

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

PAULA GORGULHO DE CASTRO

**Exploração dos genes da família BAHD responsáveis pela síntese de compostos  
biotecnológicos dentro do contexto de uma biorrefinaria**

Lorena  
2019

PAULA GORGULHO DE CASTRO

**Exploração dos genes da família BAHD responsáveis pela síntese de compostos  
biotecnológicos dentro do contexto de uma biorrefinaria**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Escola de Engenharia de  
Lorena da Universidade de São Paulo para a  
obtenção do título de Engenheira Química.

Orientador:  
Prof. Dr. Elisson Antonio da Costa Romanel

Versão Original

Lorena

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado  
da Escola de Engenharia de Lorena,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Castro, Paula Gorgulho de

Exploração dos genes da família BAHD responsáveis pela síntese de compostos biotecnológicos dentro do contexto de uma biorrefinaria / Paula Gorgulho de Castro; orientador Elisson Antonio da Costa Romanel. - Lorena, 2019.

52 p.

Monografia apresentada como requisito parcial para a conclusão de Graduação do Curso de Engenharia Química - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2019

1. Biorrefinaria. 2. Expressão gênica. 3. Biocompostos. 4. Engenharia genética. 5. Bahd aciltransferase. I. Título. II. Romanel, Elisson Antonio da Costa , orient.

*Dedico este trabalho à minha família, amigos  
e mestres que sempre me incentivaram durante  
esta jornada.*

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria primeiramente de agradecer à Deus por estar sempre a frente da minha vida.

A minha família, e em especial aos meus pais, Francisco e Tânia, a quem devo toda minha formação, que nunca mediram esforços para que eu pudesse estudar. Por todo apoio, carinho e incentivo. Ao meu irmão Leonardo, por ser exemplo a ser seguido e a quem sempre me apoiou e motivou a ser uma pessoa melhor. Aos meus avós que sempre me mostraram o significado do amor. A todos os meus tios, tias, primos e primas por todos os momentos compartilhados, pela amizade e união.

Ao meu namorado, Abílio, por todo amor e por sempre me incentivar a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Ao meu orientador, prof. Dr. Elisson Romanel, pelas oportunidades desde meu segundo semestre de graduação. Por todos os ensinamentos, incentivos e por todo auxílio tanto na iniciação científica quanto na realização deste trabalho, sempre me incentivando a aprender mais sobre genética e biologia molecular.

Ao grupo do Laboratório de Genômica de Plantas e Bioenergia, desde que ele foi fundado, em especial a Amanda pela amizade de longos anos e contribuições ao projeto.

Aos meus amigos de Carmo de Minas e São Lourenço por sempre estarem presentes em minha vida desde a infância e me ajudarem a construir minha personalidade.

Aos meus amigos de Lorena, que estiveram presentes durante toda trajetória da Universidade, que sempre me apoiaram e tornaram Lorena uma segunda casa.

Aos meus amigos do Ciência sem Fronteiras, que compartilharam comigo um dos melhores e mais importantes momentos da minha vida.

À Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP) pela minha formação e à Monash University pela contribuição.

## RESUMO

**GORGULHO, P.C. Exploração dos genes da família BAHD responsáveis pela síntese de compostos químicos no contexto de uma biorrefinaria.** 2019. 52 p. Monografia (TCC) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

As emissões de gases de efeito estufa como dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>) e óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) decorrentes do consumo excessivo de derivados fósseis e das atividades humanas vêm causando mudanças climáticas e impactos ambientais. Por isso, pesquisadores têm dado destaque ao estudo de fontes alternativas para a redução do consumo de recursos não renováveis, visto a crescente necessidade de substituição de combustíveis e produtos de origem fóssil. Nesse contexto, as biorrefinarias podem ser uma opção interessante já que produzem, de forma integrada, produtos biotecnológicos que são oriundos da conversão de biomassa. Assim, os sistemas biológicos podem expandir a diversidade química de produtos naturais, pois muitas vezes a complexidade estrutural desses produtos dificulta sua obtenção por rota química. As plantas produzem uma ampla variedade de compostos químicos que apresentam grande importância econômica. Estes compostos estão ligados a características importantes do próprio vegetal, por exemplo, cor ou fragrância de flores, sabor e cor dos alimentos e resistência contra pragas e doenças, mas também para a produção de produtos químicos como drogas, antioxidantes, sabores, fragrâncias, corantes, inseticidas e feromônios. Entretanto, muitas vezes, esses compostos estão disponíveis em pequenas quantidades ou são de difícil extração. Nesse contexto, as possibilidades de modificação genética abriram perspectivas para a exploração e modificação biossintética de plantas e células vegetais. BAHD aciltransferases estão envolvidas na síntese e elaboração de uma ampla variedade de metabólitos. Pesquisas anteriores mostraram que as proteínas caracterizadas dessa família se enquadram em cinco grandes clados e contêm dois motivos proteicos conservados. Nesse presente trabalho foi realizado a identificação e exploração de genes da família BAHD aciltransferases responsáveis pela síntese de compostos biotecnológicos de valor agregado pela indústria como alternativa aos derivados de petróleo. Também foi realizada uma revisão bibliográfica sobre a estrutura química e aplicações dos diversos compostos pertencentes aos diferentes clados da família BAHD. Exemplos de análise econômica de alguns compostos como antocianina e ácidos hidroxicinâmicos para análise da viabilidade de produção em larga escala destes metabólitos secundários foram abordados. Por último, foi realizada a filogenia entre sequências BAHD já caracterizadas, arroz e *Arabidopsis*, classificando-as em oito clados e prevendo funções gênicas ainda não caracterizadas.

