	BAHD1 At2g23510		
380	- - - -	LTDWRNI	GWFGS	MDFGWNEPVNL	RPLTQRESTV	HVGMI L	BAHD2 At2g25150		
380	NPNLGV	SWL	TL	PMYG	LDFGWGKEFYTG	- - -	GTDFDGLSLI	BAHD3 At2g19070	
372	CSN	- - - -	LCKYP	PYYT	VDFGWGRP	- - -	ERVCLGNGPSKNAFFL	BAHD Capsicum Pun1	
372	CSN	- - - -	LCKYP	PYYT	VDFGWGRP	- - -	ERVCLGNGPSKNAFFL	BAHD Capsicum chinense	
382	T	- - -	IAGSTR	LGVEA	DFGWGRP	VKVDI VSI D	- - -	CGEAI A	At3g29670 Anthocyan1
377	-	PNVL	VNSWGRI	PYQA	MDFGWGSPTFFGI	- - -	SNI FYDGQCFL	BAHD Anthranilate CAB064	
368	SDS	- - - -	WCRFP	PFYD	VDFGWGKP	- - -	I WCL FQPYI KNCVVM	BAHD AAC99311 Vindoline	
361	-	PNLWVI	SWWLP	PIYE	PDFGWGKAVYMG	- - -	WAAPFEGKSYL	BAHD Rosmarinic acid	
368	SPNI	EVD	SWLLI	PFYD	MDFGGGRPFFFP	- - -	SYLPVEGLLI L	BAHD AAO73071 Agmatine	

Tentou-se também amplificar fragmento para a enzima cafeoil CoA O-metiltransferase (CCoAOMT) (Figura 2.25), mas também não houve formação de produtos, indicando que a sequência para *P. nigrum* não é compatível com os *primers* desenhados baseados nas sequências conservadas (Figura 2.26).

Figura 2.25: Reação catalizada pela enzima cafeoil CoA O-metiltransferase (CCoAOMT)**Figura 2.26:** Comparação entre sequências de várias espécies vegetais

123	KI	NFI	ESDAML	ALDNL	LQGOE	SEGSYDF	GFVDADKPNYI	PFOMT
118	KI	DFKE	SEAL	PALDE	LLNKN	VEGGDF	AFVDADKLNW	AT4G26220
121	KI	NFI	QSDAV	RGLD	OLLN	GKCE	- YDFAFVDADKTNYV	AT1G67990
101	KI	NFI	HSDGL	KALD	QLVN	- DKCE	- FDFAFADADKSSYV	AT1G67980
171	KVN	VKGL	AAESL	KSMI	QNGE	- GASYD	FAFVDADKRMVQ	AT3G62000
183	KVT	VKHG	AAESL	MSMI	QNGE	- ESSYD	FAFLDADKAMYQ	AT3G61990
144	KI	DFREG	PALP	VLD	DEI	VADEKN	HGTDFI FVDADKONYI	Arabidopsis CCoAOMT1
127	KI	SFI	VSDAM	TLLD	LLAD	GRYOG	SYDFAFVDADKTNYV	Stellaria OMT
139	KI	DFREG	PALP	VLD	DLI	EDAKN	HGSFDFAFVDADKONYG	Ice plant CCoAOMT
126	KI	DFREG	PALP	VLD	QTL	EDGKY	HGTDFV FVDADKONY	Ammi majus CCoAOMT
132	KI	DFREG	PALP	VLD	DEI	KDEKN	HGSYDFI FVDADKONYL	Alfalfa CCoAOMT

Ácido cinâmico 4-hidroxilase (C4H) (Figura 2.27), um membro da superfamília citocromo P450 monooxigenases, desempenha um papel central no metabolismo de fenilpropanóides e na biossíntese de lignina (RO et al., 2001). A sequência para a enzima cinamato 4-hidroxilase possui sítios de conservação bastante evidentes (Figura 2.28), o que auxilia no desenho de *primers* degenerados. No entanto, após a reação de PCR utilizando estes *primers*, não houve a formação de produtos.

Figura 2.27: Reação catalizada pela enzima cinamato 4-hidroxilase (C4H)

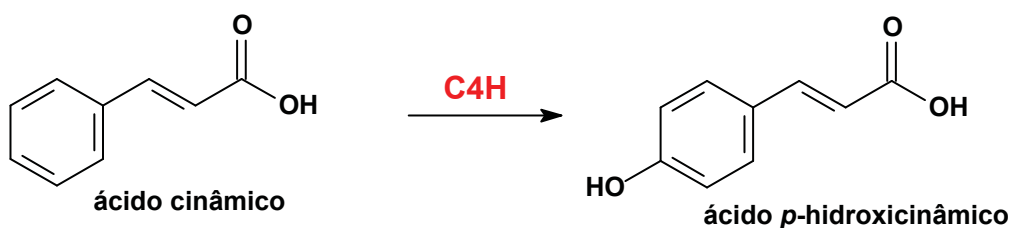
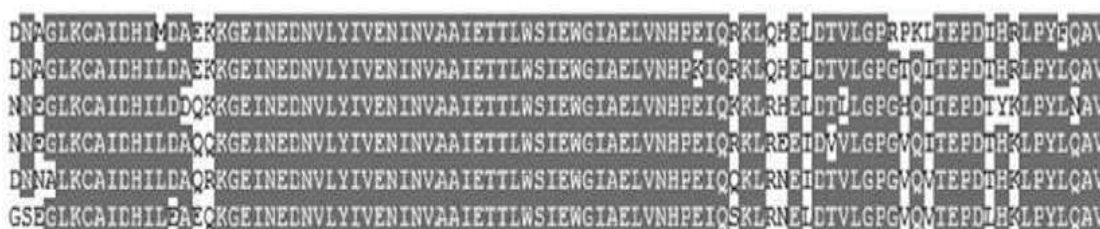


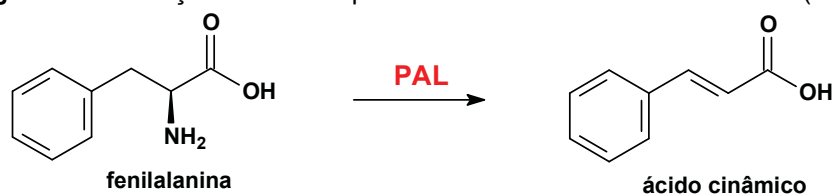
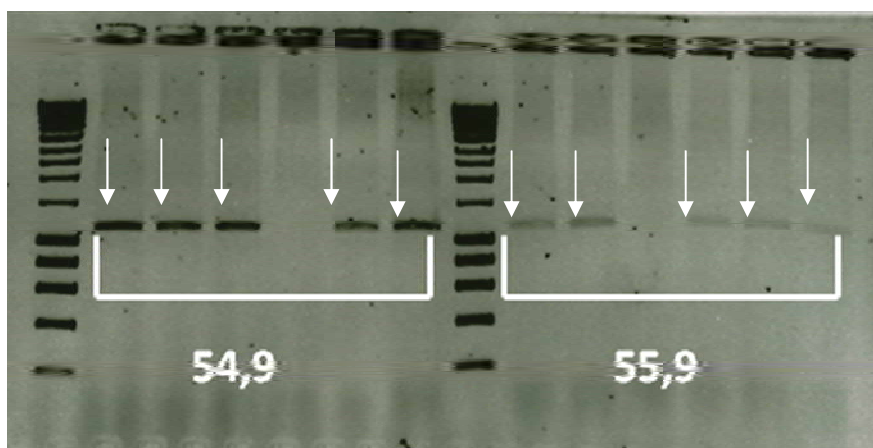
Figura 2.28: Comparação entre sequencias para C4H de várias espécies vegetais



Outros testes foram realizados usando *primers* degenerados para a enzima fenilalanina amoníase (PAL) (PAL, EC 4.3.1.5), levando em consideração a conservação deste gene (Figura 29). Esta é a primeira enzima-chave na via dos fenilpropanóides e catalisa a conversão de L-fenilalanina ao ácido trans-cinâmico (Figura 2.30). Nos últimos anos, esta enzima já foi clonada de diversas espécies e suas sequências determinadas (PARK et al., 2010). Pesquisas sobre PAL e C4H têm importantes aplicações em biotecnologia e na elucidação da regulação da via de biossíntese fenilpropanóide, uma vez que ambas estão envolvidas no controle do fluxo desta via. Por exemplo, C4H controla o fluxo de carbono para fitoalexinas que são sintetizados quando as plantas são atacadas por agentes patogênicos (TUAN et al., 2010). Testes iniciais com os *primers* degenerados e utilizando o cDNA purificado e diretamente a biblioteca de cDNA (mistura de colônias de bactérias) mostraram resultados positivos (Figura 2.31). Após etapas de extração do material genético do gel, clonagem molecular, purificação do plasmídeo e sequenciamento, o resultado era que a sequência pertencia ao genoma de *Escherichia coli*.

Figura 2.29: Comparação entre sequencias para PAL para várias espécies vegetais



Figura 2.30: Reação catalizada pela enzima fenilalanina amônia liase (PAL)**Figura 2.31:** Produto de PCR a 54,9°C e 55,9°C (Biblioteca de cDNA e *primers* para PAL), indicado pelas setas brancas

PARTE III

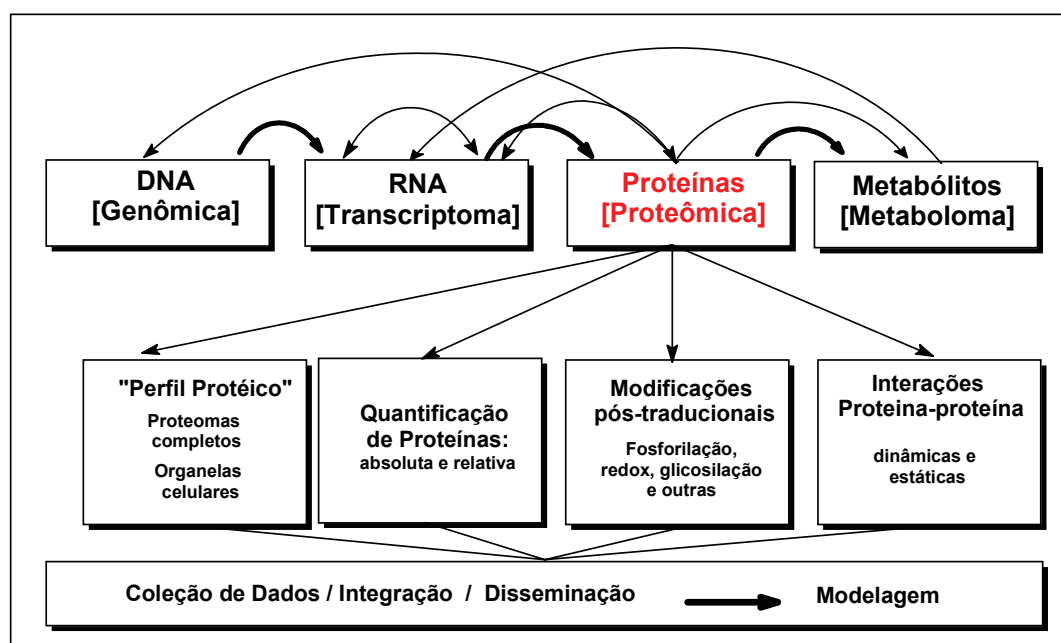
ANÁLISE PROTEÔMICA DE ESPÉCIES DE PIPERACEAE

1. INTRODUÇÃO

1.1. Proteômica

O termo proteômica foi introduzido em 1995 (WASINGER et al., 1995) para descrever o conjunto de todas as proteínas que são expressas por um genoma. A proteômica é uma importante ciência para compreender os sistemas biológicos porque fornece informações sobre a concentração, interações, funções e atividades de proteínas, que são os principais componentes estruturais e funcionais das células e que também desempenham um papel central na biologia de sistemas e são tidas como o produto final da expressão de um gene. Estas informações são importantes porque complementam outros estudos realizados com o mesmo organismo, como a análise do transcriptoma, metaboloma e vias biossintéticas deste indivíduo. Várias interações complexas entre os elementos do sistema DNA, RNA, proteínas e metabólitos existem e ultrapassam o dogma central da biologia molecular. Existem várias abordagens para analisar e caracterizar um sistema biológico em nível proteômico. O objetivo de todas abrange o conhecimento detalhado do comportamento do sistema, que integrado com outros dados, permite a modelagem das complexas interações em uma célula viva (Figura 3.1) (BAGINSKY, 2009).

Figura 3.1: As interações entre os elementos moleculares básicos dos sistemas biológicos.



Fonte: Adaptação: (BAGINSKY, 2009)

Atualmente, a principal técnica utilizada para a análise do proteoma de qualquer organismo é a eletroforese bidimensional (2D); e nos últimos anos a eletroforese em gel diferencial (2D-DIGE), ICAT (Isotope-coded Affinity Tag) e iTRAQ (Isobaric tags for relative and absolute quantitation) também tem sido empregadas, especialmente em análises quantitativas e

comparativas (GROBEI et al., 2009). Informações quantitativas sobre as proteínas identificadas são fundamentais para analisar a dinâmica de adaptações do proteoma em resposta a uma perturbação (FOURNIER et al., 2007).

As duas principais técnicas espectrométricas para análise destas grandes moléculas biológicas são (1) a espectrometria de massa com base na dessorção e ionização das proteínas com laser, auxiliado por uma matriz (MALDI -Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization), que analisa a massa através do tempo de voo dos íons no tubo de análise (ToF – Time of Flight) e (2) a espectrometria de massa baseada na ionização por pulsos elétricos em meio líquido (ESI- ElectroSpray Ionization). A primeira é uma técnica suave de ionização, permitindo a análise de biomoléculas (biopolímeros como o DNA, proteínas, peptídeos e açúcares) e grandes moléculas orgânicas (como polímeros, dendrímeros e outras macromoléculas), que tendem a ser frágeis e fragmentar quando ionizadas por métodos mais convencionais de ionização. O padrão de massas obtido (*peptides mass fingerprint*) é comparado em bancos de dados para a identificação das proteínas. Apesar de rápido e prático, este método dá apenas o grau de similaridade dos padrões de massas de peptídeos entre proteínas anotadas. Por outra parte, a espectrometria ESI analisa a massa dos diversos fragmentos obtidos da colisão dos polipeptídeos contra um gás inerte como o argônio. A massa de todos os fragmentos e a massa teórica dos resíduos de aminoácidos é, então, utilizada num algoritmo computacional para determinar a sequência dos resíduos de aminoácidos. Neste aspecto a espectrometria ESI é uma ferramenta eficiente que pode, em alguns casos, substituir o sequenciamento clássico (ROCHA et al., 2005).

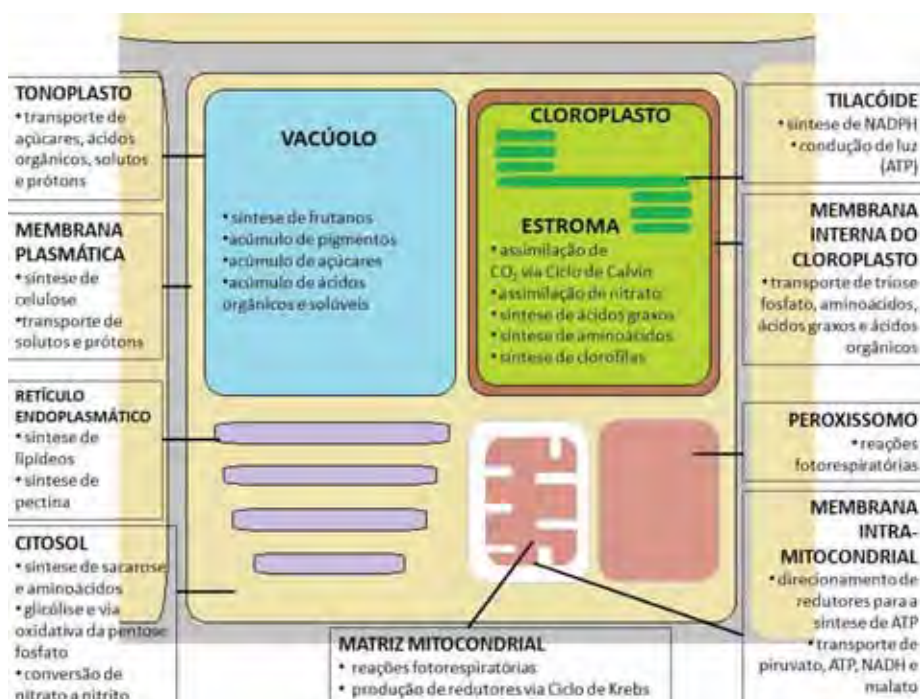
A análise de proteínas é ideal para a detecção das modificações pós-traducionais, justamente por que as proteínas são tidas como o produto final da expressão de um gene. “*Protein profiling*” é um termo utilizado para descrever a tentativa de identificar proteínas que estão presentes nas células, fornecendo uma identificação rápida dos constituintes majoritários do proteoma. Com os avanços tecnológicos, a identificação das modificações pós-traducionais como a fosforilação, glicosilação e as modificações redox tornaram-se parte das disciplinas de proteômica “*high-throughput*” (FOURNIER et al., 2007).

Dentre as plantas, *Arabidopsis thaliana* possui proteoma razoavelmente caracterizado. Um estudo em larga escala do proteoma de *A. thaliana* por 2D-PAGE e MALDI-TOF permitiu identificação de 2.943 *spots*, que se originaram a partir de apenas 663 genes diferentes. Esses números são pequenos considerando que mais de 27.000 genes codificadores de proteínas são previstos a partir da sequência do genoma dessa espécie (BAERENFALLER et al., 2008; GIAVALISCO et al., 2005). Outro estudo analisou as proteínas de partes específicas, obtendo-se um mapa do proteoma das raízes, folhas juvenis, cotilédones, sementes, siliqua, flores, botões de flores, carpelos de flores, e culturas de células não-diferenciadas de *A. thaliana*, levando a identificação de 13.029 proteínas, o que representa aproximadamente 50% dos genes previstos. A partir das análises deste conjunto de dados, foi possível propor biomarcadores específicos para

cada órgão, avaliar a correlação entre o nível de transcrição e acúmulo de proteína, compartimentalização das vias metabólicas, além de uma revisão do número de genes previstos para proteínas expressas (TAYLOR et al., 2007).

Em termos de compartimentos intracelulares, muitos estudos se concentram na análise do proteoma de plastídios, uma das organelas mais específicas de plantas e que contam com as vias biossintéticas mais importantes que distinguem as células vegetais das de outros eucariotos. Estes estudos incluíram a análise dos cloroplastos e outros tipos plastídios, como etioplastos, amiloplastos e cromoplastos. Outro alvo para estudos *high-throughput* de proteoma em plantas são as mitocôndrias, peroxissomos, o nucléolo, vacúolos, membrana plasmática, a parede celular e ribossomos citosólicos (REMMERIE et al., 2011). Estas organelas são estudadas separadamente devido à compartimentalização das vias biossintéticas. Cada sequência metabólica requer diferentes condições para ocorrer simultaneamente na mesma célula e a compartimentalização permite que cada via metabólica atue em diferentes locais, em diferentes proporções e simultaneamente. O citosol, plastídio, mitocôndria, vacúolo e o sistema de endomembranas são todos compartimentos metabolicamente distintos, não somente para a compreensão do metabolismo primário, mas também o secundário, e por isto estudos proteômicos devem ser direcionados (SMITH et al., 2010) (Figura 3.2).

