

Purificação parcial de prenilttransferases de *Piper aduncum* L (Piperaceae)

Andréia de A. Morandim^{1*} (PQ), Patricia A. Bersanetti² (PQ), Alberto J. Cavalheiro³ (PQ), Massuo J. Kato⁴ (PQ), Vanderlan da S. Bolzani³ (PQ), Adriana Carmona² (PQ) e Maysa Furlan³ (PQ)

¹Centro Universitário FEI - Av. Humberto de Alencar Castelo Branco, 3942 – 09850-901 – São Bernardo do Campo, SP, ²Departamento de Biofísica da UNIFESP - Rua Botucatu, 740 - 04023-900 - São Paulo, SP. ³NuBBE – Núcleo de Biossíntese, Bioensaios e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Instituto de Química da UNESP - C.P. 355 – 1800-900 – Araraquara, SP, ⁴Instituto de Química da USP, C.P. 26077 – 05599-970 – São Paulo, SP.

e-mail: andréia.morandim@gmail.com

Palavras Chave: *Piper aduncum*, prenilttransferase, purificação

Introdução

A espécie *Piper aduncum* tem sido muito estudada devido a inúmeras atividades biológicas, sendo que diversos entre os metabólitos secundários isolados os cromenos apresentaram atividade antifúngica e antitumoral. Uma análise preliminar de estrutura-atividade indicou a importância de grupamentos prenila. Devido ao fato dessas substâncias serem produzidas em baixa concentração pela espécie; estudos enzimológicos foram realizados visando purificar a enzima envolvida na prenilação de ácidos benzóicos em *P. aduncum* visando investigar suas características estruturais e funcionais.

Resultados e Discussão

O extrato enzimático das folhas de *P. aduncum* foi preparado segundo um protocolo estabelecido para prenilttransferases² que utiliza como substrato o cromeno 2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxilato de metila (**1**) (Fig. 1). Após a otimização de atividade [40 min, 38°C, tampão Kpi (0,5 molL⁻¹) pH 8, concentração de **1**: 0,42 mmol, concentração de DMAPP: 10 mmol] e horário de coleta (6 h da manhã)³, foram realizadas etapas preliminares para sua purificação. A primeira etapa consistiu de precipitação com acetona (40 % de saturação) e com (NH₄)₂SO₄ (80 % de saturação). Ambos os casos resultaram num incremento de atividade enzimática acima de 40 % (Fig. 2). A etapa preparativa fez uso da acetona na fase inicial de purificação e a fração ativa foi submetida a uma etapa de separação em FPLC. Nessa fase, utilizou-se uma coluna de interação hidrofóbica (Resource Phe de 1 mL), que não se mostrou efetiva, e também uma coluna trocadora de ânions (Resource Q de 6 mL) que possibilitou um aumento total de aproximadamente 60% na atividade enzimática quando comparada a conversão de **1** em **2** (Figura 2). Procedimento utilizado para acompanhar o aumento da atividade da enzima prenilttransferase.

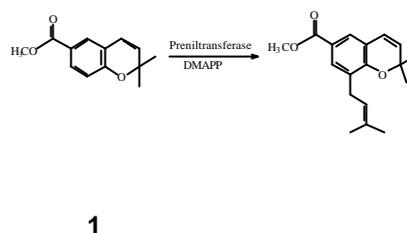


Figura 1. Conversão do cromeno 1 ao cromeno 2 pela ação da enzima prenilttransferase

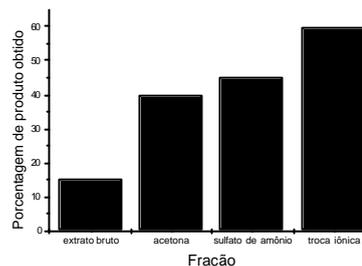


Figura 2: Aumento da atividade de prenilttransferases sob diversos tratamentos

Conclusões

Foi determinada a melhor condição inicial para a purificação da prenilttransferase em folhas de *P. aduncum*, sendo possível observar que a enzima foi obtida com um aumento significativo em sua pureza utilizando-se somente duas etapas e um potencial aumento da atividade enzimática, mostrando a eficiência do trabalho de purificação da enzima em estudo.

Agradecimentos

À FAPESP, BIOTA-FAPESP, CNPq/PADCT e CNPq pelas bolsas concedidas e projetos financiados e à FEI pela liberação e financiamento concedidos para a participação do congresso.

¹Baldoqui, D. C., Kato, M. J., Cavalheiro, A. J., Bolzani, V. S., Young, M. C. M. e Furlan, M., *Phytochemistry*, **1999**, 51, 899.

²Verpoorte, R., Zuurbier, K. M., Fung, SY. e Scheffer, J. C., *Phytochemistry*, **1998**, 49, 2315.

³Morandim, A. A., Bergamo, D. C. B., Kato, M. J., Cavalheiro, A. J., Bolzani, V. S., Furlan, M. *Phytochemical Analysis*, **2005**, 16, 282.