**Palavras-chaves:** Biorrefinaria, expressão gênica, biocompostos, engenharia genética, BAHD

## ABSTRACT

**GORGULHO, P.C. Exploration of BAHD family genes responsible for the synthesis of chemical compounds in the context of a biorefinery.** 52p. Monography work (TCC) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

Greenhouse gas emissions such as carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), methane (CH<sub>4</sub>) and nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) from the excessive consumption of fossil derivatives and human activities have been causing climate change and environmental impacts. Therefore, researchers have emphasized the study of alternative sources to reduce the consumption of non-renewable resources, given the growing need for substitution of fossil fuels and products. In this context, biorefineries can be an interesting option since they produce, in an integrated way, biotechnological products that come from biomass conversion. Thus, biological systems can expand the chemical diversity of natural products, as their structural complexity often makes them difficult to obtain by chemical route. Plants produce a wide variety of chemical compounds that have great economic importance. These compounds are linked to important characteristics of the plant itself, for example flower color or fragrance, taste and color of food and resistance against pests and diseases, but also for the production of chemicals such as drugs, antioxidants, flavors, fragrances, colorings, insecticides and pheromones. However, these compounds are often available in small quantities or difficult to extract. In this context, the possibilities of genetic modification opened perspectives for the exploration and biosynthetic modification of plants and plant cells. BAHD acyltransferases are involved in the synthesis and elaboration of a wide variety of metabolites. Previous research has shown that characterized proteins of this family fall into five major clades and contain two conserved protein motifs. In this work we identified and explored genes from the family BAHD acyltransferases responsible for the synthesis of value-added biotechnological compounds by the industry as an alternative to petroleum derivatives. A literature review was also performed on the chemical structure and applications of the various compounds belonging to the different clades of the BAHD family. Examples of economic analysis of some compounds such as anthocyanin and hydroxycinnamics for analysis of the viability of large scale production of the secondary metabolites analyzed. Finally, a phylogenetic tree was constructed between the already characterized BAHD sequences, rice and Arabidopsis, classifying them into eight clades and predicting uncharacterized genetic functions.

**Keywords:** Biorefinery, gene expression, biocompounds, genetic engineering, BAHD

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> - Esquema de biorrefinaria ilustrando as indústrias primárias de transformação produzindo produtos agroindustriais usados como matéria-prima pelas indústrias secundárias de transformação com aplicações em numerosos setores industriais..... | 17 |
| <b>Figura 2</b> - Mecanismo de acilação catalisado por BAHD aciltransferases.....   | 20 |
| <b>Figura 3</b> - Filogenia de proteínas BAHD aciltransferases .....  | 21 |
| <b>Figura 4</b> - Estrutura química das antocianinas.....   | 30 |
| <b>Figura 5</b> - Equilíbrio das antocianinas em solução aquosa.....  | 31 |
| <b>Figura 6</b> - Via de formação do triacilglicerol .....  | 33 |
| <b>Figura 7</b> - Esquema de síntese de ácido hidroxicinâmico.....  | 36 |
| <b>Figura 8</b> - Representação esquemática de duas formas isoméricas diferentes de ácido ferúlico encontradas na natureza (a) conformação cis e (b) conformação trans de ácido ferúlico. ....  | 38 |
| <b>Figura 9</b> - Representação esquemática do ácido sinápico.....  | 40 |
| <b>Figura 10</b> - Efeito do preço de venda de antocianina no custo de produção de etanol no processo de moagem a seco utilizando milho roxo .....  | 44 |



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Rendimentos anuais do processo durante o processamento de moagem a seco de milho amarelo e milho colorido (Extração de SO<sub>2</sub> para milho colorido).....43

**Tabela 2** – Quantidade de sequências transferases encontradas em Arabipsis e arroz total e por clado .....46

## LISTA DE QUADROS

|   |    |
|---|----|
| <b>Quadro 1-</b> Identificação e anotação dos genes da família BAHD caracterizados na literatura..... | 23 |
| <b>Quadro 2</b> - Valores de ácidos hidroxicinâmicos disponibilizados na Sigma-Aldrich.....           | 45 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|      |   |
|------|---|
| AAT  | Antocianina aciltransferase                       |
| AC   | Ácido caféico                                     |
| ACT  | Agmatina coumaroiltransferase                     |
| AF   | Ácido ferúlico                                    |
| AHCT | Antocianina O-hidroxicinamoiltransferase          |
| AP   | Ácido <i>p</i> -cumárico                          |
| AR   | Ácido Rosmarínico                                 |
| AS   | Ácido sinápico                                    |
| BEAT | Benzil álcool O-acetiltransferase                 |
| DDGS | Grãos Secos de Destilaria com Solúveis            |
| DAG  | Diacilglicerol                                    |
| DAT  | Deacetilvindoline 4-O-acetiltransferase           |
| HCAs | Ácidos hidroxicinâmicos                           |
| HCBT | Antranilato N-hidroxicinamoil/ benzoiltransferase |
| HCTs | <i>Hydroxycinnamoyl transferases</i>              |
| HQT  | <i>Hydroxycinnamate-CoA quinate transferase</i>   |
| TAG  | Triacilglicerol                                   |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>13</b> |
| 1.1 Contextualização e justificativa .....  | 13        |
| 1.2 Objetivos .....   | 14        |
| 1.2.1 Objetivo Geral.....   | 14        |
| 1.2.2 Objetivos específicos .....   | 14        |
| 1.3 Estrutura do projeto de monografia .....  | 14        |
| <b>2 METODOLOGIA.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>  | <b>16</b> |
| 3.1 Biorrefinaria.....  | 16        |
| 3.2 Conceitos e desafios da engenharia genética .....   | 18        |
| 3.3 Descrição da família gênica BAHD aciltransferase .....  | 19        |
| 3.4 Análise filogenética e principais clados da família BAHD .....  | 20        |
| 3.5 Estudo dos principais compostos sintetizados pela família BAHD.....   | 22        |
| 3.5.1 Antocianinas (Clado IA).....  | 29        |
| 3.5.2 Síntese de Triacilglicerol (Clado IB).....  | 32        |
| 3.5.3 Ácido graxos de cadeia longa (Clado II) .....   | 33        |
| 3.5.4 Modificação de alcaloides e ésteres voláteis (Clado III) .....  | 34        |
| 3.5.5 Produção de conjugados de ácido hidroxicinâmico (Clado V).....  | 35        |
| 3.5.6 Síntese de ésteres de álcool benzoato .....   | 42        |
| 3.6 Análise Econômica dos produtos sintetizados pela família BAHD no contexto de uma biorrefinaria .....  | 42        |
| 3.6.1 Estudo de viabilidade econômica de antocianinas.....  | 42        |
| 3.6.1 Estudo de viabilidade econômica de ácidos hidroxicinâmicos.....   | 44        |
| 3.7 Identificação, anotação e análise filogenética dos genes da superfamília BAHD aciltransferases em <i>Arabidopsis thaliana</i> e <i>Oryza sativa</i> ..... | 46        |
| <b>4 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>  | <b>48</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Para a compreensão do assunto a ser discutido nesse trabalho, neste capítulo serão apresentados os principais temas relacionados a este e também a justificativa e objetivos dessa monografia.