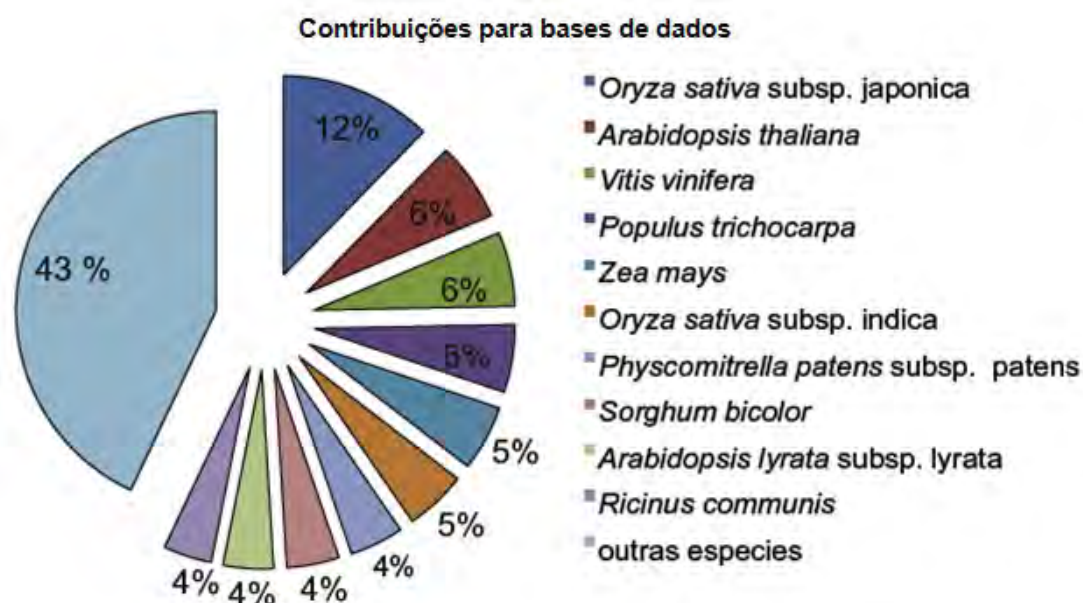
Figura 3.2: Compartimentalização de processos biológicos e vias biossintéticas em diferentes compartimentos vegetais



Fonte: SMITH et al., 2010 (adaptação)

Embora esta diversidade de estudos indique progresso no campo da proteômica vegetal, as pesquisas com plantas ainda atingem uma cobertura muito limitada e pouco profunda em comparação ao estado da arte de outras (Figura 3.3) (REMMERIE et al., 2011). A maioria dos alvos da proteômica vegetal ainda são as espécies economicamente importantes, como arroz, trigo e uva, bem como algumas plantas-modelo como *Arabidopsis*. Os estudos de genômica e proteômica de plantas tropicais são muito escassos. As espécies vegetais tropicais representam 2/3 do número total de plantas verdes do mundo e têm um enorme potencial para aplicações farmacêuticas, reflorestamento, agronomia e outros (BALBUENA et al., 2011).

Figura 3.3: Contribuição de diferentes espécies de plantas na base de dados UniProt



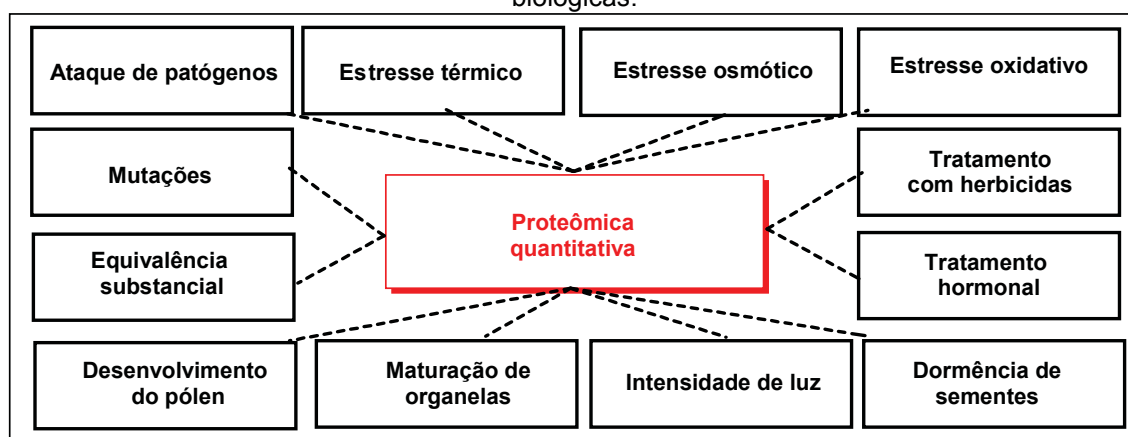
Fonte: REMMERIE et al., 2011 – Adaptação

Dentre espécies do gênero *Piper*, foram publicadas informações sobre o proteoma de *P. sarmentosum*, que é uma erva medicinal usualmente usada para tratar febre, tosse, asma e pleurisia. Neste estudo, realizou-se eletroforese em gel de poliácridamida monodimensional (SDS-PAGE), e as proteínas extraídas migraram na faixa de 25 kDa a 75 kDa de massa molecular. Cada uma das bandas no gel foi então retirada e as proteínas digeridas com tripsina e submetidas a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC/MS/MS) para identificação. Foram identificadas proteínas vegetais de defesa, proteínas estruturais e enzimas. Foram também identificadas diversas isoformas da RuBisCO e da pectinesterase, sendo essa última utilizada comercialmente em vários processos, incluindo o processamento de frutas e legumes (SHIM et al., 2010).

Os métodos quantitativos são amplamente utilizados para caracterização de perturbações específicas nas plantas. Estas pesquisas fornecem informações sobre alterações na expressão de proteínas ocasionada por estresse biótico e abiótico, geralmente em resposta ao

estresse de luz; deficiência de nutrientes; adaptações do proteoma ao estresse causado pelo frio ou calor; indução de proteínas em estresse osmótico; mecanismos de dormência das sementes, mecanismos de resistência contra patógenos, etc. (Figura 3.4). A identificação destas diferenças entre um indivíduo saudável e outro submetido a algum tipo de estresse ou doença pode ser utilizado como um *fingerprint* e servir para diagnosticar doenças, para suplementar nutrientes entre outros usos. Esta proposta para utilização da proteômica diferencial vem sendo alvo de diversas pesquisas também na medicina humana (WU e ZANG et al., 2007).

Figura 3.4: Aplicação de estratégias de proteômica quantitativa para plantas na elucidação de questões biológicas.



Os estudos proteômicos são norteados por muitas dificuldades e desafios. O número de proteínas expressas é muito maior que o número de genes, e não existe uma metodologia disponível que permita a amplificação de proteínas com baixo número de cópias. Proteínas também são física e quimicamente mais complexas do que os ácidos nucleicos, com interações e funções que dependem de sua estrutura tridimensional. As proteínas podem sofrer modificações pós-traducionais, tais como clivagem, fosforilação, metilação, acetilação, hidrólise entre outras. Por tais razões, prever a estrutura final e função de diferentes proteínas a partir da análise proteômica é um grande desafio. A preparação das amostras é certamente a principal etapa experimental e diversos problemas são relatados quanto a obtenção do extrato proteico, em especial quando existe a necessidade de obter frações enriquecidas em determinadas classes de proteínas, como por exemplo as proteínas de membrana. A reprodutibilidade do processo eletroforético e as interferências causadas pela presença de polissacarídeos e metabólitos secundários nas amostras protéicas são dificuldades frequentes, além da presença de proteínas/enzima em grande concentração nos tecidos vegetais, como a RuBisCO, o que dificulta a observação das bandas eletroforéticas de proteínas que estão presentes em menor escala (BALBUENA et al., 2011; KRISHNAN e NATARAJAN, 2009).

A integração de dados oriundos da proteômica com as informações fornecidas pela genômica, transcritômica e metabolômica não é uma tarefa trivial. A combinação desses dados

requer parâmetros normalizadores, controle experimental rígido e uma visão ampla para associar resultados estatísticos aos mecanismos moleculares da atividade celular. Nesse sentido, o avanço das pesquisas em proteômica será impulsionado pelo incremento das ferramentas de bioinformática e estatística, bem como no desenvolvimento estratégico e tecnológico. Assim, a proteômica contribui para a expansão da gama de informações biológicas, permitindo entender melhor os aspectos fundamentais da biologia de plantas e podendo gerar no futuro um evidente impacto nas práticas agronômicas, farmacêuticas, alimentícias e de saúde (SALVATO e CARVALHO, 2010).

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1. Obtenção de extratos protéicos

Foi obtido a fração microssomal de folhas e frutos de *P. tuberculatum* e folhas de *P. crassinervium*, conforme protocolos descritos a seguir:

2.1.1. Protocolo para obtenção de extrato microssomal de *P. tuberculatum* (DURST et al., 1996)

Preparação do tampão (100 mL)

O tampão utilizado na extração dos microssomos de folhas e frutos jovens de *Piper tuberculatum* continha 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH=7,4; EDTA 1 mM (37,2 mg); sacarose 250 mM (8,55 g); DTT 15 mM (231 mg) e ascorbato de sódio 40 mM (792 mg).

Obtenção da fração microssomal

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 vegetal (a cada 20 g de folhas, 4 g de PVPP foram utilizados);

- folhas jovens e brotos foram colhidos e empacotados em papel alumínio e colocadas em N₂ líquido, sendo pesadas logo em seguida (17,10 g);
- o material vegetal foi lavado e triturado em almofariz com auxílio de pistilo e N₂;
- foram adicionado 42,75 mL do tampão;
- a mistura foi triturada e mantida em banho de gelo por 10 minutos sob agitação suave;
- as amostras foram filtradas em gaze e recolhidas e centrifugadas por 15 minutos a 10000g (9150 rpm)
- o precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado uma solução 1 M de MgCl₂ necessário para atingir uma concentração de 30 mM;
- 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.

2.1.2 Protocolo para obtenção de extrato microssomal de *P. crassinervium*

As coletas foram feitas sempre as 9:30 da manhã. Imediatamente após a coleta, as folhas (raízes) foram mantidas em N₂ líquido até congelamento. As mesmas foram trituradas em N₂ líquido utilizando-se gral e pistilo. Posteriormente, foi adicionada solução tampão pH = 8 (KPi 0,1M), com 35 % p/p do PVPP e 10 mM DTT (3 mL/g de material vegetal). A suspensão obtida foi agitada

suavemente por 15 min. em banho de gelo, filtrada em gaze, e posteriormente centrifugada a 13000 rpm por 10 min. a 4°C. O precipitado obtido foi descartado e o sobrenadante submetido a procedimentos de dosagem protéica, pré-purificação, determinação da atividade enzimática, SDS-PAGE.

2.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (monodimensional)

A SDS-PAGE monodimensional foi utilizada para monitorar a qualidade e diversidade de proteínas do extrato. Todos os reagentes e protocolos estão descritos no capítulo I.

2.3. Eletroforese bidimensional (IEF/SDS-PAGE)

A seguir serão descritos todos os passos desenvolvidos na eletroforese bidimensional (2D-SDS-PAGE). O fluxograma 3.1 ao fim do item 2.6 resume a sequência experimental.

Soluções e reagentes necessários

Todas as metodologias descritas a seguir foram extraídas do protocolo *2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients – Principles and Methods* (Amershan Biosciences, 2001).

Tabela 3.1: Solução de reidratação* (sem adição do IPG buffer)

	Concentração final	Quantidade
Água deionizada		25 mL
Uréia	8 M	12 g
CHAPS	2% (m/v)	0,5 g
Azul de bromofenol (1%) (solução 1)	0,002% (m/v)	50 µL

*Alíquotas de 1,0 mL foram estocadas a -80°C.

Solução de reidratação (com adição do IPG buffer)

As alíquotas de 1,0 mL da solução B estocadas devem ser retiradas do freezer a -80°C um pouco antes do preparo. Imediatamente antes do uso, 2,8 mg de DTT e 20 µL de **IPG buffer/Pharmalyte®** (pH 3-10) foram adicionados por cada alíquota de solução **B** agitados em vortex para homogeneização.

Tabela 3.2: Tampão de equilíbrio

	Concentração final	Quantidade
Água deionizada		200 mL
TRIS-HCl, pH 8,8 (solução F)	50 mM	10 mL
Uréia	6 M	72,07 g
Glicerol (87% v/v)	30% (v/v)	69 mL
SDS	2% (m/v)	4,0 g
Azul de bromofenol 1% (Solução I)	0,002% (m/v)	400 µL

Alíquotas de 10 mL foram estocadas a -80°C.

Tabela 3.3: Solução estoque de acrilamida-bisacrilamida

	Concentração final	Quantidade
Água deionizada		200 mL
Acrilamida	30% (m/v)	60 g
Bisacrilamida	0,8% (m/v)	1,6 g

Tabela 3.4: Tampão de resolução (4x)

	Concentração final	Quantidade
Água deionizada		1000 mL
TRIS	1,5 M	181,7 g
Água deionizada		750 mL
HCl		Ajustar o pH para 8,8

Tabela 3.5: Solução SDS 10%

	Concentração final	Quantidade
SDS	10% (m/v)	5,0 g
Água deionizada		Para 50 mL

Tabela 3.6: Solução persulfato de amônia* 10%

	Concentração final	Quantidade
Persulfato de amônia	10% (m/v)	0,1 g
Água deionizada		para 1 mL

* Esta solução foi preparada momentos antes de iniciar o processo de preparação do gel.

Tabela 3.7: Tampão de corrida

	Concentração final	Quantidade
TRIS	25 mM	30,3 g
Glicina	192 mM	144,0 g
SDS	0,1%	10,0 g
Água deionizada		para 10 L

Tabela 3.8: Solução de agarose

	Concentração final	Quantidade
Tampão de corrida		100 mL
Agarose	0,5%	0,5 g
Azul de bromofenol (1%)	0,002% (m/v)	200 µL

Tabela 3.9: Solução estoque de azul de bromofenol (1%)

	Concentração final	Quantidade
Azul de bromofenol	1%	100 mg
TRIS	50 mM	60 mg
Água deionizada		Para 10 mL

Clean-up das amostras

O *clean-up* das amostras foi realizado utilizando o kit *2-D clean-up* da Amersham Biosciences. Este procedimento envolve a combinação de agentes precipitantes que eliminam da amostra a presença de interferentes, tais como sais e ácidos nucleicos, que dificultam o desenvolvimento e a resolução da metodologia.

Procedimento de *clean-up* aplicado

15 minutos	Em um tubo tipo <i>Eppendorf</i> de 1,5 mL, transferir 1-100 µL de uma solução contendo 1-100 µg de proteína e 300 µL da solução precipitante , agitar a mistura em vortex e mantê-la em gelo. Adicionar 300 µL da solução co-precipitante (em torno de 5 minutos), misturar e manter em gelo.
10 minutos	Centrifugar a 9.000 g durante 10 minutos. O sobrenadante é descartado e o precipitado é centrifugado rapidamente para a remoção completa do sobrenadante. O precipitado não deve ser removido.
5 minutos	Adicionar 40 µL da solução co-precipitante , e colocar o tubo em banho de gelo.
	Centrifugar a 9.000 g. Descartar o sobrenadante.
5-10 segundos	Adicionar 25 µL de água deionizada ao precipitado e agitar em vortex até dispersar o precipitado.
30 minutos ou mais	Adicionar 1 mL de tampão de lavagem (Wash Buffer) (resfriado a -20°C por pelo menos 1 hora prévio ao uso) e 5 µL de aditivo de lavagem . Agitar o tubo em vortex durante 20-30 segundos por cada 10 minutos, durante 30 minutos.
10 minutos	Centrifugar a 9.000 g.
5 minutos	Eliminar o sobrenadante, permitindo ao precipitado secar.
5 minutos	Ressuspender o precipitado na solução de reidratação C

Uma vez realizado o *clean up*, o precipitado resultante foi solubilizado em 250 μL da solução de reidratação **C**. Esta preparação foi suficiente para hidratar apenas um *strip*. O tampão de lavagem (Wash buffer) deve ser armazenado em geladeira a -20°C . e retirado 2 horas antes do uso.

Hidratação dos strips (tiras) de IPG

Foram utilizadas tiras de IPG de 13 cm (pH 3-10), as quais foram reidratadas na bandeja de *DryStrip Reswelling Tray* com 250 μL da solução de **reidratação C** (adicionada de DTT e IPG buffer/Pharmalyte). Primeiro aplicou-se a amostra na bandeja (13 cm), retirou-se a proteção do *strip* e este foi colocado em contato com a amostra (com o lado que contém o gel em contato com a solução), em seguida, os *strip* foram cobertos com *cover fluid* para evitar desidratação. O período de reidratação foi de 14-18 hs à 22°C . O IPG buffer foi escolhido conforme a faixa de pH do *strip*.

Após a reidratação, as tiras foram transferidas ao focalizador isoeletrico (figura 3.5).

Primeira dimensão: focalização isoeletrica (IEF)

A focalização isoeletrica foi realizada utilizando o equipamento ETTAN™ IPGphor II (figura 3.5).

Figura 3.5: Fotografia do ETTAN™ IPGphor II (Amersham Biosciences).



(Foto: Fernando Cotinguiba)

As tiras (*strips*) foram colocadas no *Manifold* (peça de cerâmica) segundo o especificado pelo fabricante, cobertas com volume adequado de *cover fluid*. A focalização foi realizada a 20°C sendo aplicados 50 μA por tira. O gradiente utilizado está descrito na tabela 3.10. Depois de focalizadas, as tiras foram armazenadas a -80°C até serem submetidas à segunda dimensão SDS-PAGE.

Tabela 3.10: Protocolo de focalização isoeletrica aplicado. (Tiras de 13 cm, gradientes de pH 3-10L).

Etapa	Voltagem (V)	Volts-Hora	Tempo (hs) *
1	500	500	1
2	1000	1000	1
3	8000	16000	Variável (4-7 hs) *

*O tempo consumido para atingir esta voltagem depende da natureza da amostra.

Segunda dimensão: SDS-PAGE

Preparo do gel de poliacrilamida 12,5%.

Para aplicar tiras de IPG de 13 cm de comprimento, foram preparados geis em placas de 18x16 cm com espaçadores de 1,5 mm de espessura e 1 cm de largura.

Tabela 3.11: Reagentes e proporções necessários para preparar 100 mL de gel de poliacrilamida 12,5%. Esta preparação é suficiente para a obtenção de 2 géis.

Reagente	Volume (gel 12,5%)
Solução de acrilamida/bisacrilamida (solução E ,	41,7 mL
Tampão de resolução (solução F)	25 mL
Solução de SDS 10% (solução G)	1 mL
Água deionizada	31,8 mL
Persulfato de amônia 10% (50 mg em 0,5 mL) (solução H)	0,5 mL
TEMED	50 µL

Para favorecer a polimerização rápida, os primeiros quatro reagentes foram misturados e deareados em ultrassom. Depois disto, foram adicionados o persulfato de amônio e o TEMED. A solução foi mantida em agitação por uns minutos antes de aplicar. Esta solução foi aplicada entre as placas de vidro de maneira que restasse cerca de 1 cm sem ser preenchido. Após isto, uma solução butanol/água (1:1) é aplicada sobre a superfície para evitar a formação de bolhas e proporcionar nivelamento ao gel. Esta solução deve ser retirada momentos antes da aplicação do *strip*.

Equilibração das tiras.

Antes de serem aplicadas ao gel as tiras são submetidas a um tratamento com DTT e iodoacetamida no tampão de equilíbrio (solução **D**) para reduzir as pontes de dissulfeto das proteínas e alquilar os grupos tiois, evitando assim processos de re-oxidação durante o experimento de eletroforese.

