

Atividade da enzima Fenilalanina amônioliase (PAL) em *Penicillium brasilianum*, endofítico de *Melia azedarach*.

Taícia P. Fill¹ (PG)*, Bianca Ferreira da Silva (PG)¹, Edson Rodrigues Filho¹ (PQ)

taicia@gmail.com, edinho@pesquisador.cnpq.br

1. Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microorganismos (LaBioMMI) – UFSCa r- São Carlos-SP

Palavras Chave: Amidas Bis-fenilpropanoídicas, *Penicillium*, biossíntese, enzima PAL

eluentes MeOH e água com monitoramento do ácido cinâmico em 254nm.

Introdução

Fenilalanina amônioliase (PAL) é a primeira enzima chave no metabolismo dos fenilpropanóides, responsável pela desaminação da L-fenilalanina em ácido cinâmico. A enzima PAL representa uma das poucas enzimas não-hidrolíticas que possuem muitas aplicações comerciais, como no tratamento de neoplasmas de ratos, e na conversão de excessos venenosos de L-fenilalanina no sangue de fenilcetonúricos.

A rota biossintética para a formação de fenilpropanóides é ativa em plantas superiores, entretanto é muito rara em micro-organismos. Neste sentido, as amidas Brasilamida A, e B (Figura 1), produzidas pelo fungo *Penicillium brasilianum* isolada das raízes de *Melia azedarach* (Meliaceae)¹, são raros exemplos de bis-fenilpropanóides produzidos por micro-organismos e possuem a biossíntese investigada no trabalho.

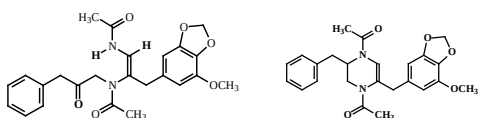


Figura 1: Estruturas moleculares das substâncias Brasilamida A e B respectivamente.

Resultados e Discussão

O trabalho teve como objetivo estudar a produção da enzima fenilalanina amônioliase (PAL), a primeira enzima presente na rota biossintética das amidas bis-fenilpropanoídicas, pelo fungo *Penicillium brasilianum* através do monitoramento por HPLC/UV e HPLC/UV-MS do ácido cinâmico produzido a partir do aminoácido L-fenilalanina. Para isso, inicialmente, o fungo foi cultivado de maneira estática em meio líquido Czapek enriquecido com 2% de extrato de levedura durante 5 dias. Em seguida, adicionou-se ao micélio tampão tris-HCl. Os ensaios enzimáticos foram realizados adicionando-se 50mL de L-fenilalanina (2,5mM) nos frascos que foram mantidos em agitação. A reação foi finalizada depois de 30 min., 1h, 2h, 12h, e 24h através da adição de HCl ao meio. Adicionou-se 5mL de etanol no intuito de extração do ácido cinâmico.

Inicialmente, foram estabelecidas as condições cromatográficas e as condições otimizadas para as análises por MS no modo negativo de ionização para o ácido cinâmico padrão (Figura 2) numa coluna ODS utilizando-se como

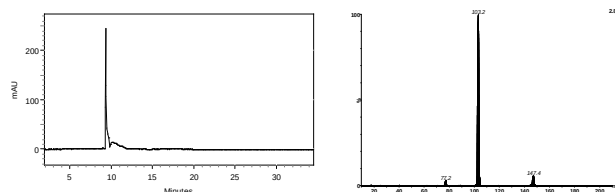


Figura 2: Cromatograma e espectro de íons produtos obtido para o ácido cinâmico padrão

Em seguida, os extratos referentes aos ensaios enzimáticos foram analisados e podem ser observados na figura 3 abaixo. Visualiza-se na figura a formação do ácido cinâmico a partir de Phe e conseqüente produção de PAL pelo fungo em estudo. Outra consideração importante observada no experimento proposto é o tempo de reação enzimática. A conversão pela enzima PAL ocorre em 30 minutos de reação, após este período, ou seja, nas extrações depois de 1h, 2h, 12h, e 24h houve degradação do composto.

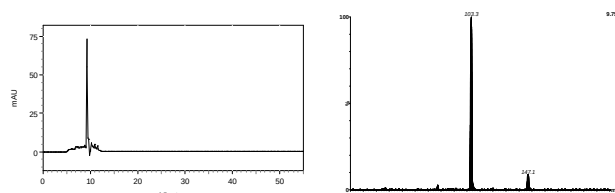


Figura 3: Cromatograma e espectro de íons produtos referente ao ensaio enzimático em 30min.

Dessa maneira, visualiza-se no metabolismo do fungo *P. brasilianum* a produção da enzima fenilalanina amônioliase (PAL) e verifica-se a rota biossintética das amidas bis-fenilpropanoídicas a partir do caminho dos fenilpropanóides.

Conclusões

Verificou-se a produção da enzima fenilalanina amônioliase (PAL) pelo microorganismo *P. brasilianum* através do monitoramento por HPLC/UV de ácido cinâmico.

Agradecimentos

Aos órgãos financiadores FAPESP, CAPES e CNPq

¹ Santos, M. R.G.; Tese de doutorado, programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2003,443pp

² Fujita, T.; Makishima, D.; Hayashi, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, 66(8), 3415