### 1.1 Contextualização e justificativa

Uma parcela considerável da energia e de compostos químicos produzidos atualmente no planeta é obtida de fontes não renováveis. De acordo com a comunidade científica, as emissões de gases de efeito estufa como dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), metano ( $\text{CH}_4$ ) e óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) decorrentes do consumo excessivo de derivados fósseis e das atividades humanas vem causando mudanças climáticas. O aumento contínuo ou a instabilidade nos preços dos recursos fósseis, sua possível indisponibilidade e preocupações ambientais reforçam a necessidade de alternativas capazes de suprir a demanda produtiva e energética global. A substituição de petróleo por biomassa como matéria-prima para a produção de combustíveis e produtos químicos é uma opção interessante e é a força motriz para o desenvolvimento de complexos de biorrefinaria (CHERUBINI, 2010).

As biorrefinarias consistem na produção integrada de produtos biotecnológicos oriundos da conversão de biomassa. Esse conceito é similar às refinarias de petróleo, onde múltiplos produtos são obtidos de uma única matéria-prima. As biorrefinarias podem ser classificadas de acordo com tipo de plataforma utilizada, os tipos de produtos a serem produzidos, as matérias-primas e os processos de conversão.

Segundo Jin e colaboradores (2018), as matérias-primas oriundas de biomassa, os produtos finais e rotas que convertam biomassa em produtos de interesse são de extrema importância no contexto de uma biorrefinaria. Um exemplo é a síntese de produtos biotecnológicos através da exploração da engenharia genética. Os sistemas biológicos podem expandir a diversidade química de produtos naturais, pois muitas vezes a complexidade estrutural desses produtos torna sua obtenção por rota química desafiadora.

Nesse trabalho é proposto a identificação de genes da família BAHD aciltransferase responsáveis pela síntese de compostos biotecnológicos e sua exploração dentro do contexto de uma biorrefinaria. Aciltransferases BAHD são enzimas presentes nos vegetais que catalisam a transferência de doadores ativados por coenzima A que incluem acetil-CoA,  $\beta$ -fenilalanina-CoA, malonil-CoA, tigil-CoA, antranilil-CoA, benzoil-CoA e (hidroxi)

cinamoil-CoA - em vários tipos de moléculas aceptoras (D'AURIA, 2006). As BAHD aciltransferases são responsáveis pela síntese de diversos metabólitos secundários de interesse industrial como antocianina, flavonóides, ácidos graxos de cadeia longa e ácidos hidroxicinâmicos. Entretanto, a exploração de genes da família BAHD na síntese de compostos químicos em gramíneas ainda é pouco explorado, sendo necessário um estudo mais detalhado para a melhor compreensão de seu funcionamento e aplicações na indústria química.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo Geral**

O objetivo desse trabalho consiste na identificação e exploração de genes da família BAHD responsáveis pela síntese de compostos biotecnológicos de valor agregado para a indústria.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Revisar e explorar os potenciais genes da família BAHD que sintetizam compostos de valor agregado para a indústria química;
- Estudar a aplicação econômica dos compostos sintetizados pela família BAHD;
- Identificar os potenciais genes da família BAHD em *Arabidopsis* e arroz através de técnicas de bioinformática.

## **1.3 Estrutura do projeto de monografia**

O presente trabalho de conclusão de curso encontra-se organizado em quatro capítulos. No primeiro capítulo, contextualizou-se e justificou-se o projeto. O capítulo também inclui os objetivos a serem alcançados e a estrutura do trabalho. No segundo capítulo, descreveu-se a metodologia utilizada para o desenvolvimento deste projeto. No terceiro capítulo, foi apresentada uma revisão bibliográfica com conceitos gerais de biorrefinaria, a descrição da família BAHD e a análise filogenética assim como aplicação dos produtos finais de interesse sintetizados pela superfamília BAHD organizados por clado. No último capítulo, apresentou-se a conclusão do trabalho e as perspectivas futuras.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Metodologia Científica de Pesquisa

Para execução desse projeto foi realizada uma extensiva revisão bibliográfica sobre as potenciais aplicações dos produtos sintetizados pelos genes da família BAHD aciltransferase através de artigos, teses de mestrado e doutorado e banco de dados. Adicionalmente a pesquisa bibliográfica, em trabalhos anteriores realizados pelo grupo do Laboratório de Genômica de Plantas e Bioenergia localizado na EEL-USP, ocorreu a identificação dos genes da família BAHD conduzida através de bioinformática em larga escala em Arroz (*Oryza sativa*) e na eudicotiledônea modelo *Arabidopsis thaliana*). Para identificação das sequências de arroz foram baixados os bancos genômicos e de proteínas preditas dessas espécies, disponibilizados no site phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). A busca foi feita inicialmente por meio dos *softwares* BLASTn e BLASTp, utilizando como isca sequências transferases já identificadas na literatura. Todas as proteínas identificadas tiveram domínio verificado pelo PFAM v30.0 (EL-GEHALI et al., 2019). Nesse estudo, as sequências obtidas na etapa anterior foram anotadas, alinhadas através do *software* MUSCLE (*Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*) e submetidas à análise filogenética pelo método *Neighbor joining* no *software* MEGA X, para a classificação dos genes nos respectivos clados e sua possível identificação funcional.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Biorrefinaria