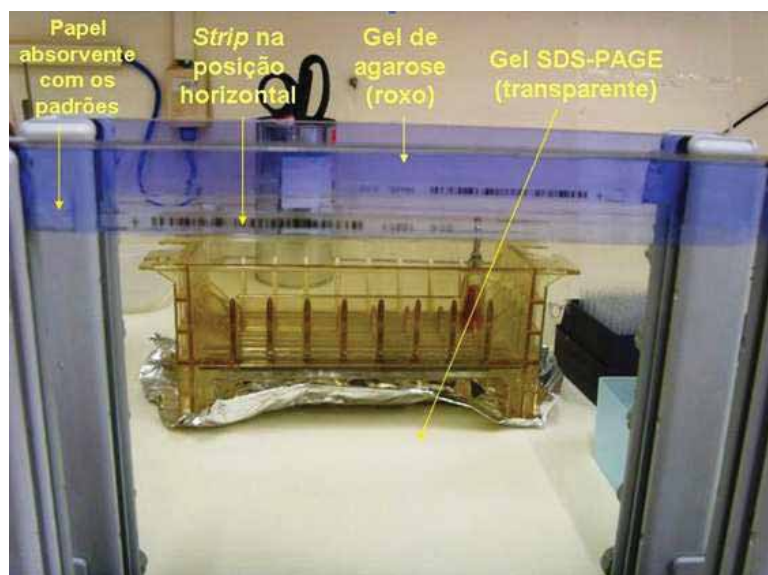
1. Adicionou-se a cada tira em um tubo tampado, 10 mL de tampão de equilíbrio (solução **D**) contendo 100 mg de DTT. A tira foi mantida sob agitação nessa solução por 15 minutos.
2. Essa solução foi descartada e trocada por 10 mL de tampão de equilíbrio contendo 250 mg de iodoacetamida. A tira foi mantida nessa solução por no mínimo 15 minutos, sob agitação.

Aplicação das tiras e desenvolvimento da SDS-PAGE

5 μ L da solução estoque dos padrões de peso molecular foram dissolvidos em 20 μ L de água deionizada e aplicados em papel absorvente quadriculados, o qual foi colocado à esquerda do gel, próximo ao extremo ácido do *strip*. Os padrões de peso molecular utilizados estão descritos na tabela 3.12. O *strip* foi colocado com o extremo ácido (+) em contato com o papel e em contato com o gel. Após isso, o gel foi selado com solução de agarose (**solução K**), suficiente para preencher as placas até a superfície (Figura 3.6).

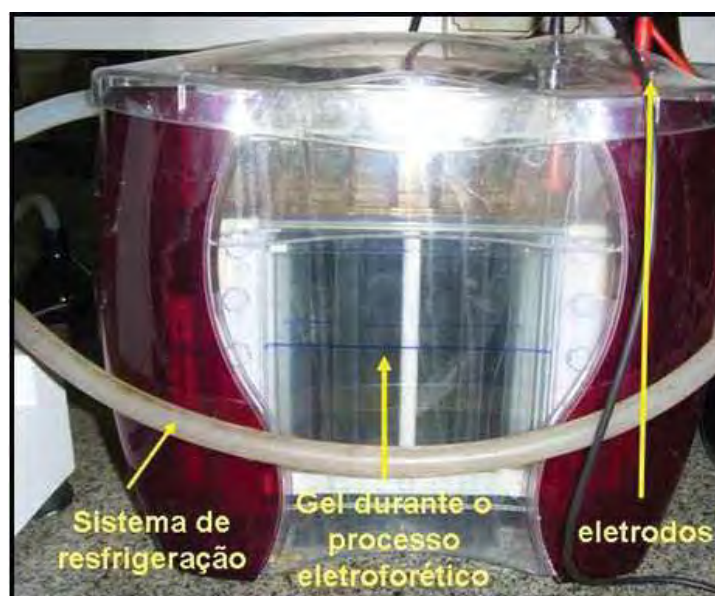
Tabela 3.12: Padrão protéico utilizado no experimento de eletroforese e suas respectivas massas moleculares (em KDa)

Proteína	massa molecular (KDa)
fosforilase	97,4
albumina sérica	66,2
ovalbumina	45,0
anidrase carbônica	31,0
inibidora de tripsina	21,5
α -lactalbumina	14,4

Figura 3.6: Montagem do sistema para experimento de eletroforese bidimensional

(Foto: Fernando Cotinguiba)

A placa contendo o gel foi transferida para a cuba de eletroforese (SE 600 Ruby system – Figura 3.7) previamente refrigerada em 10-12°C, previamente preenchida com 4 litros de tampão de corrida (solução F). Aplicou-se uma corrente de 45 mA por gel, com voltagem máxima em 600 V. A corrente foi interrompida quando o azul de bromofenol migrou até 0,5 cm da parte inferior do gel. O sistema foi refrigerado a uma temperatura de 10-12°C.

Figura 3.7: Cubo eletroforético para experimento de eletroforese bidimensional

(Foto: Fernando Cotinguiba)

2.4. Revelação do gel com Comassie Brilliant Blue G-250 (CELEDON et al., 2007)

Solução estoque

20 g de ácido fosfórico e 100 g de sulfato de amônio foram dissolvidos em 800 mL de água. Adicionou-se 1 g de Comassie sob agitação e posteriormente completou-se o volume até 1 litro. Esta solução deve ser preparada no mínimo 24 horas antes de ser utilizada e não é necessário filtrá-la. Pode ser estocada a temperatura ambiente durante várias semanas.

Preparação da solução reveladora

A solução reveladora é obtida após a mistura de 80% (v/v) da solução estoque de Comassie Brilliant Blue e 20% (v/v) de metanol e mantida sob agitação. Esta mistura deve ser preparada antes do início da revelação.

Processo de revelação do gel com Comassie

A etapa de revelação deve ser realizada a temperatura ambiente e o gel deve ser mantido em compartimentos de vidro ou de plástico próprios para revelação de géis. A baixa qualidade de plásticos pode interferir na caracterização das proteínas por Espectrometria de Massas.

1. O gel foi fixado com 40 % (v/v) etanol, 10 % (v/v) ácido acético glacial por cerca de 1 hora;
2. O gel foi lavado com água 2x 10 minutos;
3. Aplicou-se a solução de *Comassie* até cobrir totalmente o gel e a revelação seguiu durante uma noite;
4. Transferiu-se o gel para um recipiente com uma solução 1% (v/v) de ácido acético;
5. O gel foi lavado até que as partículas de *Comassie* obter-se uma boa resolução dos spots e o gel incolor;
6. O gel foi digitalizado e analisado no programa Image Master 5.0 - Amersham Bioscience, onde foram atribuídos dados de ponto isoelétrico (pI) e massa molecular aparente (M_r) aos *spots*.

2.5. Preparo de amostra para identificação por espectrometria de massas (CELEDON et al., 2007)

Retirada do spot ou banda

A região do gel, contendo as proteínas (*spot* ou banda) foi extraída, com um bisturi, e cortada em segmentos de aproximadamente 1 mm³ e colocadas em tubos tipo eppendorf e armazenadas em 1% ácido acético a 4°C.

Remoção do corante

Os segmentos de gel foram lavados três vezes em uma solução contendo 50% (v/v) de acetonitrila (ACN) e 25 mM de bicarbonato de amônio (AMBIC) por 30 min, (até o gel ficar incolor). Posteriormente as amostras são desidratadas, duas vezes, em 100% ACN por 10 min. (o gel deve ficar branco). A acetonitrila deve ser removida e o resíduo remanescente do gel é evaporado à temperatura ambiente.

Redução e alquilação

Os fragmentos de gel foram reidratados e reduzidos em DTT (20 mM DTT/ 50 mM AMBIC) a 56°C por 40 minutos e alquilados com iodoacetamida (55 mM IAA / 50 mM AMBIC) no escuro por 30 minutos. A iodoacetamida deve ser removida e os fragmentos lavados em 25 mM AMBIC e posteriormente desidratados em 100% de ACN. A acetonitrila deve ser escartada e o resíduo remanescente no gel é deixado evaporar à temperatura ambiente.

Digestão das proteínas

Os fragmentos de gel foram reidratados com 15 µL de solução contendo 150 ng de tripsina em 25 mM de AMBIC. Após 15 minutos adicionou-se 25 mM de AMBIC até cobrir os *spots* e manteve-se a 37°C por 14 horas. A ação da tripsina foi interrompida pela adição de 15 µL de solução bloqueadora (50% v/v acetonitrila e 5% v/v ácido fórmico).

Extração dos peptídeos

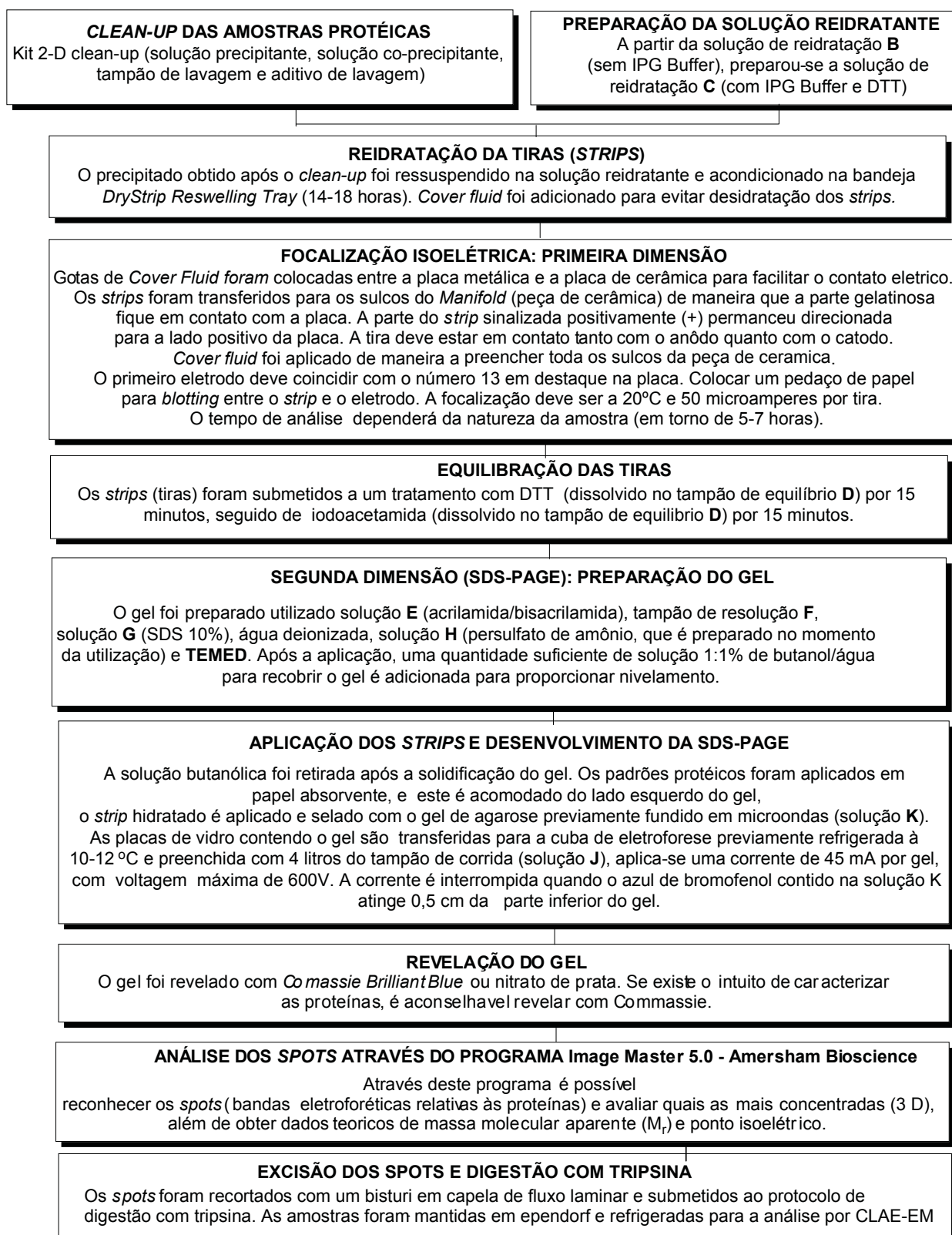
Os peptídeos foram eluídos da acrilamida com três lavagens de 15 minutos com solução de eluição (50% v/v ACN e 1% v/v ácido fórmico) e duas lavagens com ACN 100% a 40°C sob sonicação. A solução contendo os peptídeos extraídos foi submetida à secagem em um concentrador tipo Speed Vac (Thermo Scientific). Após a secagem os peptídeos foram ressuspensos em 12 µL de ácido fórmico 1% (v/v), para posteriormente armazenamento.

2.6. *Clean-up* das misturas de peptídeos para Espectrometria de massas (ESI-MS/MS) utilizando ZipTips

Antes da análise MS/MS, as misturas de peptídeos foram purificadas utilizando minicolumnas ZipTips (C₁₈) e soluções de acetonitrila (0,1% TFA/água MilliQ); água MilliQ (0,1% TFA/água MilliQ) e metanol a 5% (0,1% TFA/água MilliQ).

O fluxograma a seguir mostra a sequência/resumo de metodologias utilizadas desde a obtenção da amostra protéica até a preparação para análise por CLAE-EM.

Fluxograma 3.1: resumo de metodologias utilizadas desde a preparação da amostra até a preparação de amostras para análise por CLAE-EM



2.7. Análise por CLAE-EM (CELEDON et al., 2007)

Esta parte do trabalho foi realizada no Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas, Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, supervisionado pelo Prof. Dr. Carlos Alberto Labate.

As misturas de peptídeos foram analisadas por cromatografia líquida utilizando um Cap-LC acoplado a um espectrômetro de massa Q-TOF Ultima API (Waters, Inglaterra). Dez microlitros de cada amostra foram injetados em uma pré-coluna (C_{18} , 5 μ m, 5 X 30 mm, Waters®) para pré-concentração e dessalinização. Em seguida os peptídeos foram separados em uma segunda coluna (Symmetry C_{18} , 5 μ m, 32 X 150 mm, Waters®). Os peptídeos foram eluídos utilizando um gradiente linear de 10-45% do solvente B (95% v/v ACN, 0,1% v/v FA em água), com fluxo de 5 mL/min para os primeiros 15 min., em seguida, alterando para 2 mL/min para os 25 minutos seguintes, e retornando para 5 mL/min nos últimos 5 min. O solvente A utilizado foi (5% v/v ACN e 0.1% v/v de FA em água). Todas as análises em EM foram realizadas utilizando o modo de íon positivo a tensão de 3 kV. A faixa de massa foi definida entre m/z 300 e 2000, e os espectros de MS/MS foram adquiridos para os picos mais intensos, com no mínimo 15 pontos.

2.8. Tratamento de dados no programa MASCOT

Os dados obtidos da análise por Espectrometria de Massas foram tratados utilizando o programa MASCOT, seguindo uma sequência de parâmetros, acessando o link: http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS.

O MASCOT (www.matrixscience.com) é uma ferramenta informática que compara os dados das análises de espectrometria de massas e um banco de dados de proteínas conhecidas e determina os conjuntos mais prováveis. O programa tem três modos de pesquisa principais: *Mass Fingerprint Peptide*, *Query Sequence*, e pesquisa de íons *MS/MS*. Esta última opção é utilizada para analisar dados experimentais de espectrometria de massa em *tandem*. Para cada combinação de peptídeos, o MASCOT fornece um índice de proteína, denominado **protein score**, $[-10 \cdot \log(P)]$, onde P é a probabilidade de que o conjunto de peptídeos identificados seja observado em um evento randômico. Valores de *protein score* acima de 60 são significativos ($p < 0.05$) e quanto maiores estes valores, mais confiáveis os resultados. Os valores de **massa molecular relativa** (M_r) e **ponto isoelétrico** (pI) também são fornecidos e estes valores podem ser comparados aos obtidos experimentalmente. Se o valor de *protein score* para a identidade proteína é de alta confiança, mas as massas não forem iguais, isso pode evidenciar uma modificação pós-translacional ou evento de clivagem. A medida **total ion score** fornece a informação de quão bem o espectro MS/MS fornece a identidade da combinação dos peptídeos. O limite de confiança para *total ion score* é o mesmo que para o *protein score*. O valor indica a probabilidade de que o conjunto observado entre espectros MS/MS e a sequência peptídeo

pertencam à mesma proteína/peptídeo. A identidade da proteína (**ID**) é dada pelo número **gi** (genInfo identifier) que é um número único e inteiro que identifica uma sequência exata particular. Se uma sequência no GenBank é modificada, até mesmo por um único par de bases, o número **gi** novo é atribuído à sequência de atualização. A **cobertura** (*protein coverage*) indica o percentual de resíduos em cada sequência de proteínas que foi identificada, quando comparada ao peptídeo do banco.

2.9. Complementação de informações utilizando o banco de dados UniProt

UniProt é um banco de dados abrangente, de alta qualidade e de acesso livre, contendo sequências de proteínas e informações funcionais, muitos dos quais são derivados de projetos de sequenciamento do genoma. O objetivo é fornecer todas as informações relevantes sobre uma proteína particular. Sequências do mesmo gene e da mesma espécie são mescladas na entrada do mesmo banco de dados. As diferenças entre as sequências são identificadas e documentadas. As principais informações obtidas sobre estas proteínas são:

- nome da proteína e gene;
- função;
- informações específicas como atividade catalítica, cofatores e resíduos catalíticos
- localização subcelular;
- Interações proteína-proteína;
- padrão de expressão;
- locais e os papéis de domínios significativos;
- íon, substrato e cofator de ligação.

Baseado nesses dados as proteínas podem ser classificadas em diversos grupos. O mais habitual é realizar uma categorização ontológica levando em consideração a principal função da proteína: processo biológico (**PB**), função molecular (**FM**) e componente celular (**CC**).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Análise proteômica

A primeira etapa realizada no estudo proteômico foi a obtenção de frações enriquecidas em microssomos, que são vesículas obtidas principalmente após a fragmentação do retículo endoplasmático. A proposta inicial era analisar a existência e diversidade de enzimas oxidoredutases do tipo citocromo P450, além de outras enzimas, que atuam em diversas etapas da biossíntese de fenilpropanóides. Após a etapa de obtenção desta fração protéica, foi realizada a quantificação do teor protéico pelo método de Bradford, seguida da análise por eletroforese monodimensional (SDS-PAGE) e bidimensional (IEF/SDS-PAGE), obtendo-se então os géis com centenas de *spots*. Estes *spots* foram excisados, digeridos com tripsina, purificados e analisados por Espectrometria de Massas (ESI-Q-ToF). Os dados obtidos foram submetidos a comparação com o banco de dados do programa MASCOT. Informações adicionais sobre as proteínas identificadas foram obtidas através do banco de dados UniProt.

Em tecidos vegetais, a presença da uma parede celular proporciona um impedimento físico para a extração de proteínas. Foi utilizado tratamento com nitrogênio líquido para quebrar fisicamente a forte parede celular. Sob a temperatura de frio extremo de nitrogênio líquido (-78°C), a parede celular torna-se frágil e, posteriormente com auxílio de pistilo e almofariz, pode-se romper mecanicamente a parede celular, facilitando consequentemente a extração de proteínas (SHIM et al., 2010).

A escolha do tampão extrator é uma importante etapa no processo de obtenção de extratos enzimáticos para reações *in vitro* e análise do proteoma vegetal por eletroforese mono e bidimensional. Foram testados três protocolos no intuito de avaliar o poder extrator: Tris-HCl (sem detergentes), Tris-HCl (com detergentes) e fosfato de sódio. Dentre estes, o mais efetivo em relação à extração protéica foi o tampão fosfato de sódio obtendo-se concentração de 1156 µg/mL, seguindo-se o protocolo proposto por Durst (1996). Folhas e frutos jovens de *P. tuberculatum* foram coletados de um indivíduo localizado no Instituto de Química – UNESP, no mês de maio de 2009, lavadas em água corrente e submetidas ao processo de extração protéica. Os extratos protéicos foram submetidos a processos de *clean-up* e concentração utilizando um kit comercial, e em seguida, à eletroforese bidimensional: as proteínas foram separadas primeiramente por migração diferencial, com base no ponto isoelétrico de cada proteína (IEF) e posteriormente por massa molecular (SDS-PAGE), obtendo-se assim um gel com diversos pontos protéicos, ou *spots*. Com auxílio de um bisturi, realizou-se a excisão manual destes *spots*, totalizando 49, provenientes de folhas e 24 das sementes (Figuras 3.8 e 3.9). Foi analisado paralelamente, o proteoma de folhas de *P. crassinervium*, que é uma espécie que acumula principalmente derivados do ácido benzóico como metabólitos secundários.