Com o esforço da comunidade científica para o desenvolvimento de novas tecnologias baseadas em fontes renováveis em detrimento de recursos fósseis, diversos países têm estudado e empregado o conceito de biorrefinaria. Existem diversas definições para o termo biorrefinaria, porém uma das mais utilizadas foi descrita pela *IEA Bioenergy Task 42 Biorefineries*: "Biorrefinaria é o processamento sustentável de biomassa em um espectro de produtos comercializáveis e energia". Portanto, uma biorrefinaria é uma rede de instalações que permite a integração de processos, tecnologias, equipamentos para a conversão de biomassa em biocombustíveis, energia e produtos químicos. Esse conceito é similar às refinarias de petróleo que produzem vários combustíveis e produtos químicos a partir de uma única fonte, o petróleo, porém com visão de sustentabilidade ecossistêmica (CHERUBINI, 2010).

As biorrefinarias podem explorar o potencial máximo de biomassa ao produzirem diversos produtos, agregando o maior valor possível a estes, com o aumento da rentabilidade, redução de demanda energética e diminuição de emissão de gases que causam o efeito estufa (RICO; SAUER, 2015).

De forma similar ao petróleo bruto, as plantas são compostas de um grande número de moléculas distintas. Os constituintes das plantas podem ser extraídos e funcionalizados para produzir frações não alimentares e alimentares, produtos intermediários agroindustriais e de interesses para a indústria química, farmacêutica e de cosméticos, cujo valor é geralmente inversamente proporcional ao seu volume. Carboidratos, lignina, proteínas e gorduras constituem 95% da composição das plantas. Os demais 5% são constituídos por vitaminas, corantes, aromas ou outras moléculas pequenas que também são considerados na biorrefinaria, devido ao seu alto valor agregado. Com base nos componentes da biomassa, diferentes biorrefinarias podem ser projetadas como as de açúcares (amido e sacarose), lignocelulose e lipídios, sendo principais fontes de moléculas de carbono (THOMAS; OCTAVE, 2009).

A Figura 1 descreve o esquema global de produção de biorrefinarias, incluindo os setores primários e secundários de transformação.



**Figura 1** - Esquema de biorrefinaria ilustrando as indústrias primárias de transformação produzindo produtos agroindustriais usados como matéria-prima pelas indústrias secundárias de transformação com aplicações em numerosos setores industriais.



Fonte: Adaptado de (THOMAS; OCTAVE, 2009).

Inicialmente, a biomassa sofre um processo de transformação, ocorrendo a separação ou extração de componentes da planta por trituração seguida de um fracionamento através de tecnologias biológicas e/ou físico-químicas. O objetivo deste passo é liberar moléculas que passarão por um segundo tratamento que consiste em uma funcionalização de extratos de biomassa. Isso leva a produtos agroindustriais considerados intermediários em muitos setores industriais. A formulação desses intermediários leva ao desenvolvimento de um grande número de produtos biológicos que podem ser separados

em quatro categorias. Em volume, o biocombustível como o etanol e o biodiesel representa um valor considerável. As moléculas derivadas de biomassa representam um grande potencial para produção de intermediários químicos que estão sendo considerados a base de uma nova química, já que substituem os derivados fósseis. Compostos com alto valor agregado também estão incluídos nesta categoria. As fibras e polímeros vegetais são os elementos elementares de uma grande família de materiais de base biológica. Fibras podem ser incorporadas em compósitos para substituir materiais como o vidro e as fibras de carbono. Biopolímeros podem ser usados como matriz em compósitos. O objetivo final é obter compósitos com fibra e matriz vegetal com propriedades mecânicas e características semelhantes ou superiores aos compósitos tradicionais. A última categoria diz respeito às indústrias de alimentos, também inseridas no contexto de biorrefinaria (THOMAS; OCTAVE, 2009).

### **3.2 Conceitos e desafios da engenharia genética**

As plantas produzem uma ampla variedade de compostos químicos que apresentam grande importância econômica. Estes compostos estão ligados a características importantes do próprio vegetal, por exemplo, cor ou fragrância de flores, sabor e cor dos alimentos e resistência contra pragas e doenças, mas também para a produção de produtos químicos como drogas, antioxidantes, sabores, fragrâncias, corantes, inseticidas e feromônios. Particularmente, as possibilidades de modificação genética abriram perspectivas para a exploração biossintética de plantas e células vegetais. A engenharia genética vem apresentando os seguintes desafios (VERPOORTE et al., 1999):

- Aumento da produtividade de produtos químicos finos não derivados de petróleo;
- Novos compostos para rastreio da atividade biológica;
- Novas cores de flores ou cores de alimentos;
- Novos sabores ou fragrâncias alimentícias e aumento do efeito nutricional;
- Níveis reduzidos de compostos indesejáveis (por exemplo, tóxicos, antifúngicos);
- Melhor resistência contra pragas e doenças.

Dessa forma, a engenharia genética tem contribuído para o aumento da produtividade assim como facilitado a extração de alguns compostos. Técnicas de engenharia genética estão sendo utilizadas para modificar propriedades da biomassa e aumentar a produção de etanol. Uma estratégia é modificar as características e propriedades do amido ou da lignocelulose para que possam ser convertidos mais rapidamente nos produtos desejados. A

outra estratégia é introduzir enzimas de conversão de biomassa em plantas para que elas possam ajudar no processo de conversão mais efetivamente (TORNEY et al., 2007).