Figura 3.8: Proteínas das folhas de *P. tuberculatum*: Ampliação do gel mostrando acúmulo de *spots* entre os pontos isoelétricos (pI) 4-8 e massa molecular aparente (M_r) 14000 kDa e 90000 kDa.

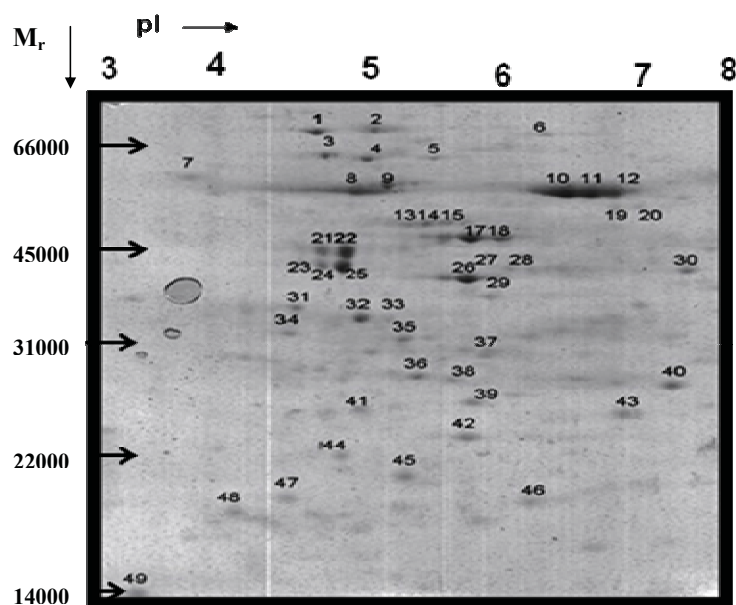
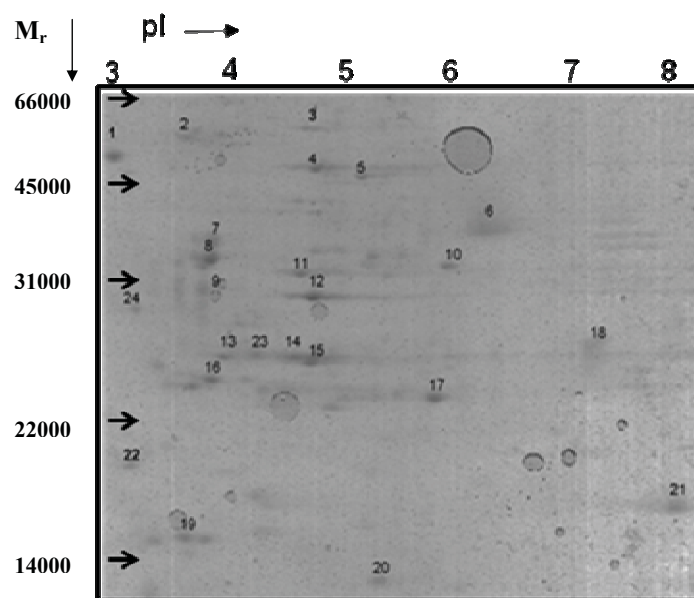


Figura 3.9: Proteínas das sementes de *P. tuberculatum*: Ampliação do gel mostrando acúmulo de *spots* entre os ponto isoelétricos 3-8.



A partir de uma inspeção da digitalização dos géis, percebe-se a diversidade de *spots* no intervalo entre 14-90 kDa (Figuras 3.8 e 3.9) e que a quantidade de pontos no gel referente ao extrato de folhas é maior do que a de sementes. Isto pode ser explicado pelo fato da maquinaria enzimática existente nas folhas ser mais complexa, especialmente pelas maiores concentrações de enzimas envolvidas nos processos de assimilação de CO₂ (fotossíntese) e metabolismo primário. Mas se considerado o acúmulo de metabólitos secundários, existe equilíbrio entre o número de substâncias identificadas nas folhas e sementes (COTINGUIBA et al., 2009; NAVICKIENE et al., 2000). Diante do exposto, é possível observar que os extratos protéicos de sementes podem ser uma alternativa interessante para futuros estudos de compartimentalização de proteínas envolvidas no metabolismo secundário em *P. tuberculatum*. A análise permitiu observar uma série de *spots* localizados entre pI 4-7 e M_r (massa molecular aparente) 20-80 kDa. Qualquer tentativa de identificação de uma proteína baseada somente na comparação entre os dados de pI e M_r experimentais com os descritos na literatura fornecerá apenas sugestões. A utilização da Espectrometria de Massas pode então confirmar a identidade destas.

As proteínas foram excisadas do gel, digeridas com tripsina e analisadas por ESI-Q-ToF, produzindo assim um *fingerprint* de massas de peptídeos. Após tratamento dos dados através do programa MASCOT, obteve-se a identidade putativa de diversas proteínas (tabela 3.13).

Tabela 3.13: Proteínas de *P. tuberculatum* e *P. crassinervium*: identificação com o Número do Spot, Protein Score, Ion Score, Sequência de Peptídeos, Número de Entrada no Banco de Dados (NCBI), Identidade da Proteína, Massa Molecular e pI literatura, Massa Molecular e pI experimental, cobertura (%), ontologia, localização celular, acesso (UniPROT).

Spot	Protein Score	Total Ion Score	Sequencia de todos os peptídeos identificados	ID (NCBI)	proteína	espécie	massa molecular (kDa) / pI literatura	Massa molecular (kDa) / pI experimental	cobertura (%)	ontologia	localização celular	acesso
Piper tuberculatum (folhas)												
1	97	45	AVVTVPAYFNDSSQ R	gi 24638460	heat shock protein 70	Cucumis sativus	75480 5.15	76250 4.81	4	Processo biológico (resposta a estresse)	Citoplasma/ núcleo	P22953
3	224	111	SLDIERPTYTNLNR	gi 6094431	α-3-tubulina	Hordeum vulgare	50193 4.95	62256 4.90	11	componente celular	citoesqueleto	P08841
4	41	41	VIDEIRER	gi 3763925	Proteína de ligação/ clatrina (epsina)	Arabidopsis thaliana	30781 9.30	60320 5.1	2	Processo biológico (transporte)	Complexo de Golgi/citoplasm a/vesicular citoplasmática	Q8VY07
5	61	61	GVEELADAVR		GroEL-like chaperona,	Vitis vinifera	61673 5.85	61293 5.52	1	Processo biológico (resposta a estresse)	mitocondria	Q8L7B5
6	63	63	GGLDFTKDDENVN SQPFMR	gi 15148424	Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase	Cardiandra alternifolia	52416 6.08	71480 6.32	6	Processo biológico (Ciclo de Calvin)	Plastídio (cloroplasto)	Q0INY7
7	58	58	DTDILAAFR	gi 8096541	Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (subunidade grande)	Solanum lycopersicum	53398 6.55	54825 3.89	6	Processo biológico (Ciclo de Calvin)	Plastídio (cloroplasto)	Q0INY7
8	177	117	DITLGFVDLLRRDF IEQDR	gi 169563	Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (subunidade grande)	Solanum tuberosum	53371 6.19	51615 4.97	11	Processo biológico (Ciclo de Calvin)	Plastídio (cloroplasto)	Q0INY7
9	341	124	IFNVLGEPVDNLG PVDTR	gi 52082860	ATPase (subunidade β)	Piper hispidum	50620 5.04	51980 5.26	20	Processo biológico (transporte de hidrogenio)	Membrana do vacúolo	P11574

10	441	130	KIEDAVDSAISWLD SNQLAEVDEFEDK	gij242054931	Proteína hipotética SORBIDRAFT_03g0393 60	<i>Sorghum bicolor</i>	71261 5.10	52456 6.15	27	-	-	-
11	111	79	VALEACVKAR	gij169563	Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase	<i>Solanum tuberosum</i>	53371 6.19	52677 6.65	11	Processo biológico (Ciclo de Calvin)	Plastídio (cloroplasto)	Q0INY7
12A	-	-	-	-	Nenhuma identidade significante	-	-	-	-	-	-	-
12B	141	78	VALEACVKAR	gij349144	Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (subunidade grande)	<i>Solanum lycopersicum</i>	53398 6.55	52744 6.92	12	Processo biológico (Ciclo de Calvin)	Plastídio (cloroplasto)	Q0INY7
13	55	55	VALEACVKAR	gij1352794	Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (subunidade grande);	<i>Harpagophytum grandidieri</i>	52139 6.23	46612 5.33	6	Processo biológico (Ciclo de Calvin)	Plastídio (cloroplasto)	Q0INY7
14	191	135	AAQDIALAELAPTH PIR	gij1345588	Proteína 14-3-3-like	<i>Saccharum</i> (hybrid cultivar CP65-357)	28978 4.79	46447 5.52	22	Processo biológico (resposta a estresse)	Membrana plasmática, citossol, núcleo	Q96299
17	279	96	IVDSFPGQSIDFFG ALR	gij10720247	Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase	<i>Oryza sativa Japonica</i>	50897 8.61	43219 5.74	12	Processo biológico (Ciclo de Calvin)	Plastídio (cloroplasto)	Q0INY7
18	131	105	IVDSFPGQSIDFFG ALR	gij10720247	Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase	<i>Oryza sativa Japonica</i>	48055 5.85	43226 5.91	6	Processo biológico (Ciclo de Calvin)	Plastídio (cloroplasto))	Q0INY7
19	-	-	-	-	Nenhuma identidade significante	-	-	-	-	-	-	-

27	39	39	ELGIGIVPYSPIGR	gi 78708648	Proteína de indução de auxina	<i>Oryza sativa</i>	37905 5.81	37698 5.76	4	Processo biológico (sinalização)	núcleo	Q9ZTX8
28	152	72	SGPLQPGVDIIEGP VK	gi 132270	Proteína do fator de alongamento da borracha	<i>Hevea brasiliensis</i>	14713 5.04	36441 6.10	42	componente celular	citoplasma	P15252
29	60	60	ILFIGGTGYIGK	gi 1708422	Isoflavona redutase	<i>Solanum tuberosum</i>	33831 6.16	32566 5.92	3	Função molecular (oxidoredutase)	-	Q00016
30	193	124	VAVLGAAGGIGQP LALLMK	gi 126896	Malato desidrogenase	<i>Citrullus lanatus</i>	36406 8.88	36711 7.40	10	Função molecular (oxidoredutase)	Plastídio (cloroplasto)	P17606
36B	-	-	-	-	Nenhuma identidade significativa	-	-	-	-	-	-	-
37	185	135	AAQDIALAELAPTH PIR	gi 1345588	Proteína 14-3-3-like	<i>Sugar cane</i> [Saccharum hybrid cultivar CP65-357]	28978 4.79	28619 5.81	16	Processo biológico (resposta a estresse)	Membrana plasmática, citosol, núcleo	Q96299
38	50	50	ADVDNKESVGK	gi 1345588	RNA polimerase IV (segunda grande unidade)	<i>Rhododendron macrophyllum</i>	116144 8.98	27455 5.71	1	Processo biológico (transcrição)	núcleo	Q9LK40
44	45	45	LSGEVDANKAEVK	gi 159487461	Proteína 2 – cromossomo de manutenção estrutural	<i>Chlamydomon as reinhardtii</i>	128165 6.66	23389 4.92	1	Processo biológico (divisão celular)	núcleo	Q9C5Y4
45	54	54	IWHHTFYNELR	gi 3219759	Actina	<i>Glycine max</i>	41796 5.23	21742 5.32	2	componente celular	citoesqueleto	Q96292
46	82	58	SGPLQPGVDIIEGP VK	gi 132270	Proteína do fator de alongamento da borracha	<i>Hevea brasiliensis</i>	14713 5.04	18613 6.10	19	componente celular	citoplasma	P15252
47	222	119	LPTDETLVAQIK	gi 162458009	Fator 5A – Iniciação da tradução eucariótica	<i>Zea mays</i>	17714 5.61	19100 4.63	34	Processo biológico (síntese de proteínas)	-	Q76E23
Piper tuberculatum (sementes)												
S2	190	91	TVLIMELINNIK	gi 6687280	ATP sintase	<i>Codonopsis</i>	53628	57186	15%	Processo	Membrana do	P11574

					(subunidade β)	<i>pilosula</i>	5.07	5.10		biológico (transporte de hidrogenio)	vacuolo	
S4	46	46	LKLELAQFAELQA FAQFASALDK	gij 51556908	ATP sintase (subunidade α)	<i>Elymus sibiricus</i>	55549 6.03	55566 6.12	4%	Processo biológico (transporte de hidrogenio)	Membrana do vacuolo	P11574
S6	404	148	DNLTLTWTSIDED PAEEIR	gij 195635799	Proteína 14-3-3-like (GF14-6)	<i>Zea mays</i>	30985 4.84	42255 7.82	20%	Processo biológico (resposta a estresse)	Membrana plasmática, citossol, núcleo	Q96299
S7	137	83	ELAAQPDVDGFLV GGASLKPEFIDIIN AATVK	gij 195605636	triosefosfato isomerase	<i>Zea mays</i>	27278 5.53	35125 5.32	28%	Função molecular (gliconeogênese)	citoplasma	P48491
S9	205	114	SSITPGTVLILLAG R	gij 195605226	proteína L6 60S ribossomal	<i>Zea mays</i>	24273 10.14	30158 5.42	11%	Função molecular (proteína ribossomal)	-	Q9C9C5
S10	127	127	AMVPVAEVNVPV GGHAGITILPLFSQ ATPK	gij 224061310	Não identificada	<i>Populus trichocarpa</i>	35704 8.53	35732 7.38	9%	-	-	-
S12	-	-	-	-	Nenhuma identidade significante	-	-	-	-	-	-	-
S19	-	-	-	-	Nenhuma identidade significante	-	-	-	-	-	-	-
S20	-	-	-	-	Nenhuma identidade significante	-	-	-	-	-	-	-
S24	-	-	-	-	Nenhuma identidade significante	-	-	-	-	-	-	-
S25	-	-	-	-	Nenhuma identidade significante	-	-	-	-	-	-	-
Piper crassinervium (folhas)												
10	184	123	VTPQPGVPPEEAG AAVAAESSTGTWT TVWTDGLTSLDR	gij 2791317	Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase	<i>Amphidasya ambigua</i>	53843 6.20		13%	Processo biológico (Ciclo de Calvin)	Plastídio (cloroplasto)	Q0INY7
11	390	127	VIILDMVVGTGSSS DEK	gij 262285780	Proteína O- metiltransferase-like	<i>Saccharum</i> (cultivar)	39584 5.58		22%	Função molecular	-	F4IB88

						hibrido CP72-1210)				(metiltransferase)		
12	78	78	VLMSAALSTELR	gi 62701693	proteína L24 ribossomal	<i>Oryza sativa</i>	15641 11.16		8%	Função molecular (proteína ribossomal)	-	Q42347
13	151	88	VALEACVKAR	gi 1352794	Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (subunidade grande)	<i>Tocoyena pittieri</i>	40439 8.12		9%	Processo biológico (Ciclo de Calvin)	Plastídio (cloroplasto)	Q0INY7
14	159	89	VTPOPGVPPEEAG AAVAAESSTGTWT TVWTDGLTSLDR	gi 349144	Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (subunidade grande)	<i>Solanum lycopersicum</i>	53398 6.55		17%	Processo biológico (Ciclo de Calvin)	Plastídio (cloroplasto)	Q0INY7
19	74	74	VALEACVKAR	gi 1352794	Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (subunidade grande)	<i>Harpagophytum grandieri</i>	52139 6.23		6%	Processo biológico (Ciclo de Calvin)	Plastídio (cloroplasto)	Q0INY7
20	133	119	LGPNYMLPVNAP K	gi 14888544	catalase	<i>Litchi chinensis</i>	34077 6.79		9%	Processo biológico	-	F4JM86
21	90	78	IIGLSVDSSGKPAL R	gi 255550796	Glicina desidrogenase	<i>Ricinus communis</i>	115779 6.57		3%	Função molecular	-	Q42350
22	130	88	IINEPTAAAIAYGLD K	gi 242090773	proteína hipotética SORBIDRAFT_09g022580	<i>Sorghum bicolor</i>	71357 5.13		10%	-	-	-
23	60	41	VALEACVKAR	gi 349144	Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (subunidade grande)	<i>Solanum lycopersicum</i>	53398 6.55		4%	Processo biológico (Ciclo de Calvin)	Plastídio (cloroplasto)	Q0INY7
28	80	79	WSPELAAACEVW K	gi 1448981	Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase	<i>Darlingtonia californica</i>	40464 8.40		10%	Processo biológico (Ciclo de Calvin)	Plastídio (cloroplasto)	Q0INY7
29	135	68	VALEACVKAR	gi 349144	Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase	<i>Solanum lycopersicum</i>	53398 6.55		12%	Processo biológico (Ciclo de Calvin)	Plastídio (cloroplasto)	Q0INY7
30	173	100	TVTAMDVVYALK	gi 195635409	histona H4	<i>Zea mays</i>	20120		19%	Componente	Núcleo e	P59259

							9.68			celular	cromossomos	
31	65	65	TVTAMDVVYALK	gi 51315744	histona H4	<i>Triticum aestivum</i>	11329 11.33		19%	Componente celular	Núcleo e cromossomos	P59259
32	140	131	EAVNVSLGNLLTY PFVR	gi 1168740	Anidrase carbônica	<i>Flaveria linearis</i>	20971 6.21		18%	Processo biológico	Plastídio (estroma)	P27140
37	158	120	AAQDIALAELAPTH PIR	gi 1345588	Proteína 14-3-3-like	<i>Saccharum</i> (Cultivar híbrido CP65-357)	28978 4.79		11%	Processo biológico (resposta a estresse)	Membrana plasmática, citosol, núcleo	Q96299
38	51	51	VFFDMTVGGQPA GR	gi 118489052	desconhecida	<i>Populus trichocarpa</i> x <i>Populus deltoides</i>	18307 8.71		8%	-	-	-
40	47	47	VFFDMTVGGQPA GR	gi 119367479	Ciclofilina-like	<i>Citrus</i> (cultivar híbrido)	18307 8.71		8%	Função molecular (isomerase)	Membrana plasmática/Complexo de Golgi	Q9C835

Grande quantidade de informações foram obtidas para cada *spot* através do programa MASCOT. Para exemplificar, tomou-se o *spot 9* (identidade: subunidade β da ATPase) obtido a partir da fração protéica das folhas de *P. tuberculatum*. Os valores para *protein score* e *total ion score* são de 341 e 124 respectivamente, o que torna a identidade da proteína bastante confiável. Além destes dois parâmetros, comparou-se também os valores de massa molecular relativa (M_r) (50620 kDa - literatura e 51980 kDa – experimental) e ponto isoelétrico (5.04 – literatura e 5.26 – experimental), sendo ambos valores muito próximos. Além disto, a sequência identificada cobre 20% (cobertura/ protein coverage) em relação a proteína com a qual foi a comparação.

O *spot 14*, foi identificado como proteína 14-3-3-like, devido aos valores altos obtidos para *protein score* e *total ion score*, que são de 191 e 135, respectivamente. Os valores para *protein coverage* (cobertura) fornecido foi 22, que é bastante expressivo. No entanto, a comparação entre os valores de massa molecular relativa (M_r) (28978 kDa - literatura e 46447 kDa – experimental) e ponto isoelétrico (4.79 – literatura e 5.52 – experimental) apresentaram diferenças consideráveis. Dentre as possíveis causas que expliquem tais diferenças podem ser citadas as modificações pós-traducionais das proteínas (glicosilação, por exemplo), clivagem da proteínas durante alguma etapa experimental, ou até a possibilidade de serem proteínas com identidade em alguma sequência aminoácídica, porém diferentes em tamanho e funcionalidade biológica.

Diversas proteínas foram classificadas como proteínas hipotéticas/ ou sem identificação, justamente por não mostrarem semelhança estrutural com nenhuma outra cadastrada no banco de dados, sugerindo deste modo, que estas tenham função característica e sejam particulares das espécies, ou mesmo que sejam proteínas com função ainda não reconhecida em plantas-modelos muito estudadas, como *A. thaliana*, *Zea mays* e *Oryza sativa*.

O elenco de proteínas identificadas em *P. tuberculatum* e *P. crassinervium* e suas funções serão descritas a seguir:

As **chaperonas** (*spot 5* – folhas de *P. tuberculatum*) são proteínas que atuam na sinalização/transporte de proteínas com desempenho comprometido para o proteossomo (degradação de proteínas) e auxiliam as proteínas recém-sintetizadas a atuarem corretamente. Além de promover o adequado funcionamento de proteínas, são importantes também para proteger as células contra os efeitos de altas temperaturas, especialmente em condições que possam causar o desnaturamento das mesmas (SANTORO, 2000). O aumento de temperatura induz rapidamente o aumento na síntese de chaperonas, permitindo assim a manutenção da atividade de outras proteínas. Estas atividades são importantes para o sistema de reparação e recebem o nome de “resposta ao estresse celular” ou “resposta ao choque térmico”. Devido a este motivo, chaperonas são frequentemente chamadas de **proteínas de choque térmico (Heat shock protein - HSP)** (*spot 1* – folhas de *P. tuberculatum*) (SMITH et al., 2009). HSPs são encontrados em

praticamente todos os organismos vivos, desde bactérias até os seres humanos (WU, 1995). Estas proteínas são nomeadas de acordo com seu peso molecular, assim as HSP60, HSP70 e HSP90 referem-se a famílias de proteínas de choque térmico da ordem de 60, 70 e 90 kDa, respectivamente (SRIVASTAVA, 2002). O aumento da concentração de proteínas de choque térmico também pode ser desencadeada pela exposição a diferentes tipos de condições de estresse ambiental, tais como infecções, inflamações, exposição da célula a toxinas (etanol, arsênio, metais, luz ultravioleta, entre outros), hipóxia, deficiência de nitrogênio ou privação de água. Algumas proteínas da família HSP são expressas de baixos a moderados níveis, em todos os organismos, devido ao seu papel essencial na manutenção da estrutura protéica, ou seja, podem ser expressas em condições não-estressantes, simplesmente para o monitoramento das outras proteínas celulares. Diversas pesquisas investigam o papel das HSPs em conferir tolerância ao estresse em plantas híbridas para a agricultura (VINOCUR e ALTMAN, 2005).

As **tubulinas/TUA3** (spots 3 e 4 – folhas de *P. tuberculatum*) são membros de uma família de pequenas proteínas globulares. Os membros mais comuns da família da tubulina são α -tubulina e β -tubulina, proteínas que compõem os microtúbulos. Cada uma tem um peso molecular de aproximadamente 55 kDa. Os microtúbulos são montados a partir de dímeros de α -e β -tubulina e possuem papel fundamental na estruturação celular. Estas subunidades possuem ponto pl ligeiramente ácido, entre 5,2 e 5,8 (WILLIAMS et al., 1999). Em humanos, as tubulinas são alvos de drogas anticâncer, como taxol, tesetaxel e os “alcalóides de vinca”, como a vinblastina e vincristina.

A **clatrina** (spot 4 - folhas de *P. tuberculatum*) é uma proteína que media o processo de endocitose em plantas, animais e leveduras. A endocitose é um mecanismo crucial que permite que as células eucarióticas possam internalizar materiais extracelulares e da membrana plasmática, e é necessário para uma grande variedade de processos celulares em organismos unicelulares e multicelulares.

A **ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxigenase** (diversas isoformas identificadas em nas folhas de *P. tuberculatum* e *P. crassinervium*), mais comumente conhecida pelo nome **RuBisCO**, é uma enzima envolvida no ciclo de Calvin que catalisa o primeiro grande passo de fixação de carbono atmosférico, um processo pelo qual as moléculas de dióxido de carbono são disponibilizadas para os organismos fotossintetizantes sob a forma de moléculas energéticas, como a glicose. A RuBisCO catalisa tanto a carboxilação quanto a oxigenação da ribulose-1,5-bifosfato (também conhecido como RuBP) com dióxido de carbono ou oxigênio (PORTIS e PARRY, 2007). A RuBisCO é muito importante em termos de impacto biológico, pois catalisa a principal reação química pela qual o gás carbônico é assimilado pelas plantas. A RuBisCO também é a proteína mais abundante nas folhas, e é considerada a proteína mais abundante na Terra (DHINGRA et al., 2004). Dado o seu importante papel na biosfera, existe atualmente esforços para modificar geneticamente plantas de cultivo, de modo a conter RuBisCO mais eficientes. Em

plantas, algas, cianobactérias e proteobactérias fototróficas e quimioautotróficas, esta enzima normalmente consiste de oito repetições de dois tipos de subunidades protéicas, chamadas de subunidade maior (L, cerca de 55 kDa) e a subunidade menor (S, cerca de 13 kDa).

As enzimas **ATPases** (*spots 5 e 9* - folhas de *P. tuberculatum*; *spots S2, S4* - sementes de *P. tuberculatum*) são uma classe de enzimas que catalisam a decomposição do trifosfato de adenosina (ATP) em difosfato de adenosina (ADP) e um íon de fosfato livre. Esta reação de desfosforilação libera energia que a enzima (na maioria dos casos) aproveita para conduzir reações químicas, as quais não são energeticamente favorecidas. Este processo é amplamente utilizado em todas as formas de vida conhecidas (SANTORO, 2000; TAKIZAWA et al., 2008). As proteínas **14-3-3** (*spots 14 e 37* - folhas de *P. tuberculatum*; *spot S6* - sementes de *P. tuberculatum*; *spot 37* - folhas de *P. crassinervium*) constituem uma grande família de proteínas ácidas, com aproximadamente 30kDa, que existem principalmente como homo e heterodímeros, dentro de todas as células eucarióticas. Há um alto grau de identidade de seqüência e de conservação entre todas as isoformas. Acredita-se que a função destas proteínas em plantas esteja relacionada aos processos de assimilação de nutrientes. Estudos recentes apontam que estas proteínas atuam no metabolismo do nitrogênio, enxofre e fósforo (SHIN et al., 2011).

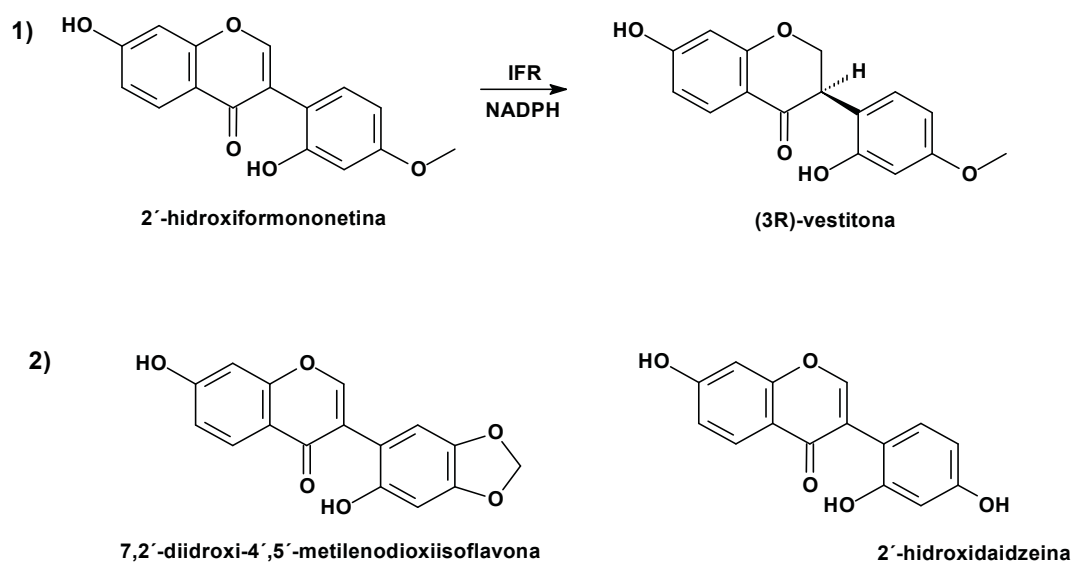
Aux/IAA (*spot 27* – folhas de *P. tuberculatum*) são proteínas de fatores transcricionais de curta duração que funcionam como repressores de genes de resposta precoce quando o hormônio auxina se encontra em baixas concentrações (REED, 2001).

Rubber elongation factor protein (REF) (fator protéico de alongamento da borracha) (*spots 28 e 46* - folhas de *P. tuberculatum*) está envolvida na maquinaria biossintética da borracha. A borracha natural, uma importante biomacromolécula de muitos usos industriais, é produzida por mais de 2000 espécies de plantas distribuídas em quatro das seis superordens de Dicotyledonae. Apesar da disponibilidade de sintéticos à base de petróleo, a borracha natural é muito valorizada porque substitutos sintéticos não possuem elasticidade e resistência à altas temperaturas como a natural. A borracha obtida de *Hevea brasiliensis* consiste em longas cadeias de *cis*-poliisopreno que são sintetizadas através da via do mevalonato, a partir das moléculas de acetil CoA derivadas de glicólise. A polimerização do pirofosfato de isopentenila pela preniltransferase é assistida pelo fator de alongamento da borracha (REF), que dá origem a longas cadeias de *cis*-poliisopreno que formam agregados de partículas de borracha rodeados por um membrana lipoprotéica (PRIYA et al., 2007).

Isoflavona redutase-like (IFR) (EC 1.3.1.45) (*spot 29* – folhas de *P. tuberculatum*) é uma enzima oxidorreductase envolvida na biossíntese de isoflavonoides e catalisa a redução de NADPH-dependente. IFR foi clonada a partir de alfafa e ervilha, e foi demonstrado que apesar de ser uma proteína de membrana, pode ser expressa em *Escherichia coli*, e a proteína recombinante obtida possui a mesma especificidade frente aos substratos (Figura 3.10), assim como a enzima purificada de plantas nativas (FRANCA et al., 2001; KIM et al., 2009). Isoflavonóides são valiosos

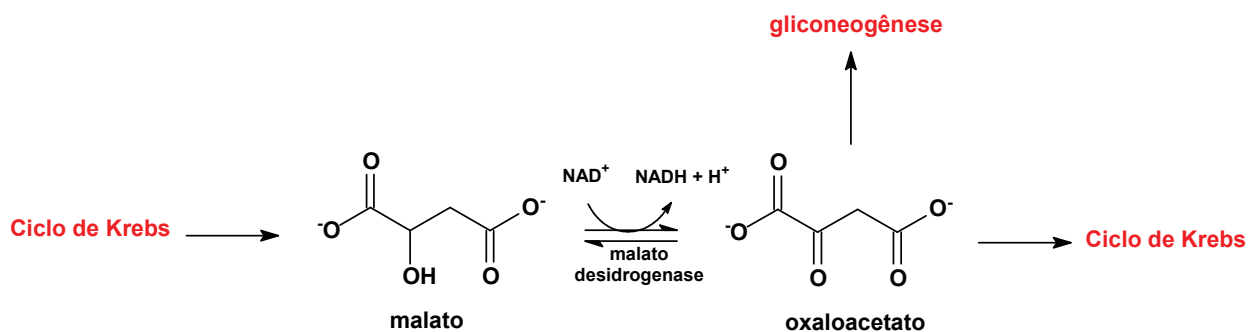
metabólitos secundários produzidos principalmente em leguminosas e mostram benefícios significativos à saúde para os seres humanos, tais como redução dos sintomas da menopausa, redução do risco de osteoporose e câncer, e os níveis de redução da colesterol. Como fitoalexinas, desempenham importante papel na defesa das plantas, com atividade protetora contra microorganismos e herbívoros. Embora não haja relatos de que isoflavonas tenham sido isoladas em espécies de *Piper*, a identidade fornecida pelo programa inclui o termo “like”, sugerindo que a enzima tenha atividade catalítica semelhante.

Figura 3.10: Atuação da enzima oxidoredutase IFR na biossíntese de isoflavonas. 1) reação que ocorre naturalmente em plantas; 2) aplicação biotecnológica: outros 2 substratos reconhecidos pela enzima IFR



Fonte: WANG et al., 2006

Malato desidrogenases (MDH, L-malato: NAD oxidoredutase, CE 1.1.1.37) (*spot 30* – folhas de *P. tuberculatum*) é uma enzima que catalisa a interconversão NAD/NADH-dependente dos substratos malato e oxaloacetato (Figura 3.11). Esta reação tem um papel-chave no transporte de malato/oxaloacetato através da membrana mitocondrial, e no ciclo de Krebs dentro da matriz mitocondrial em eucariontes. Esta proteína é uma molécula homodimérica na maioria dos organismos, incluindo todos os eucariotos e a maioria das espécies de bactérias. As enzimas compartilham um mecanismo comum de catálise e suas propriedades cinéticas são semelhantes, demonstrando um elevado grau de semelhança estrutural. As estruturas tridimensionais e elementos essenciais para a catálise são conservados entre formas mitocondriais e citoplasmáticas da MDH em células eucarióticas (MINARIK et al., 2002).

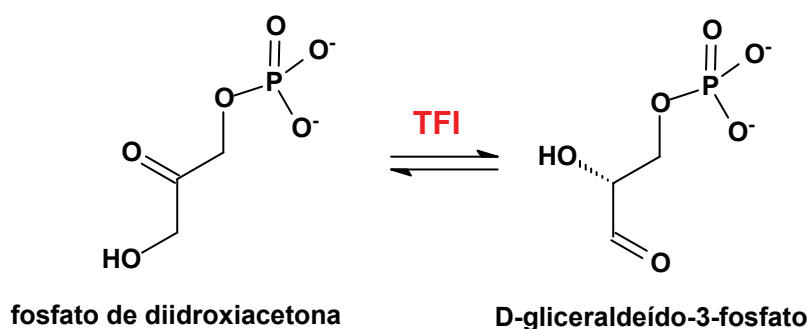
Figura 3.11: Atuação da enzima malato desidrogenase no ciclo de Krebs

RNA polimerase IV (*spot 38* – folhas de *P. tuberculatum*) é uma enzima que sintetiza o RNA de interferência (siRNA) em plantas, é específico em genomas plantas e participa da síntese de mais de 90% dos 24 nt siRNA (do inglês, nt = *nucleotides* e si = *small interfering*) heterocromáticos. O siRNA desempenha um papel importante na defesa do genoma contra os vírus invasores, por exemplo (ZHANG et al., 2007).

Actina (*spot 45* – folhas de *P. tuberculatum*) é uma proteína globular, com cerca de 42 kDa. Actina é a subunidade monomérica de dois tipos de filamentos nas células: os microfilamentos, um dos três principais componentes do citoesqueleto, e os filamentos finos, parte do aparato contrátil das células musculares. Assim, actina participa em muitos processos celulares importantes, incluindo a motilidade e divisão celular, citocinese, movimento de organelas e vesículas, sinalização celular e a criação e manutenção de junções celulares. Muitos destes processos são mediados por interações entre a actina com as membranas celulares (BLANCHONIN et al., 2010).

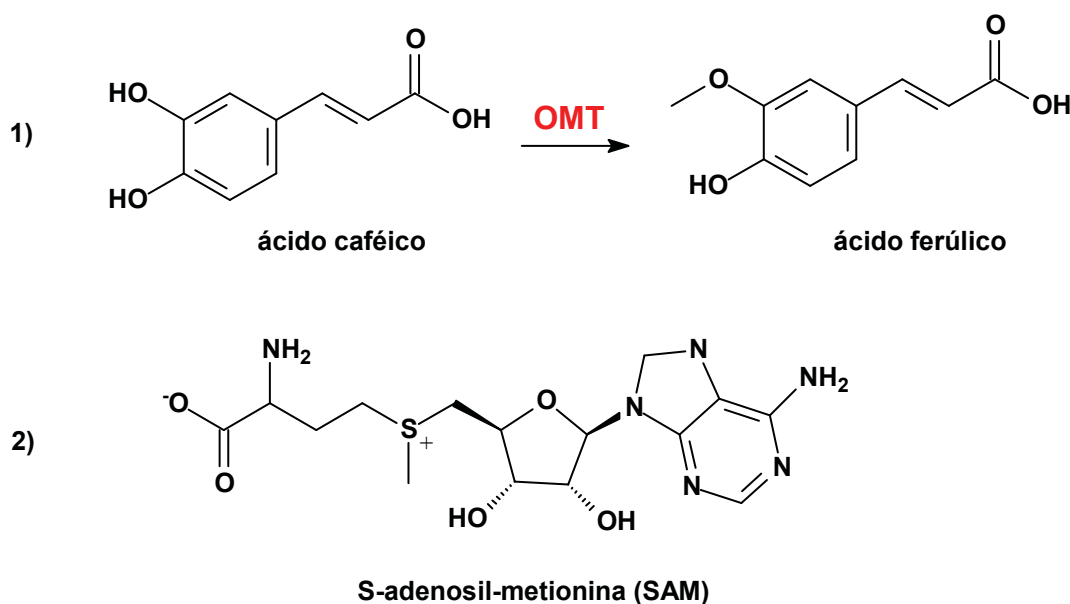
Uma proteína que participa do processo de **tradução em eucariotos** (*spot 47* – folhas de *P. tuberculatum*) também foi detectada. A tradução é o processo pelo qual o RNA mensageiro é traduzido em proteínas (MALYS e MCCARTHY, 2011).

Triose fosfato isomerase (**TPI**) (CE 5.3.1.1) (*spot S9* – sementes de *P. tuberculatum*), é uma enzima que catalisa a interconversão reversível dos isômeros da triose fosfato: fosfato de dihidroxiacetona e D-gliceraldeído-3-fosfato (Figura 3.12). TPI desempenha um papel importante na glicólise e é essencial para a produção eficiente de energia. TPI já foi identificada em diversos organismos, como mamíferos, insetos, fungos, plantas e bactérias (GAO et al., 2011).

Figura 3.12: atuação da enzima TPI (triose fosfato isomerase) na glicólise

A família das enzimas **O-metiltransferases** (OMTs) (*spot 11* – folhas de *P. crassinervium*) catalizam a transferência do grupo metil da S-adenosil-L-metionina a um grupo hidroxila específico. Estas reações de metilação (Figura 3.13) reduzem a reatividade/mutagenicidade de hidroxilas fenólicas e aumenta a lipofilicidade das substâncias (ZHOU et al., 2008).

Figura 3.13: 1) Exemplo de metilação catalisada por uma enzima OMT: do ácido caféico ao ácido ferúlico; 2) estrutura da S-adenosil-metionina



A **catalase** (EC = 1.11.1.6) (*spot 20* – folhas de *P. crassinervium*) é uma enzima que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio e é comumente encontrada em quase todos os organismos vivos que são expostos ao oxigênio (CHELIKANI et al., 2004). A catalase é usada na indústria de alimentos para a remoção de peróxido de hidrogênio de leite antes da produção de queijo. A eficiência do tingimento de tecidos é melhorada quando estes são submetidos a um pré-tratamento com catalase para eliminar os resíduos de peróxido (AMORIM et al., 2002). Recentemente, catalase também começou a ser usada na indústria de produtos cosméticos. Tratamentos faciais (máscaras) combinando a enzima e outras substâncias têm a intenção de aumentar a oxigenação celular nas camadas superiores da epiderme. Em biologia vegetal, o peróxido de hidrogênio é incluído entre as espécies de reativas de oxigênio (ERO) e sua produção é ativada durante processos de irradiação, choque-térmico, estresse por metais e patógenos, processos fotooxidativos induzidos durante condições de estresse abiótico (por refrigeração, por seca, excesso de sais e por ozônio). A catalase então atua balanceando a concentração do peróxido de hidrogênio (WILLEKENS et al., 1997).