### 3.3 Descrição da família gênica BAHD aciltransferase

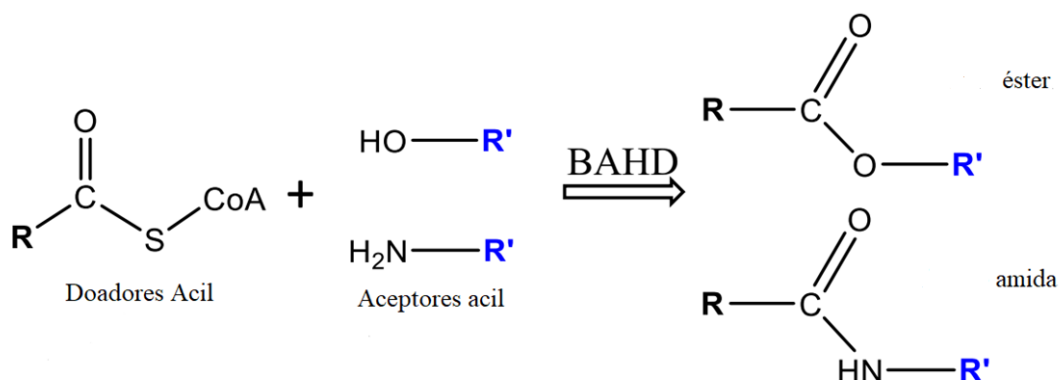
A acilação enzimática é uma reação de substituição que está diretamente envolvida na diversificação de substâncias naturais produzidas pelo metabolismo secundário das plantas. Um grande número de moléculas pequenas, abrangendo a maioria das classes de metabólitos secundários, estão sujeitos a transferência de grupo O, N, C ou S-acil. Além de pequenas moléculas, a acilação de polissacarídeos e proteínas produz macromoléculas com várias propriedades reguladoras (ST-PIERRE; LUCA, 2000).

Aciltransferases catalisam a transferência de grupos acila de uma molécula doadora ao grupo hidroxila, amino ou tiol de uma molécula aceptora para produzir um derivado de éster acílico. Diferentes classes de aciltransferases foram identificadas como 1-O-acilglucosídeos, acil coenzima A, proteína transportadora acilada-acil e éster do ácido quínico. Entre eles, os ésteres da coenzima A atuam como doadores acil no grupo mais abundante de aciltransferases que catalisam diversas reações envolvidas no metabolismo primário e secundário (ST-PIERRE; LUCA, 2000).

O nome desta superfamília gênica foi proposto após a caracterização funcional de quatro membros encontrados em espécies distintas de eudicotiledôneas: BEAT ou benzil álcool O-acetiltransferase da *Clarkia breweri*; AHCTs ou antocianina Ohidroxicinamoiltransferase de *Petunia*; HCBT ou antranilato N-hidroxicinamoil/benzoiltransferase de *Dianthus caryophyllus* e DAT ou deacetilvindoline 4-O-acetiltransferase de *Catharanthus roseus* (ST-PIERRE; LUCA, 2000).

BAHD aciltransferases são enzimas presentes nos vegetais que catalisam a transferência de doadores ativados por coenzima A que incluem acetil-CoA,  $\beta$ -fenilalanina-CoA, malonil-CoA, tigil-CoA, antranilil-CoA, benzoíla CoA e (hidroxi) cinamoil-CoA em diversos tipos de moléculas aceitadoras. BAHDs catalisam O ou N-acilação de aceitadores pela acilação de seus grupos hidroxilas (OH) ou amina (NH<sub>2</sub>), respectivamente, com CoA doadores (Figura 2). Nas plantas, essas enzimas participam da síntese de uma ampla gama de polímeros e metabólitos secundários como cutina, suberina, lignina, voláteis, pigmentos e compostos de defesa (EUDES et al., 2016).

**Figura 2-** Mecanismo de acilação catalisado por BAHD aciltransferases

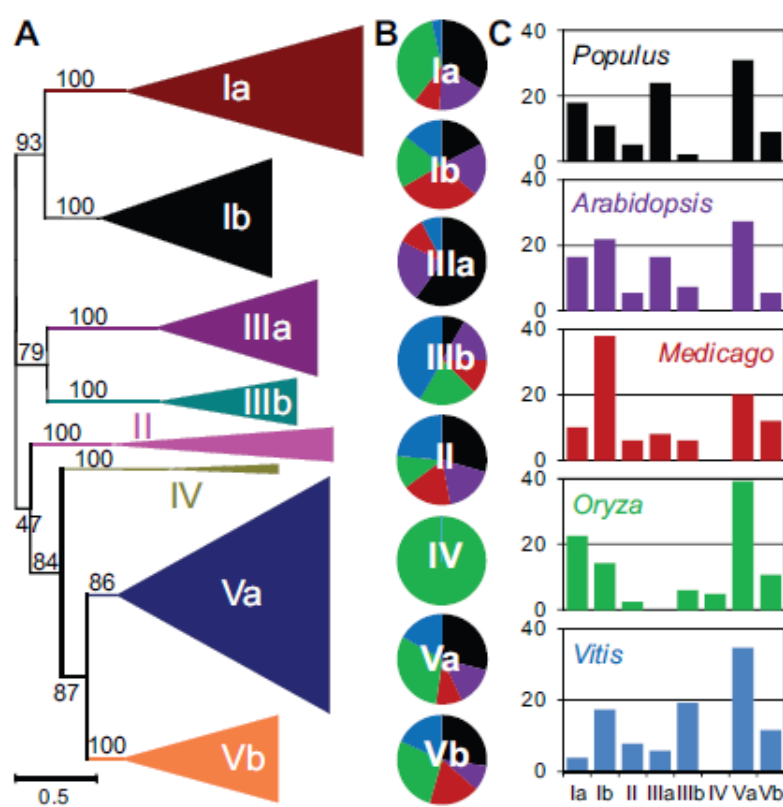


Fonte: Adaptado de (EUDES et al., 2016).

### 3.4 Análise filogenética e principais clados da família BAHD

Diversos estudos utilizaram alinhamentos de proteínas seguido por análises filogenéticas para revelar a evolução de função dentro da família BAHD, e prever possíveis substratos para enzimas que não foram caracterizadas bioquimicamente. Uma análise dos membros da família BAHD até então identificados mostrou a presença de cinco grandes clados, conforme relatado por D'Auria et al. (2006), com aplicações de interesse biotecnológico distintos. Estes clados podem ser classificados pelo tipo de substrato usado ou pelas condições sob as quais os genes e as enzimas que eles codificam estão ativas. Recentemente, estudos filogenéticos, baseados nas sequências BAHD de quatro eudicotiledôneas, *Arabidopsis*, *Populus* (álamo), *Medicago* (luzerna cortada), *Vitis* (uva) e *Oryza* (arroz) ampliaram essa divisão para oito clados (Ia, Ib, II, IIIa, IIIb, IV, Va e Vb) (Figura 3) (TUOMINEN; JOHNSON; TSAI, 2011).

**Figura 3** - Filogenia de proteínas BAHD aciltransferases



Legenda: A- Filogenia inferida pela máxima verossimilhança, B- Gráfico da quantidade de genes de cada espécie, por clado. As cores representam as espécies em C. C- Gráfico da quantidade de genes em cada clado, por espécie.

Fonte: (TUOMINEN et al., 2011).

O clado I consiste inteiramente de membros da família BAHD que estão envolvidos na modificação de glicosídeos fenólicos, predominantemente antocianinas, embora, o gene *NtMAT1*, membro deste clado, está envolvido na produção de naftol malonilado e glucósidos flavonoides no tabaco (D'AURIA, 2006).

Os dois membros conhecidos do clado II são *Glossy2* encontrado em milho (*Z. mays*) e *CER2* em *Arabidopsis* (*A. thaliana*). Estas enzimas estão envolvidas na extensão de ceras epicuticulares de cadeia longa que são importantes para controlar a perda de água dos tecidos aéreos e para auxiliar na defesa contra patógenos (D'AURIA, 2006).

A maioria dos membros da superfamília BAHD classificada no clado III utiliza uma gama diversificada de substratos alcoólicos, embora a maioria destas enzimas utiliza acetil-

CoA como principal doador de acilo. Uma subfamília dentro do clado inclui BAHD Acetiltransferases que estão envolvidas na modificação de compostos alcalóides, como o vindoline e o precursor da morfina thebaine (D'AURIA, 2006).

As análises filogenéticas sugeriram que o clado IV é específico de gramíneas e apenas uma sequência foi caracterizada em cevada, que utiliza amina como substrato.

O clado Va pode ser dividido em subgrupos, que aceitam diferentes substratos. Um deles participa da síntese de ésteres voláteis, enquanto outro é o clado de Mitchell, relacionado à incorporação dos ácidos hidroxicinâmicos. Já o clado Vb consiste de enzimas que usam hidroxicinamoil coA e benzoil coA como doadores de acila (*HCT/HQT*), que participam da via de biossíntese da lignina (TUOMINEN; JOHNSON; TSAI, 2011).

A maior parte das enzimas BAHD apresenta dois motivos conservados: HXXXD e DFGWG, sendo o primeiro fundamental para a atividade catalítica (D'AURIA, 2006). Tuominen e colaboradores (2011), em análise para a identificação de motivos conservados nos oito clados através de bioinformática, não identificaram o motivo conservado HXXXD, podendo ter ocorrido provavelmente, em vista da variação do resíduo X. Entretanto, o motivo DFGWG foi encontrado nos oito clados. Outros motivos conservados também foram identificados, assim como motivos específicos oriundos de cada clado (TUOMINEN; JOHNSON; TSAI, 2011).

### **3.5 Estudo dos principais compostos sintetizados pela família BAHD**

Estudos têm demonstrado que BAHD aciltransferases catalisam a formação de metabólitos com variadas aplicações. O quadro 1 identifica os principais genes e os produtos formados pela família BAHD aciltransferase já caracterizados na literatura.

**Quadro 1**-Identificação e anotação dos genes da família BAHD caracterizados na literatura

| BAHD Aciltransferases caracterizadas |                       |                                  |       |                                   |
|--------------------------------------|-----------------------|----------------------------------|-------|-----------------------------------|
| Gene                                 | Produto formado       | Espécie                          | Clado | Referência                        |
| <b>Clado I</b>                       |                       |                                  |       |                                   |
| Gt5AT                                | Antocianina           | <i>Gentiana triflora</i>         | Ia    | Fujiwara et al. (1998)            |
| Dv3MAT                               | Antocianina           | <i>Dahlia variabilis</i>         | Ia    | Suzuki et al. (2002)              |
| Sc3MaT                               | Antocianina           | <i>Senecio cruentus</i>          | Ia    | Suzuki et al. (2003)              |
|                                      | Antocianina           | <i>Dendranthema x morifolium</i> | Ia    | Suzuki et al. (2004b)             |
| Dm3MAT1                              |                       |                                  |       |                                   |
| Dm3MAT2                              | Antocianina           |                                  | Ia    |                                   |
| Dm3MAT3                              | Antocianina           |                                  | Ia    |                                   |
| NtMAT1                               | Flavonoides           | <i>Nicotiana tabacum</i>         | Ia    | Taguchi et al. (2005)             |
| Vh3MAT1                              | Flavonol              | <i>Verbena 9 hybrida</i>         | Ia    | Suzuki et al. (2004a)             |
| Lp3MAT1                              |                       | <i>Lamium purpureum</i>          | Ia    | Suzuki et al. (2004a)             |
| Pf3AT                                | Antocianina           | <i>Perilla frutescens</i>        | Ia    | Yonekura-Sakakibara et al. (2000) |
| Ss5MaT1                              | Antocianina           | <i>Salvia splendens</i>          | Ia    | Suzuki et al. (2001)              |
| Ss5MaT2                              | Antocianina           | <i>Salvia splendens</i>          | Ia    | Suzuki et al. (2004c)             |
| Pf5MaT                               | Antocianina           | <i>Perilla frutescens</i>        | Ia    | Suzuki et al. (2001)              |
| At5Mat                               | Antocianina           | <i>Arabidopsis thaliana</i>      | Ia    | D'Auria et al. (2007)             |
| At3At1                               | Antocianina, flavonol | <i>Arabidopsis thaliana</i>      | Ia    | Luo et al. (2007)                 |
| At3At2                               | Antocianina, flavonol | <i>Arabidopsis thaliana</i>      | Ia    | Luo et al. (2007)                 |
| GmIF7MaT                             | Isoflavona            | <i>Glycine max</i>               | Ia    | Suzuki et al. (2007)              |