Glicina desidrogenase (EC = 1.4.1.10) (*spot 21* – folhas de *P. crassinervium*) é uma enzima que catalisa a reação de clivagem da glicina. Esta enzima pertence à família das

oxidorreduções, especificamente aqueles que agem sobre o grupo CH-NH_2 (GOLDMAN e WAGNER, 1962).

Histonas (*spots 30 e 31* – folhas de *P. crassinervium*) são pequenas proteínas codificadas por uma família multigênica e são responsáveis pela organização nucleossomal da cromatina em eucariotos (PIONTKIVSKA et al., 2002).

Anidrase carbônica (CA, EC = 4.2.1.1) (*spot 32* – folhas de *P. crassinervium*) é uma metaloenzima contendo zinco que catalisa a interconversão de CO_2 e HCO_3^- em diversos organismos. A anidrase carbônica e a RuBisCO trabalham em associação, ambas estão localizadas dentro dos carboxissomos no interior da célula. A anidrase converte o gás carbônico a sua forma solúvel, o ácido carbônico que pode então se difundir no citosol; e em baixa concentração de CO_2 atmosférico, a reação inversa é sinalizada, e o ácido carbônico é convertido à CO_2 (BADGER e PRICE, 1994).

Ciclofilinas são proteínas presentes em vertebrados e plantas e é encontrada em todos os compartimentos subcelulares e estão envolvidas em uma grande variedade de processos, incluindo tráfico de proteínas e maturação, apoptose, recepção de sinalização, processamento de RNA e *splicing*. As ciclofilinas tem expressão induzida por estresse biótico e abiótico, incluindo presença de HgCl_2 , infecção viral, ácido salicílico, alta concentração de sais, calor, frio, intensidade de luz, seca, infecção e presença de ácido abscísico e metil jasmonato (ROMANO et al., 2004).

Dentre o elenco de proteínas identificadas em *P. tuberculatum* (Figura 3.14) e *P. crassinervium*, a maioria está relacionada a processos de metabolismo primário e de defesa da planta contra alguma perturbação exterior, como as enzimas de ataque e defesa contra patógenos. O local específico onde ocorre o contato da planta com o agente patogênico é conhecido como Região de Resistência Adquirida Localizada (LAR – Localized Acquired Resistance). Nessa região ocorre uma sequência de eventos importantes, conhecida como Resposta Hipersensitiva (HR - *Hypersensitive Response*), caracterizada pela rápida ativação do sistema de defesa da planta, induzida pela presença do fitopatógeno, portanto, um mecanismo de defesa local. No início da infecção, algumas proteínas da membrana celular vegetal atuam como sensores que detectam a aproximação do patógeno. Como resposta inicial de defesa e na tentativa de promover a inibição da instalação e impedir a proliferação do agente invasor no hospedeiro, ocorre reforço da membrana vegetal (lignificação), seguida da ativação de HR. Nesta etapa, são produzidos sinais moleculares responsáveis pela indução da expressão de vários genes envolvidos com os mecanismos de defesa da planta. Além disso, são ativados mecanismos de morte celular do tecido infectado e induzidas alterações metabólicas. Mais tarde, sinais provenientes de HR induzem um segundo sistema de defesa, envolvendo não apenas LAR, mas também células vizinhas não infectadas, o que caracteriza a Resistência Sistêmica Adquirida (SAR – *Systemic Acquired Resistance*) (CURSINO-SANTOS et al., 2003).

Figura 3.14: Espécimen de *P. tuberculatum* submetida a diversidade de fatores que afetam diretamente a expressão de proteínas. **1.** Intensidade de luz; **2.** Presença de parasitas/insetos/animais; **3.** Tipo de solo onde a planta vive/estresse hídrico; **4.** Estresse pelo frio/calor/nutrientes; **5.** Maturação de órgãos; **6.** Excesso de galhos



Além das informações obtidas através do programa MASCOT, utilizou-se um segundo programa para obter informações adicionais: UniPROT (www.uniprot.org). O UniPROT disponibiliza informações sobre proteínas no banco de dados *on-line* e assim realizou-se a categorização ontológica com base na identidade das proteínas, distribuindo-as em três tipos: processo biológico (**PB**), função molecular (**FM**) e componente celular (**CC**) (SALES et al., 2008). Considerando as identidades das proteínas das folhas de *P. tuberculatum*, obtidas após confronto dos dados experimentais de EM com o banco de dados, verificou-se que 64% são proteínas envolvidas em processos biológicos, 14% são componentes celulares, 7% são proteínas com funções moleculares e 14% são proteínas sem função identificada (Figura 3.15). Em relação à identidade das proteínas das sementes de *P. tuberculatum*, 21% estão envolvidas em processos biológicos, 18% são proteínas com funções moleculares, 14% não apresentaram nenhuma semelhança com outras proteínas e não foram identificadas proteína com a função de componente celular (Figura 3.16). A figura 3.17 mostra os resultados de categorização ontológica para uma segunda espécie em estudo: *Piper crassinervium*: 56% estão proteínas envolvidas em processos biológicos, 14% são componentes celulares, 11% são proteínas com funções moleculares e 11% são proteínas sem função identificada.

Figura 3.15: Categorização da identidade de proteínas de folhas de *P. tuberculatum* de acordo com o UniPROT

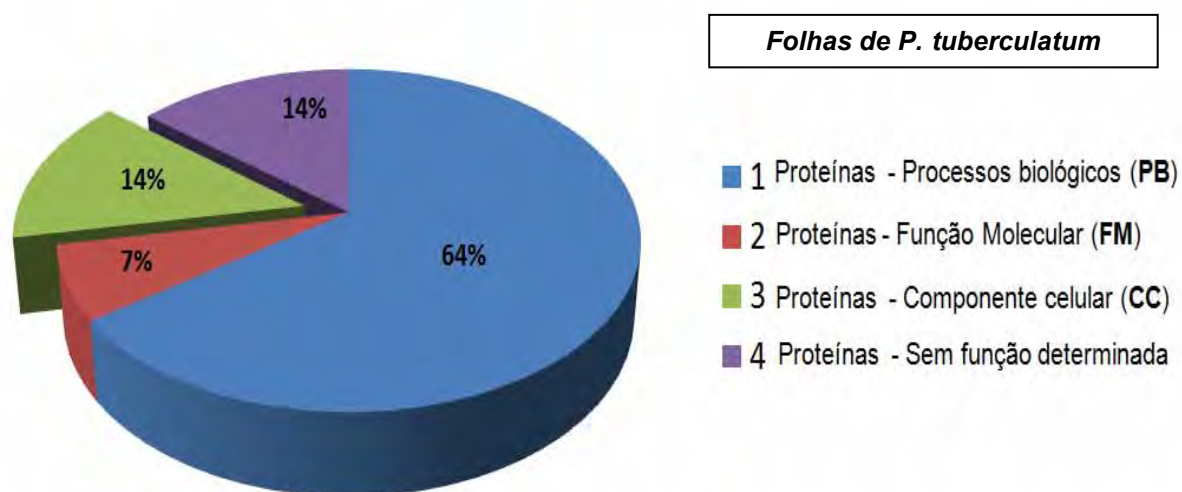


Figura 3.16: Categorização da identidade de proteínas de sementes de *P. tuberculatum* de acordo com o UniProt

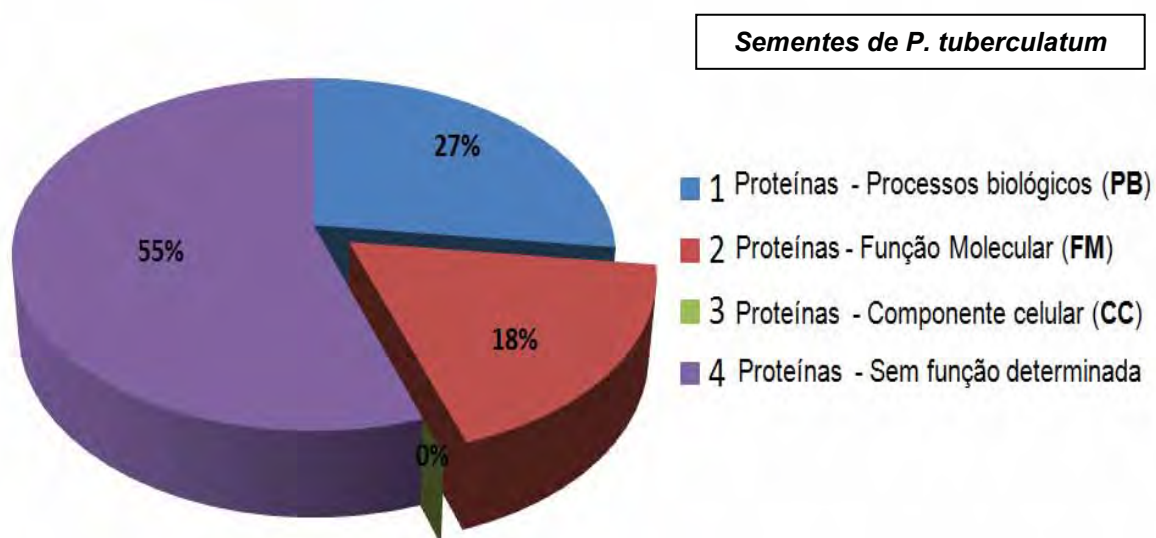
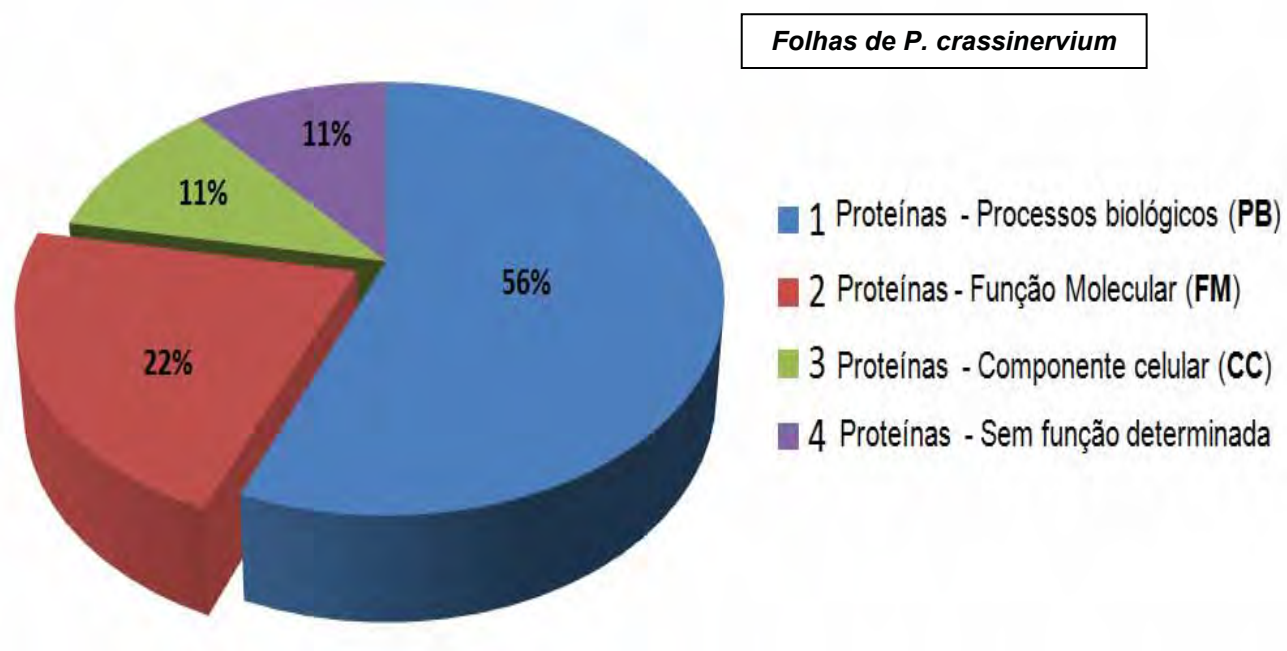


Figura 3.17: Categorização da identidade de proteínas de folhas de *P. crassinervium* de acordo com o UniPROT



IV - CONCLUSÕES

Os estudos realizados foram dedicados à compreensão de vias biossintéticas de piperamidas, sendo *P. tuberculatum* e *P. nigrum* utilizados como modelo.

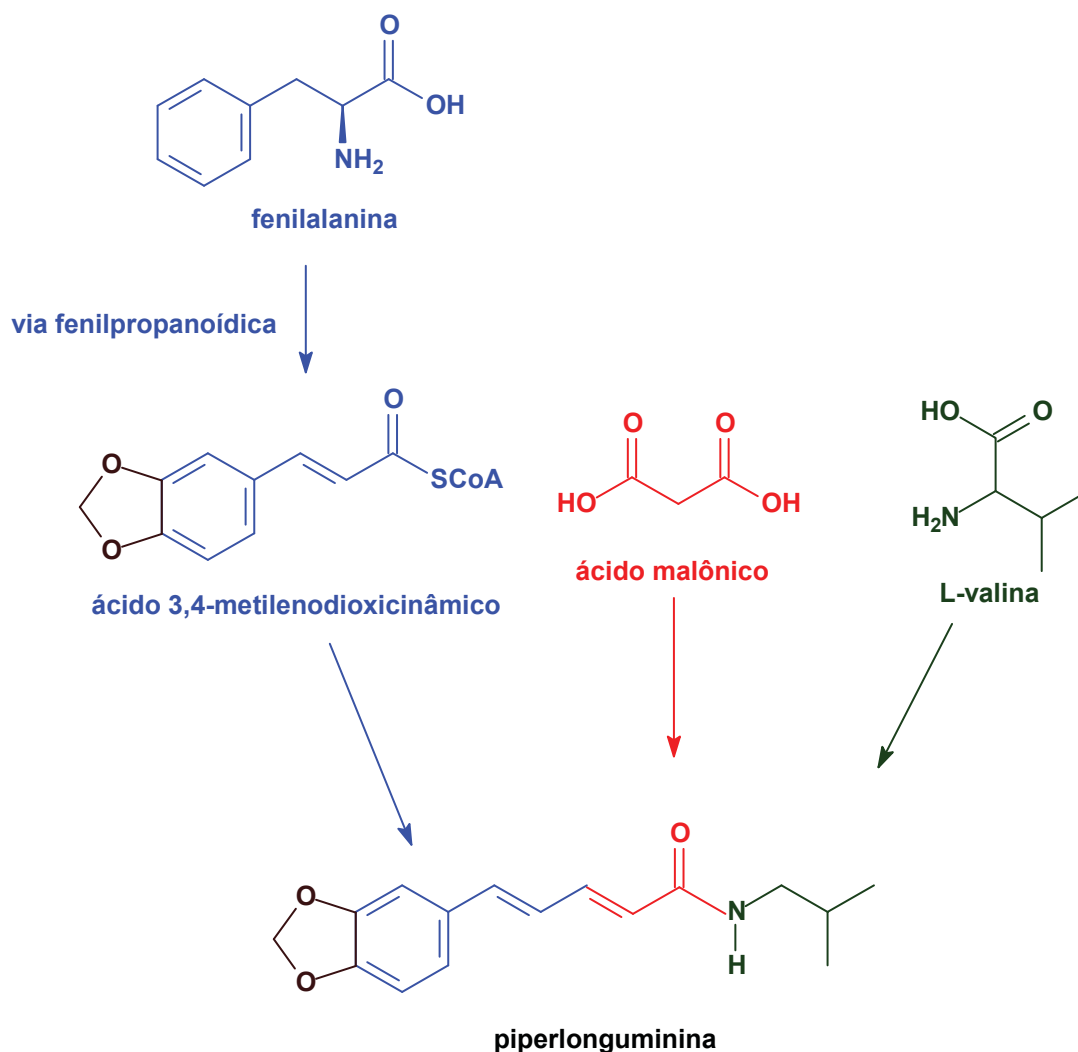
Foram monitoradas as atividades de diversas enzimas chaves envolvidas nas reações iniciais da via fenilpropanoídica como a fenilalanina amônia liase (PAL) e cinamato 4-hidroxilase (C4H). Testou-se também protocolos para monitorar atividade da enzima tirosina amônia liase (TAL), e não foi observado atividade da mesma e foi detectado atividade da provável enzima oxidoredutase que participa da conversão do ácido ferúlico ao ácido 3,4-metilenodioxicinâmico e monitorou-se também o acúmulo deste ácido em folhas de *P. nigrum*.

Foram sintetizados dois possível precursores da piperina: o ácido ferupérico e a amida feruperina. Após incubar estes procusores com extrato microsomal obtido de folhas de *P. nigrum*, não foi observado a conversão do ácido ferupérico ao ácido pipérico, bem como não foi possível avaliar a conversão da feruperina a piperina, devido a existência desta amida na forma endógena no extrato microsomal. Experimentos futuros utilizando extratos enzimáticos de *Piper tuberculatum* serão realizados, bem como a utilização de novos protocolos para remoção de substâncias endógenas.

As hipóteses sobre a origem da porção isobutílica de amidas e da participação do ácido malônico na biossíntese de piperamidas de *P. tuberculatum* foram investigadas. Foram incorporados ^{15}N -L-valina, ácido malônico- $\text{U-}^2\text{H}$ e ácido 2- ^{13}C -malônico em plântulas de *P. tuberculatum*. Os extratos e padrões foram analisados por CLAE-EM e após comparação de tempo de retenção, padrões de fragmentação e enriquecimento isotópico, constatou-se que o ácido malônico é o responsável pela extensão da cadeia carbônica, originando derivados $\text{C}_6\text{-C}_5$ a partir de fenilpropanóides ($\text{C}_6\text{-C}_3$), seguindo a mesma via biossintética de diversas classes de substâncias, como flavonóides. A L-valina participa da biossíntese de substâncias como a valinomicina e capsaicina, e foi demonstrado que é a origem biossintética da porção isobutílica das piperamidas acumuladas em espécies de Piperaceae.

Considerando todas as evidências experimentais, a sugestão mais plausível, sobre a sequencia biossintética de piperamidas em espécies de Piperaceae é a seguinte: fenilalanina $\rightarrow$ ácido cinâmico $\rightarrow$ ácido *p*-cumárico $\rightarrow$ ácido caféico $\rightarrow$ ácido ferúlico $\rightarrow$ ácido 3,4-metilenodioxicinâmico $\rightarrow$ condensação com ácido malônico $\rightarrow$ formação de amida (Figura 4.1).

Figura 4.1: Biossíntese de piperamidas (resumo): a porção em azul mostra a parte da molécula proveniente da via fenilpropanoídica: os experimentos sugerem que o grupo metilenodioxílico (destacado em marrom) é formado antes das reações com ácido malônico (parte destacada em vermelho), e por fim a porção isobutílica é proveniente do aminoácido L-valina (destacado em verde).



A análise por CLAE de tecidos de *P. nigrum* revelou que a amida piperina estava presente somente nos frutos. Devido a isto, eles foram utilizados como fonte de RNA para a preparação de cDNA, e consequentemente para a obtenção da biblioteca de cDNA. Após plaqueamento, 220 colônias foram selecionadas para crescimento em meio LB, purificação dos plasmídeos, digestão com enzimas de restrição e classificação do tamanho do inserto por eletroforese em gel de agarose. Quarenta clones com tamanho acima de 1,7 Kb foram sequenciados, fornecendo informações preliminares sobre o transcriptoma de frutos de *P. nigrum*. A categorização da biblioteca de cDNA de *P. nigrum* de acordo com o Gene Ontology mostrou que 5% dos genes identificados codificam proteínas que participam de processos biológicos, 30% são componentes celulares e 65% codificam enzimas com funções moleculares. Apesar de nenhuma metodologia para normalização da biblioteca ter sido empregada, existe equilíbrio e diversidade de genes

identificados. A continuação da exploração da biblioteca de cDNA é fundamental, pois apenas 220 colônias foram selecionadas e apenas 40 clones sequenciados. Outra possibilidade para investigação completa do transcriptoma dos frutos de *P. nigrum* é o sequenciamento do cDNA por técnicas de "deep sequencing", o que permitirá a obtenção de informações para entender as vias biossintéticas envolvidas na formação de piperina e outras amidas, e resultará em última instância, na identificação e caracterização funcional das enzimas-chave. Estes dados poderão ser utilizados não somente para a produção biotecnológica de produtos naturais, mas podem também facilitar a concepção e síntese de novas moléculas orgânicas para uso industrial e farmacêutico.

Tentativas de amplificação foram realizadas, utilizando *primers* degenerados de diversas enzimas que estão, ou que podem estar envolvidas na biossíntese de piperamidas, como aciltransferase (BAHD), cafeoil-CoA O-metiltransferase (COMT), chalcona sintase (CHS), cinamato 4-hidroxilase (C4H) e fenilalanina amônia liase (PAL). A biblioteca de cDNA (bactérias transformadas) e cDNA foram utilizados como material genético. Houve formação de produtos apenas para alguns conjuntos de *primers* utilizados para a PAL, mas após sequenciamento do DNA clonado, constatou-se que o mesmo pertencia ao genoma da bactéria *E.coli*, que foi o organismo utilizado como hospedeiro do vetor.

Os resultados dos estudos proteômicos revelaram o funcionamento real dos genes, já que as proteínas são os produtos finais no processo da expressão gênica. Foram identificadas diversas proteínas que estão envolvidas no metabolismo primário, secundário e em processos/mecanismos de defesa do organismo vegetal frente a estresses biótico e abiótico em *P. tuberculatum* e *P. crassinervium*. Muitas destas proteínas são expressas constantemente em baixa concentração, outras são apenas sintetizadas frente ao estímulo do estresse. Diferente do genoma, o proteoma está em constante mudança, especialmente devido a influenciam direta de fatores biótico e abiótico. Deste modo, conhecendo-se o padrão de expressão de diversas proteínas, é possível obter um *fingerprint*, ou seja, é possível diagnosticar infecções, distúrbios metabólicos, carência nutricionais, contaminação ou estresse por frio, seca, entre outros, fornecendo um panorama fisiológico e genético das espécies em estudos. Além da caracterização das respostas celulares, os dados gerados pela análise proteômica permitiram identificar sequências de peptídeos que possam ser utilizados como possíveis marcadores biológicos em *P. tuberculatum* e *P. crassinervium*. Em termos de compartimentalização, observou-se uma interessante diferença entre o proteoma das folhas e infrutescências, em termos de presença de proteínas/enzimas. Apesar das infrutescências apresentarem pigmentação esverdeada, não foi detectada a presença de enzimas que participam do ciclo de fixação de gás carbônico (Ciclo de Calvin), como a anidrase carbônica e a RuBisCO. Como a maquinaria enzimática presente nas folhas é mais complexa do que em infrutescências, especialmente pelas enzimas envolvidas no metabolismo basal, futuras análises de compartimentalização de vias biossintéticas de metabólitos secundários, empregando abordagem

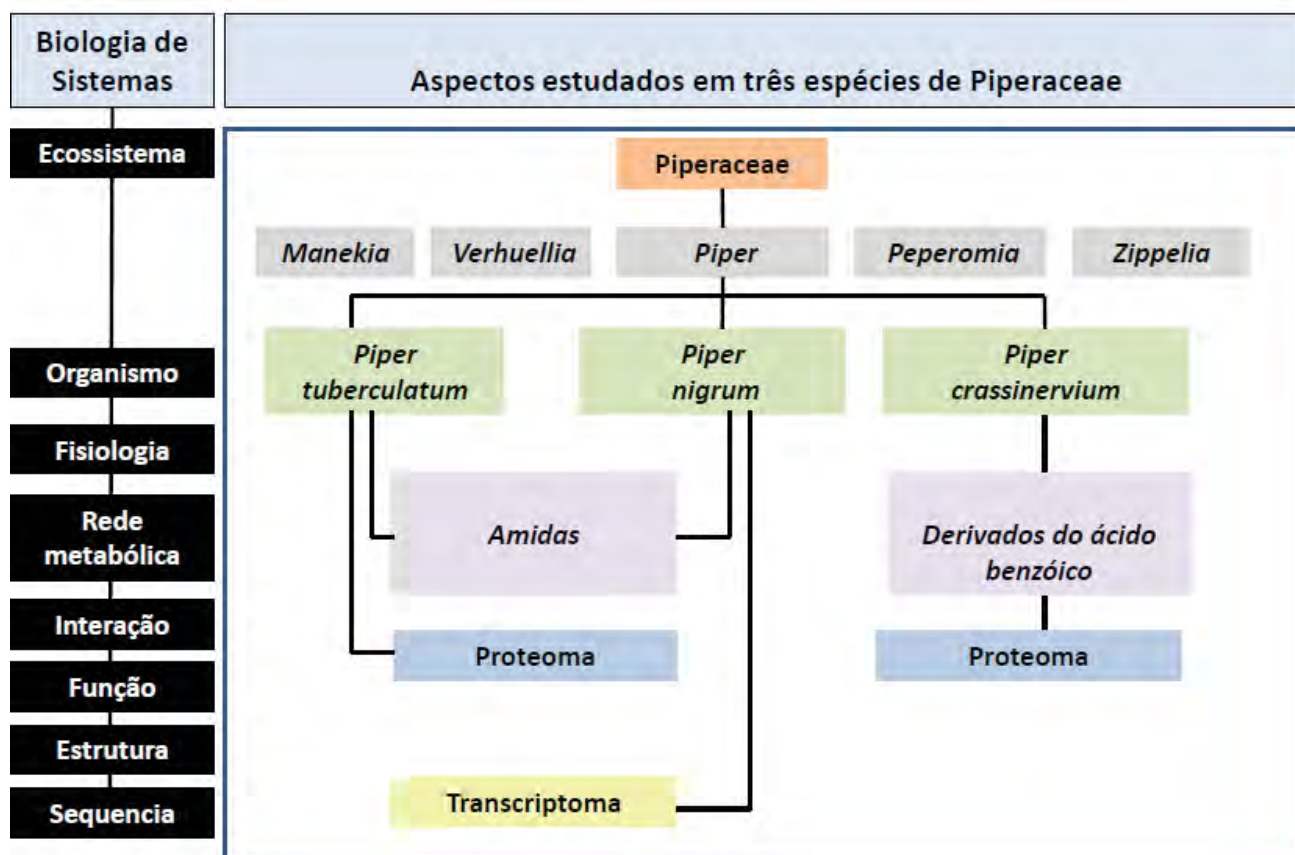
proteômica, podem ser realizadas a partir de extratos provenientes de infrutescências. No entanto, deve ser considerada a possibilidade de translocação de metabólitos e também de que estes possam ser biossintetizados em ambos os órgãos.

Propõe-se o avanço dos estudos proteômicos visando a compreensão do nível de compartimentalização das vias biossintéticas em organelas das espécies de interesse. Para isto, será necessário a realização de protocolos de isolamento de organelas/compartimentos celulares, como os plastídios, mitocôndrias, parede celular, núcleo e o retículo endoplasmático. O avanço de metodologias de análise de proteomas, como o *shotgun proteomics*, se mostra como uma interessante possibilidade: a amostra protéica pode ser diretamente analisada por CLAE-2D-EM (Cromatografia líquida bidimensional acoplada a espectrometria de massas), fornecendo rapidez e maior volume de informações. Os estudos proteômicos serão conduzidos de modo a analisar organelas e compartimentos celulares separadamente, focando no aspecto de compartimentalização em espécies de Piperaceae que contribuirão sobremaneira para a compreensão do sítio reacional das vias metabólicas, além de informações sobre a interação do organismo vegetal com o meio ambiente e a identificação de proteínas de interesse farmacológico e industrial.

A associação entre os dados de proteômica, transcriptômica e metabolômica é necessário para compreender quais as interações regulam os processos metabólicos relacionados a biossíntese dos metabólitos de interesse, visando a compreensão do funcionamento da maquinaria biossintética em Piperaceae de um modo geral.

Com o intuito de contribuir para a abordagem dos processos dinâmicos envolvidos nas etapas de formação das piperamidas em espécies de Piperaceae, aspectos proteômicos e genômicos foram também priorizados com o intuito de gerar conhecimento e fornecer ferramentas para o mapeamento do metabolismo destas espécies vegetais de forma a contribuírem para futuras inserções no complexo conceito de Biologia de Sistemas (Figura 4.2).

Figura 4.2: Biologia de sistemas x aspectos estudados em três espécies de Piperaceae



REFERÊNCIAS

- ABE, I.; MORITA, H. Structure and function of the chalcone synthase superfamily of plant type III polyketide synthases. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 6, p. 809-838, Jan. 2010.
- ALBIERO, A. L. M. et al. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper hispidum* Sw. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 379-391, jul. 2006.
- AMORIM, A. M. et al. The application of catalase for the elimination of hydrogen peroxide residues after bleaching of cotton fabrics. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, n. 3, p. 433-436, set. 2002.
- BACHER, A. et al. Elucidation of novel biosynthetic pathways and metabolite flux patterns by retrobiosynthetic NMR analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, n. 5, p. 567-598, Dec. 1998.
- BADGER, M. R.; PRICE, G. D. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 45, p. 369-392, Aug. 1994.
- BAERENFALLER, K. et al. Genome-scale proteomics reveals *Arabidopsis thaliana* gene models and proteome dynamics. **Science**, v. 320, n. 5878, p. 938-941, May 2008.
- BAGINSKY, S. Plant proteomics: concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 28, n. 1, p. 93-120, Jan. 2009.
- BALBUENA, T. S. et al. Challenges in proteome analyses of tropical plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 23, n. 2, p. 91-104, jan. 2011.
- BALDERAS-HERNANDEZ, V. et al. Metabolic engineering for improving anthranilate synthesis from glucose in *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 19, p. 1-12, Apr. 2009.
- BALDOQUI, D. C. et al. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 7, p. 899-902, Aug. 1999.
- BARAKAT, A. et al. Comparative and phylogenomic analyses of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamoyl-CoA-reductase-like gene family in land plants. **Plant Science**, v. 181, n. 3, p. 249-257, Sept. 2011.
- BARBOSA, F. B. D. C. Biotecnologia molecular e novo padrão de financiamento: possibilidade para pesquisa da fusariose da pimenta-do-reino. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 19, n. 3, p. 429-449, ago. 2002.
- BATISTA JÚNIOR, J. M. et al. Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 538-540, Mar. 2008.
- BAUER, W.; ZENK, M. Methyleneedioxy bridge forming cytochrome P-450 dependent enzymes are involved in (S)-stylopine biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 30, n. 9, p. 2953-2961, June 1991.

BAZIN, M. et al. Synthesis of new avenaluminic carboxamide derivatives in the ferulic series. **Synthetic Communications**, v. 38, n. 22, p. 3947-3959, Jan. 1991.

BERGAMO, D. C. B. et al. Biosynthetic origins of the isoprene units of 4-nerolidylcatechol in *Potomorphe umbellata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1406-1409, nov. 2005.

BLANCHONIN, L. et al. Actin dynamics in plant cells: a team effort from multiple proteins orchestrates this very fast-paced game. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 6, p. 714-723, Dec. 2010.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 519-546, Mar. 2003.

BOURGARD, F. et al. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, p. 293-308, Apr. 2006.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, Aug. 1976.

CAI, Z. et al. Complete plastid genome sequences of *Drimys*, *Liriodendron*, and *Piper*: implications for the phylogenetic relationships of magnoliids. **BMC Evolutionary Biology**, v. 6, n. 77, p. 1-20, Oct. 2006.

CALABRESE, J. C. et al. Crystal structure of phenylalanine ammonia lyase: multiple helix dipoles. **Biochemistry**, v. 43, n. 36, p. 11403-11416, Sept. 2004.

CELEDON, P. et al. Proteomic analysis of the cambial region in juvenile *Eucalyptus grandis* at three ages. **Proteomics**, v. 7, n. 13, p. 2258-2274, June 2007.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 2, p. 192-208, Jan. 2004.

CHEN, A. et al. Molecular cloning of two genes encoding cinnamate 4-hydroxylase (C4H) from oilseed rape (*Brassica napus*). **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 2, p. 247-260, Mar. 2007.

CHENG, M. J. et al. Chemical and cytotoxic constituents from *Peperomia sui*. **Phytochemistry**, v. 63, n. 5, p. 603-608, July 2003.

CLARKE, J.; DANIELL, H.; NUGENT, J. Chloroplast biotechnology, genomics and evolution: current status, challenges and future directions. **Plant Molecular Biology**, v. 76, n. 3-5, p. 207-209, July 2011.

CLEMENS, S.; BARZ, W. Cytochrome P450-dependent methylenedioxy bridge formation in *Cicer arietinum*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 2, p. 457-460, Feb. 1996.

- CORREA, E. A. et al. *In vitro* TRPV1 activity of piperine derived amides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 9, p. 3299-3306, May 2010.
- COTINGUIBA, F. et al. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 18, n. 9, p. 703-711, Dec. 2009.
- CURSINO-SANTOS, J. R.; DEFINA, T. P. A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. **Os segredos das plantas e de seus patógenos na era molecular**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2003. 45 p.
- CSEKE, L. J. et al. **Natural product from plants**. Boca Raton: Taylor Francis, 2006. 632 p.
- D'AURIA, J. Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 3, p. 331-340, June 2006.
- DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T. **The Monocotyledons: a comparative study**. London: Academic Press, 1982. 378 p.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. Chichester: Wiley, 2009. 539 p.
- DHINGRA, A.; PORTIS, A.; DANIELL, H. Enhanced translation of a chloroplast-expressed RbcS gene restores small subunit levels and photosynthesis in nuclear RbcS antisense plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 16, p. 6315-6320, Apr. 2004.
- DURST, F. et al. Cinnamic acid hydroxylase activity in plant microsomes. **Cytochrome P450**, v. 272, p. 259-268, Nov. 1996.
- EISENREICH, W.; BACHER, A. Advances of high-resolution NMR techniques in the structural and metabolic analysis of plant biochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2799-2815, Nov. 2007.
- FAN, Y. et al. A Combined theoretical and experimental study of the ammonia tunnel in carbamoyl phosphate synthetase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 29, p. 10211-10219, July 2009.
- FELIPPE, L. G. et al. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 2, p. 445-450, Jan. 2008.
- FELIPPE, L. G. et al. Structure and absolute configuration of a secolignan from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 3, p. 245-249, Aug. 2011.
- FOURNIER, M. et al. Multidimensional separations-based shotgun proteomics. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 8, p. 3654-3686, Aug. 2007.
- FRANCA, S. et al. Biosynthesis of secondary metabolites in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, n. 1-4, p. 243-250, Feb. 2001.

- GAMBOA-LEON, R.; CHILTON, W.S. Isobutylamide numbing agents of toothache grass, *Ctenium aromaticum*. **Biochemichal Systematics and Ecology**, v. 28, n. 10, p. 1019-1021, 2000.
- GAO, L. et al. Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). **Phytochemistry**, v. 72, n. 10, p. 1180-1191, July 2011.
- GEISLER, J.; GROSS, G. The biosynthesis of piperine in *Piper nigrum*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 2, p. 489-492, Nov. 1990.
- GIAVALISCO, P. et al. Proteome analysis of *Arabidopsis thaliana* by two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry. **Proteomics**, v. 5, n. 7, p. 1902-1913, May 2005.
- GODIN, J. P.; FAY, L. B.; HOPFGARTNER, G. Liquid chromatography combined with mass spectrometry for C-13 isotopic analysis in life science research. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 26, n. 6, p. 751-774, Nov. 2007.
- GOLDMAN, D. S.; WAGNER, M. J. Enzyme systems in mycobacteria: glycine dehydrogenase and glyoxylic cicle. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 65, n. 2, p. 297, Nov. 1962.
- GROBEI, M. A. et al. Deterministic protein inference for shotgun proteomics data provides new insights into *Arabidopsis* pollen development and function. **Genome Research**, v. 19, n. 10, p. 1786-1800, Oct. 2009.
- HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2831-2846, Nov. 2007.
- HASHIMOTO, T. et al. Hyocyanine 6- β -hydroxylase, an enzyme involved in tropane alkaloid biosynthesis, is localized at the pericycle of the root. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 7, p. 4648-4653, Mar. 1991.
- HOOD, E. E. et al. Manipulating corn germplasm to increase recombinant protein accumulation. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, n. 9, p. 947-956, Sept. 2011.
- HOPWOOD, D. et al. Production of hybrid antibiotics by genetic-engineering. **Nature**, v. 314, n. 6012, p. 642-644, June 1985.
- IKEZAWA, N. et al. Molecular cloning and characterization of CYP719, a methylenedioxy bridge-forming enzyme that belongs to a novel P450 family, from cultured *Coptis japonica* cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 40, p. 38557-38565, Oct. 2003.
- IKEZAWA, N. et al. Identification of CYP719 as a methylenedioxy ring-forming enzyme in berberine biosynthesis of *Coptis japonica*. **Plant and Cell Physiology**, v. 44, p. S195-S195, Sept. 2003.
- JOY, N.; ABRAHAM, Z.; SONIYA, E. A preliminary assessment of genetic relationships among agronomically important cultivars of black pepper. **BMC Genetics**, v. 8, p. 44, June 2007.

- KALENDAR, R. et al. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. **Heredity**, v. 106, n. 4, p. 520-530, Apr. 2011.
- KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 529-538, Apr. 2007.
- KAWASAKI, T. et al. Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 1, p. 230-235, Jan. 2006.
- KIM, D. H. et al. Production of genistein from naringenin using *Escherichia coli* containing isoflavone synthase-cytochrome P450 reductase fusion protein. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 12, p. 1612-1616, Dec. 2009.
- KRISHNAN, H. B.; NATARAJAN, S. S. A rapid method for depletion of RuBisCO from soybean (*Glycine max*) leaf for proteomic analysis of lower abundance proteins. **Phytochemistry**, v. 70, n. 17-18, p. 1958-1964, Dec. 2009.
- KROEGER, J.; ZARZYCKI, J.; FUCHS, G. A spectrophotometric assay for measuring acetyl-coenzyme A carboxylase. **Analytical Biochemistry**, v. 411, n. 1, p. 100-105, Apr. 2011.
- KUTCHAN, T. A role for intra- and intercellular translocation in natural product biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 3, p. 292-300, June 2005.
- KUTCHAN, T. et al. The cDNA for strictosidina synthase from *Rauvolfia serpentina* - DNA sequence determination and expression in *Escherichia coli*. **FEBS Letters**, v. 237, n. 1-2, p. 40-44, Sept. 1988.
- LAGO, J. H. G. et al. Benzoic acid derivatives from piper species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 11, p. 1783-1788, Nov. 2004.
- LAGO, J. H. G. et al. Antifungal piperolides from *Piper malacophyllum* (Prels) C. DC. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 2, p. 153-156, mar. 2005.
- LEE, S. et al. β -Glucosidase coating on polymer nanofibers for improved cellulosic ethanol production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, n. 1, p. 141-147, Jan. 2010.
- LEMOS, O. F. **Mutagênese e tecnologia *in vitro* no melhoramento genético da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. 2003. 159 f. Tese (Doutorado em Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- LOPES, A. A. et al. *In vitro* activity of compounds isolated from *Piper crassinervium* against *Trypanosoma cruzi*. **Natural Product Research**, v. 22, n. 12, p. 1040-1046, Sept. 2008.
- LOPEZ, S. N. et al. Geranylation of benzoic acid derivatives by enzymatic extracts from *Piper crassinervium* (Piperaceae). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4251-4260, June 2010.