|         |   |                             |    |                          |
|---------|---|-----------------------------|----|--------------------------|
| MtMat1  | Isoflavona, flavononas                                  | <i>Medicago truncatula</i>  | Ia | Yu et al. (2008)         |
| MtMat2  |   |                             | Ia |                          |
| MtMat3  |   |                             | Ia |                          |
| MaT4    | isoflavonas, flavononas, flavonóis                      | <i>Medicago truncatula</i>  | Ia | Zhao et al. (2011)       |
| MaT5    | antocianinas  |                             |    |                          |
| MaT6    |   |                             |    |                          |
| AtPMat1 | Nafitóis, flavonóis, coumarins,<br>phenils, isoflavonas |                             | Ia |                          |
| AtPMat2 |   |                             |    |                          |
| GM7MAT  | Isoflavona, flavononas                                  |                             | Ia | Dhaubhadel et al. (2008) |
| AtACT   | Agmatina hidroxicinamoil                                | <i>Arabidopsis thaliana</i> | I  | Muroi et al. (2009)      |

### Clado II

|           |                                     |                             |    |   |
|-----------|-------------------------------------|-----------------------------|----|---|
| ZmGlossy2 |                                     | <i>Zea mays</i>             | II |   |
| AtCER2    | Ácidos graxos de cadeia muito longa | <i>Arabidopsis thaliana</i> | II | <a href="https://www.uniprot.org/uniprot/Q39048">https://www.uniprot.org/uniprot/Q39048</a> |

### Clado III

|        |   |                             |      |   |
|--------|---|-----------------------------|------|---|
| CaPun1 |   | <i>Capsicum annuum</i>      | IIIa | <a href="https://www.uniprot.org/uniprot/Q58VS8">https://www.uniprot.org/uniprot/Q58VS8</a> |
| CrDAT  | Vindolina   | <i>Catharanthus roseus</i>  | IIIa | <a href="https://www.uniprot.org/uniprot/Q9ZTK5">https://www.uniprot.org/uniprot/Q9ZTK5</a> |
| CrMAT  | (+) - minovincinina em (+) - ecitovenina              | <i>Catharanthus roseus</i>  | IIIa | <a href="https://www.uniprot.org/uniprot/Q8GZU0">https://www.uniprot.org/uniprot/Q8GZU0</a> |
| CmAAT4 |   | <i>Cucumis melo</i>         | IIIa | <a href="https://www.uniprot.org/uniprot/Q512Q4">https://www.uniprot.org/uniprot/Q512Q4</a> |
| RhAAT1 | Acetil CoA geraniol / citronelol<br>acetiltransferase | <i>Rosa hybrid cultivar</i> | IIIa | <a href="https://www.uniprot.org/uniprot/Q516B5">https://www.uniprot.org/uniprot/Q516B5</a> |
| FaSAAT | Álcool aciltransferase                                | <i>Fragaria ananassa</i>    | IIIa | <a href="https://www.uniprot.org/uniprot/Q9FVF1">https://www.uniprot.org/uniprot/Q9FVF1</a> |
| FvVAAT |   |                             | IIIa |   |



|         |                             |                           |      |   |
|---------|-----------------------------|---------------------------|------|---|
| CbBEAT  | Álcool benzílico            | <i>Clarkia breweri</i>    | IIIa | <a href="https://www.uniprot.org/uniprot/O64988">https://www.uniprot.org/uniprot/O64988</a> |
| PsSalAT | (7S) -O-acetilsalutaridinol | <i>Papaver somniferum</i> | IIIa | Grothe et al. (2001)  |
| RsVISY  |                             |                           | IIIa |   |
| PhCFAT  |                             | <i>Petunia hybrida</i>    | IIIb | <a href="https://www.uniprot.org/uniprot/A1XWY7">https://www.uniprot.org/uniprot/A1XWY7</a> |

**Clado IV**

|       |                        |                        |    |                        |
|-------|------------------------|------------------------|----|------------------------|
| HvACT | Agmatina hidroxinamoil | <i>Hordeum vulgare</i> | IV | Burhenne et al. (2003) |
|-------|------------------------|------------------------|----|------------------------|