- McDONALD, M. J.; D'CUNHA, G. B. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 85, n. 3, p. 273-282, June 2007.
- MACEDO, F. C. Carbon 13 nuclear magnetic resonance spectroscopy in the studies of biosynthetic routes of natural products. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 116-124, jan. 2007.
- MAHMUD, T. Isotope tracer investigations of natural products biosynthesis: the discovery of novel metabolic pathways. **Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals**, v. 50, n. 11-12, p. 1039-1051, Oct. 2007.
- MAIA, C. O.; VELLOSO, A.; LANNES, D. **Genética e biologia molecular para o ensino fundamental e médio**. [2010]. Disponível em: <http://www.educacaopublica.rj.gov.br/oficinas/ed_ciencias/genetica/arqs/apostila_biomol.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2011.
- MALONE, G. et al. Prospecção de genes em bibliotecas de cDNA. **Revista Brasileira de Agrociências**, v. 12, n. 1, p. 7-13, Fev. 2006.
- MALYS, N.; MCCARTHY, J. E. G. Translation initiation: variations in the mechanism can be anticipated. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 6, p. 991-1003, Mar. 2011.
- MARKAI, S. et al. Natural deuterium distribution in branched chain medium-length fatty acids is nonstatistical: a site-specific study by quantitative ^2H NMR spectroscopy of the fatty acids of capsaicinoids. **ChemBioChem**, v. 3, n. 2, p. 212-218, Mar. 2002.
- MARQUES, J. V. et al. Antifungal piperolides, coumarins, pyrones and amides from *Piper* species and synthetic analogs. **Planta Medica**, v. 74, n. 9, p. 1169-1169, July 2008.
- MEYER, A. et al. Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, p. 221-227, Mar. 2010.
- MHAMDI, A. et al. Cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase contributes to redox homeostasis and the regulation of pathogen responses in *Arabidopsis* leaves. **Plant Cell and Environment**, v. 33, n. 7, p. 1112-1123, July 2010.
- MINARIK, P. et al. Malate dehydrogenases: structure and function. **General Physiology and Biophysics**, v. 21, n. 3, p. 257-265, Sept. 2002.
- MITCHELL, W. Natural products from synthetic biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 4, p. 505-515, Aug. 2011.
- MOORE, B. S.; HERTWECK, C. Biosynthesis and attachment of novel bacterial polyketide synthase starter units. **Natural Products Reports**, v. 19, n. 1, p. 70-99, Feb. 2002.
- MORANDIM, A. D. et al. Circadian rhythm of anti-fungal prenylated chromene in leaves of *Piper aduncum*. **Phytochemical Analysis**, v. 16, n. 4, p. 282-286, July 2005.

- MOTA, J. D. et al. *In vitro* trypanocidal activity of phenolic derivatives from *Peperomia obtusifolia*. **Planta Medica**, v. 75, n. 6, p. 620-623, May 2009.
- NAVICKIENE, H. M. D. et al. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 621-626, Nov. 2000.
- NOCK, C. et al. Chloroplast genome sequences from total DNA for plant identification. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, n. 3, p. 328-333, Apr. 2011.
- OU, S.Y. et al. Production of coumaric acid from sugarcane bagasse. **Innovative Food and Emerging Technologies**, v. 10, n. 2, p. 253-259, Apr. 2009.
- PARK, J. et al. Cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase and pyranocoumarin biosynthesis in *Angelica gigas*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 8, p. 1394-1397, Aug. 2010.
- PARMAR, V. S. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, Oct. 1997.
- PASCUAL, M. et al. A Comparative analysis of the NADPH thioredoxin reductase C-2-Cys peroxiredoxin system from plants and cyanobacteria. **Plant Physiology**, v. 155, n. 4, p. 1806-1816, Apr. 2011.
- PIONTKIVSKA, H.; ROONEY, A. P.; NEI, M. Purifying selection and birth-and-death evolution in the histone H4 gene family. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, n. 5, p. 689-697, May 2002.
- PORTIS, A.; PARRY, M. Discoveries in RuBisCO (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): a historical perspective. **Photosynthesis Research**, v. 94, n. 1, p. 121-143, Oct. 2007.
- PRADEEPKUMAR, T. et al. Analysis of genetic diversity in *Piper nigrum* L. using RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, n. 5, p. 469-475, Aug. 2003.
- PRIYA, P.; VENKATACHALAM, P.; THULASEEDHARAN, A. Molecular cloning of rubber elongation factor protein cDNA from *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. and its heterologous expression in *Escherichia coli* and *Nicotiana tabacum*. **Current Science**, v. 93, n. 8, p. 1077-1079, Oct. 2007.
- PUPO, M.; GALLO, M.; VIEIRA, P. Chemical biology: a modern strategy for the natural products research. **Quimica Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, nov. 2007.
- REED, J. W. Roles and activities of Aux/IAA proteins in *Arabidopsis*. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 9, p. 420-425, Sept. 2001.
- REGASINI, L. O. et al. Radical scavenging capacity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 6, p. 900-903, Dec. 2008.

- REMMERIE, N. et al. Next generation functional proteomics in non-model plants: a survey on techniques and applications for the analysis of protein complexes and post-translational modifications. **Phytochemistry**, v. 72, n. 10, p. 1192-1218, July 2011.
- RO, D. et al. Functional characterization and subcellular localization of poplar (*Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*) cinnamate 4-hydroxylase. **Plant Physiology**, v. 126, n. 1, p. 317-329, May 2001.
- ROCHA, T. L. et al. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. **Comunicado Técnico da Embrapa**. 2005. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/187102/1/cot136.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2011.
- RODRIGUEZ, P. Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. **Plant Molecular Biology**, v. 38, n. 6, p. 919-927, Dec. 1998.
- ROHMER, M. et al. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. **Natural Products Reports**, v. 16, n. 5, p. 565-574, Oct. 1999.
- ROMANO, P. G. N.; HORTON, P.; GRAY, J. E. The *Arabidopsis* cyclophilin gene family. **Plant Physiology**, v. 134, n. 4, p. 1268-1282, Apr. 2004.
- SALES, L.; CAMPOS, M.; GOMES, H. Ontologias de domínio: um estudo das relações conceituais. **Perspectivas em Ciência da Informação**, v. 13, n. 2, p. 62-76, maio 2008.
- SALLAUD, C. et al. A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z,Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites*. **Plant Cell**, v. 21, n. 1, p. 301-317, Jan. 2009.
- SALVATO, F.; CARVALHO, M. Methods and strategies in proteomics and their applications in plants. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 727-734, mar. 2010.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 74, n. 12, p. 5463-5467, Dec. 1977.
- SANTORO, M. Heat shock factors and the control of the stress response. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, n. 1, p. 55-63, Jan. 2000.
- SCHAPIRE, A. et al. *Arabidopsis* synaptotagmin 1 is required for the maintenance of plasma membrane integrity and cell viability. **Plant Cell**, v. 20, n. 12, p. 3374-3388, Dec. 2008.
- SEMLER, U.; GROSS, G. Distribution of piperine in vegetative parts of *Piper nigrum*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1566-1567, Apr. 1988.
- SERENO, M. L. **Caracterização e análise de expressão dos genes de metalotioneínas dos tipos 1, 2 e 3 de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) sob condições de estresse**. 2009. 164 f.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

SHARPLES, S. C.; FRY, S. C. Radioisotope ratios discriminate between competing pathways of cell wall polysaccharide and RNA biosynthesis in living plant cells. **Plant Journal**, v. 52, n. 2, p. 252-262, Oct. 2007.

SHIM, S-Y.; ALI, R. M.; GAM, L-H. Protein profiling of *Piper sarmentosum*. **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 303-313, July 2010.

SHIN, R. et al. 14-3-3 Proteins fine-tune plant nutrient metabolism. **FEBS Letters**, v. 585, n. 1, p. 143-147, Jan. 2011.

SILVA, R. V. et al. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 521-527, Mar. 2002.

SMITH, A. M. et al. **Plant biology**. New York: Garland Science, 2009. 679 p.

SRIVASTAVA, P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 3, p. 185-194, Mar. 2002.

STAPLETON, M. et al. Role of conserved residues within the carboxy phosphate domain of carbamoyl phosphate synthetase. **Biochemistry**, v. 35, n. 45, p. 14352-14361, Nov. 1996.

TAKIZAWA, K.; KANAZAWA, A.; KRAMER, D. M. Depletion of stromal P-i induces high energy-dependent antenna exciton quenching [q(E)] by decreasing proton conductivity at CFO-CF1 ATP synthase. **Plant Cell and Environment**, v. 31, n. 2, p. 235-243, Feb. 2008.

TATTERSALL, D. et al. Resistance to an herbivore through engineered cyanogenic glucoside synthesis. **Science**, v. 293, n. 5536, p. 1826-1828, Sept. 2001.

TAYLOR, C. et al. The minimum information about a proteomics experiment (MIAPE). **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 8, p. 887-893, Aug. 2007.

THE HUMAN genome at ten. **Nature**, v. 464, n. 7289, p. 649-650, Apr. 2010.

TRABELSI, N. et al. Kinetic and binding equilibrium studies of dihydroflavonol 4-reductase from *Vitis vinifera* and its unusually strong substrate inhibition. **Journal of Biophysical Chemistry**, v. 2, n. 3, p. 332-344, Feb. 2011.

TUAN, P. et al. Molecular cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase in the phenylpropanoid biosynthesis pathway in garlic (*Allium sativum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 20, p. 10911-10917, Oct. 2010.

VELCULESCU, V. E. et al. Characterization of the yeast transcriptome. **Cell**, v. 88, n. 2, p. 243-251, Jan. 1997.

VENTER, J. Multiple personal genomes await. **Nature**, v. 464, n. 7289, p. 676-677, Apr. 2010.

- VERPOORTE, R. et al. Metabolomics: back to basics. **Phytochemistry Review**, v. 7, p. 525-537, July 2008.
- VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 123-132, Apr. 2005.
- VOGT, T. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular Plant**, v. 3, n. 1, p. 2-20, Jan. 2010.
- WANG, X. Q. et al. Crystal structure of isoflavone reductase from alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Journal of Molecular Biology**, v. 358, n. 5, p. 1341-1352, May 2006.
- WANKE, S. et al. From forgotten taxon to a missing link? The position of the genus *Verhuellia* (Piperaceae) revealed by molecules. **Annals of Botany**, v. 99, n. 6, p. 1231-1238, June 2007.
- WASINGER, V. et al. Progress with gene-product mapping of the mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v. 16, n. 7, p. 1090-1094, July 1995.
- WILLEKENS, H. et al. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plants. **Embo Journal**, v. 16, n. 16, p. 4806-4816, Aug. 1997.
- WILLIAMS, R.; SHAH, C.; SACKETT, D. Separation of tubulin isoforms by isoelectric focusing in immobilized pH gradient gels. **Analytical Biochemistry**, v. 275, n. 2, p. 265-267, Nov. 1999.
- WU, C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 11, p. 441-469, June 1995.
- WU, K. L.; ZHANG, Y. L. Clinical application of tear proteomics: present and future prospects. **Proteomics Clinical Applications**, v. 1, n. 9, p. 972-982, Sept. 2007.
- XAVIER, A. M. et al. Landmarks in the history of radioactivity and current tendencies. **Quimica Nova**, v. 30, n. 1, p. 83-91, jan. 2007.
- XIANG, L.; MOORE, B. S. Biochemical characterization of a prokaryotic phenylalanine ammonia lyase. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 12, p. 4286-4289, June 2005.
- YAMAUCHI, K.; YASUDA, S.; HAMADA, K.; TSUTSUMI, Y.; FUKUSHIMA, K. Multiform biosynthetic pathway of syringyl lignin in angiosperms. **Planta**, v. 216, n. 3, p. 496-501, Jan. 2003.
- YILMAZ, T.; CAN, A. Partial purification and characterization of β -glucosidase from *Aloe vera* L. leaves. **Journal of Faculty Pharmacy of Istanbul University**, v. 40, n. 2008-2009, p. 65-75, Aug. 2009.
- ZHANG, X. Y. et al. Role of RNA polymerase IV in plant small RNA metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 11, p. 4536-4541, Mar. 2007.

ZHENG, X. Q.; MATSUI, A.; ASHIHARA, H. Biosynthesis of trigonelline from nicotinate mononucleotide in mungbean seedlings. **Phytochemistry**, v. 69, n. 2, p. 390-395, Jan. 2008.

ZHOU, J. M. et al. Characterization of two O-methyltransferase-like genes in barley and maize. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 1-2, p. 26-34, Jan. 2008.

CÓDIGO GENÉTICO (RNA)

Ala/A	Arg/R	Asn/N	Asp/D	Cys/C	Gln/Q	Glu/E	Gly/G	His/H	Ile/I	Leu/L
GCU GCC GCA GCG	CGU CGC CGA CGG AGA AGG	AAU AAC	GAU GAC	UGU UGC	CAA CAG	GAA GAG	GGU GGC GGA GGG	CAU CAC	AUU AUC AUA	UUA UUG CUU CUC CUA CUG
Lys/K	Met/M	Phe/F	Pro/P	Ser/S	Thr/T	Trp/W	Tyr/Y	Val/V	START	STOP
AAA AAG	AUG	UUU UUC	CCU CCC CCA CCG	UCU UCC UCA UCG AGU AGC	ACU ACC ACA ACG	UGG	UAU UAC	GUU GUC GUA GUG	AUG	UAG UGA UAA

FÓRMULA DE WALLACE:

$$T_m = 2.(A+T) + [4. (C+G)]$$

PRIMERS DEGENERADOS**PAL (FENILALANINA AMÔNIA LIASE)****Forward:****5' GAY CCN YTN AAY TGG GG 3'****5' AAR CCN GAR TTY ACN GAY 3'****5' AAR CCN GAR TTY ACN GAC 3'****5' AAR CCN GAR TTY ACN GAT 3'****Reverse:****5' TC YTG RTT RTG YTG TTC 3'****5' TC YTG RTT RTG YTG CTC 3'****5' YTC YTC YTC RAA NGC ACC 3'****5' YTC YTC YTC RAA NGC TCC 3'****5' YTC YTC YTC RAA NGC CCC 3'****5' YTC YTC YTC RAA NGC GCC 3'****C4H (CINAMATO 4-HIDROXILASE)****Forward:****5' TTY GGN AAY TGG YTA CA 3'****5' TTY GGN AAY TGG YTT CA 3'****5' TTY GGN AAY TGG YTC CA 3'****5' TTY GGN AAY TGG YTG CA 3'****5' GCN AAR AAR TTY GGN GAC 3'****5' GCN AAR AAR TTY GGN GAT 3'****5' GTN TTY GAY ATH TTY AC 3'****5' TAC TAC TAY AAY AAC TAC 3'****5' TAC TAC TAY AAY AAT TAC 3'****Reverse:****5' RTT RTC YTC RTT DAT TTC 3'****5' RTT RTC YTC RTT DAT CTC 3'****5' NAR RTT RTG CAT NGG AAC 3'****5' NAR RTT RTG CAT NGG TAC 3'****5' NAR RTT RTG CAT NGG CAC 3'****5' NAR RTT RTG CAT NGG GAC 3'**

CHS (CHALCONA SINTASE)

Forward:

5' GAY YTN CGN GAA ATG ATG 3'

5' GAY YTN CGN GAG ATG ATG 3'

Reverse:

5' NN CAT RTT NCC RTA ATC 3'

5' NN CAT RTT NCC RTA TTC 3'

5' NN CAT RTT NCC RTA CTC 3'

5' NN CAT RTT NCC RTA GTC 3'

BAHD (ACILTRANSFERASE)

Forward:

5' TN GAY TTY GGN TGG AA 3'

5' TN GAY TTY GGN TGG AG 3'

5' TN GAY TTY GGN TGG GA 3'

5' TN GAY TTY GGN TGG GG 3'

5' CA RGT NWC NAA RTT YAA 3'

5' CA RGT NWC NAA RTT YAA 3'

Reverse:

Oligo-DT19

CCoAOMT (CAFEOL-CoA O-METILTRANSFERASE)

Forward:

5' TTT GTN GAY CGN GAC AAA 3'

5' TTT GTN GAY CGN GAC AAG 3'

5' TTT GTN GAY CGN GAT AAA 3'

5' TTT GTN GAY CGN GAT AAG 3'

Reverse:

Oligo-DT19

CCR (CINAMOIL-CoA REDUTASE)

Forward:

5' GAG AGG AAG TCC AAG ATC 3'

5' GCT TAT GCT TAG CTC AAC 3'

Reverse:

5' TGA GCA CAT TCA GAG TTC 3'

5' TCT CGA CCA ACT CAG TTC 3'

ACC (ACETIL-CoA CARBOXILASE)**Forward:****5` ATA ACC CGT TTG ATC GAG 3'****5` GTA TGC TAC TAA TAG ATC 3'****Reverse:****5` TTC GGC AAT AAT GAT ATC 3'**

AMINOÁCIDO	SÍMBOLO	SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS COM DEGENERECÊNCIA	SEQUENCIA COMPLEMENTAR (PARA DESENHO DE PRIMER "REVERSE")
METIONINA	M	ATG	TAC
TRIPTOFANO	W	TGG	ACC
CISTEÍNA	C	TGY	ACR
ÁCIDO ASPÁRTICO	D	GAY	CTR
ÁCIDO GLUTÂMICO	E	GAR	CTY
FENILALANINA	F	TTY	AAR
HISTIDINA	H	CAY	GTR
LISINA	K	AAR	TTY
ASPARAGINA	N	AAY	TTR
GLUTAMINA	Q	CAR	GTY
TIROSINA	Y	TAY	ATR
INOSINA	I	ATH	TAD
ALANINA	A	GCN	CGN
GLICINA	G	GGN	CCN
PROLINA	P	CCN	GGN
TREONINA	T	ACN	TGN
VALINA	V	GTN	CAN
LEUCINA	L	YTN	RAN
ARGININA	R	MGN	KCN
SERINA	S	WSN	WSN

CODIFICAÇÃO PARA PRIMERS DEGENERADOS

R = A + G

Y = C + T

M = A + C

K = G + T

S = G + C

W = A + T

H = A + T + C

D = G + A + T

B = G + T + C

V = G + A + C

N = A + T + G + C

Classificação de enzimas

A International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) classificou as enzimas em seis grandes grupos (Classes), de acordo com o tipo de reação que catalisam. Cada enzima descrita recebe um número de classificação, conhecido por “E.C.” (Enzyme Commission of the IUBMB), que é composto por 4 dígitos:

1. Classe
2. Sub-classe dentro da classe
3. grupos químicos específicos que participam da reação.
4. a enzima, propriamente dita

EXEMPLO: Quimotripsina: E.C. 3.4.21.1

3 → Classe = Hidrolase (catalisa reações de hidrólise de ligações covalentes)

4 → Sub-Classe = Peptidase (hidrolisa ligações peptídicas)

21 → Serino-endopeptidases (enzimas contendo serina no sítio ativo)

1 → quimotripsina

CLASSES:

- 1. Oxido-redutases:** São todas as enzimas que catalisam reações de oxidação-redução.
- 2. Transferases:** São enzimas que catalisam a transferência de grupos entre duas moléculas.
- 3. Hidrolases:** Catalisam a reação de hidrólise de várias ligações covalentes.
- 4. Liases:** Liases são enzimas que catalisam a clivagem de ligações C-C, C-O, C-N, entre outras, através de hidrólise ou oxidação.
- 5. Isomerases:** Catalisam a modificação de uma única molécula, sem participação de outra.
- 6. Ligases:** Catalisam reações de síntese de uma nova molécula a partir da ligação entre duas moléculas, com a concomitante hidrólise de ATP ou outro composto trifosfatado.

Fonte: <http://www2.bioqmed.ufrj.br/enzimas/classificacao.pdf> (Acessado em 11.11.11)