**Clado V**

|      |                             |                             |    |                             |
|------|-----------------------------|-----------------------------|----|-----------------------------|
| SHT  | Espermidina hidroxicinamoil | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Vb | Grienenberger et al. (2009) |
| AT1  | Cafeoilputrescina           | <i>Nicotiana attenuata</i>  |    | Onkokesung et al. (2012)    |
| DH29 | Cafeoil esperdimina         |                             |    |                             |

|        |                                  |                             |    |                              |
|--------|----------------------------------|-----------------------------|----|------------------------------|
| CbBEBT | Benzoato de Benzila              | <i>Clarkia breweri</i>      | Va | D'Auria et al. (2002)        |
| NtBEBT |                                  | <i>Nicotiana tabacum</i>    |    |                              |
| PhBPBT | Benzoato/Feniletileno de Benzila |                             | Va |                              |
| PtSABT | Benzoato salílico                | <i>Populus trichocarpa</i>  | V  | Chedgy et al. (2015)         |
| PtBEBT | Benzoato de Benzila              |                             |    |                              |
| AtHHT  | Suberina                         | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Va | Gou et al. (2009)            |
| FHT    | Suberina                         | <i>Solanum tuberosum</i>    |    | Serra et al. (2010)          |
| PtFHT1 | Alquil hidroxicinamato           | <i>Populus trichocarpa</i>  |    | Cheng et al. (2013)          |
| DCF    | Ácidos graxos                    | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Va | Rautengarten et al. (2012)   |
| FACT   | Alquil hidroxicinamato           | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Va | Kosma et al. (2012)          |
| NtHQT  | Ácido clorogênico                | <i>Nicotiana tabacum</i>    | Vb | Niggeweg et al. (2004)       |
| NtHCT  | Ácido clorogênico e derivados    | <i>Nicotiana tabacum</i>    | Vb | Hoffmann et al. (2003, 2004) |

|          |   |   |    |                                 |
|----------|---|---|----|---------------------------------|
| AtHCT    | Ácido clorogênico e derivados             | <i>Arabidopsis thaliana</i>                       | Vb | Hoffmann et al. (2005)          |
| PrHCT    | Hidroxicinamoil                           | <i>Pinus radiata</i>                              | Vb | Wagner et al. (2007)            |
| CcHCT    | Hidroxicinamoil quinato                   | <i>Coffea canephora</i>                           | nd | Lepelley et al. (2007)          |
| CcsHCT   | Cafeoil ou p-coumaroil quinato            | <i>Cynara cardunculus</i><br><i>var. scolymus</i> | Vb | Comino et al. (2007)            |
| HQT1     | Cafeoil ou p-coumaroil quinato            | <i>Cynara cardunculus</i><br><i>var. scolymus</i> | nd | Sonnante et al. (2010)          |
| HQT2     |   |   |    |                                 |
| LjHQT    | Ácido clorogênico                         | <i>Lonicera japonica</i>                          |    | Peng et al. (2010)              |
| PvHCT1a  | Cafeoil ou p-coumaroil chiquimato/quinato | <i>Panicum virgatum</i>                           |    | Escamilla-Trevino et al. (2014) |
| PvHCT2a  |   |   |    |                                 |
| TpHCT1A  | Cafeoil ou p-coumaroil chiquimato         | <i>Trifolium pratense</i>                         | Vb | Sullivan (2009)                 |
| TpHCT1B  | Ácido chiquímico (chiquimato)             |   |    |                                 |
| TpHCT2   |   |   |    |                                 |
| CsHCT    | p-coumaroil chiquimato                    | <i>Cucumis sativus</i>                            |    | Varbanova et al. (2011)         |
| PeHCT    | p-coumaroil chiquimato                    | <i>Populus euramericana</i>                       |    | Kim et al. (2011)               |
| OsHCT4   | Hidroxicinamoil glicerol                  | <i>Oryza sativa</i>                               |    | Kim et al. (2012)               |
| SbHCT    | Quinato                                   | <i>Sorghum bicolor</i>                            |    | Walker et al. (2013)            |
| SIHQT    | Ácido clorogênico e quinato               | <i>Solanum lycopersicum</i>                       |    | Moglia et al. (2014)            |
| PtHCT1_6 | p-coumaroil chiquimato                    | <i>Populus trichocarpa</i>                        |    | Wang et al. (2014)              |
|          | Hidroxicinamoil                           |   |    |                                 |
| CbHST    | chiquimato, hidroxibenzoato               | <i>Coleus blumei Benth</i>                        |    | Sander & Petersen (2011)        |
| CbRAS    | Hidroxicinamoil, hidroxiaquilatos         | <i>Coleus blumei Benth</i>                        |    | Berger et al. (2006)            |
| MoRAS    | Hidroxicinamoil                           | <i>Melissa officinalis</i>                        |    | Weitzel & Petersen (2011)       |

|           |  |                               |    |   |
|-----------|--|-------------------------------|----|---|
| LaAT1     | Amidas do ácido<br>hidroxicinamoil, hidroxicimoil chiquimato e<br>4-hidroxifenilactato | <i>Lavandula angustifolia</i> | V  | Landmann et al. (2011)  |
| CcsHQT    |  |                               | Vb | Comino et al. (2009)  |
| CcaHQT    |  |                               | Vb | Comino et al. (2009)  |
| SsHCT     |  |                               | Vb | Berger et al. (2006)  |
| TcDBNTBT  | 3' - epímero de 2'-desoxitaxol   | <i>Taxus canadensis</i>       | Va | <a href="https://www.uniprot.org/uniprot/Q8LL69">https://www.uniprot.org/uniprot/Q8LL69</a> |
| TcDBAT    | bacatina III   | <i>Taxus cuspidata</i>        | Va | <a href="https://www.uniprot.org/uniprot/Q9M6E2">https://www.uniprot.org/uniprot/Q9M6E2</a> |
| TcBAPT    |  |                               | Va | <a href="https://www.uniprot.org/uniprot/Q8H2B5">https://www.uniprot.org/uniprot/Q8H2B5</a> |
| TcDBBT    | 10-desacetilbacatina III   | <i>Taxus cuspidata</i>        | Va | <a href="https://www.uniprot.org/uniprot/Q9FPW3">https://www.uniprot.org/uniprot/Q9FPW3</a> |
| TcTAT     | taxa-4(20),11-dien-5 $\alpha$ -yl acetate  | <i>Taxus cuspidata</i>        | Va | <a href="https://www.uniprot.org/uniprot/Q9M6F0">https://www.uniprot.org/uniprot/Q9M6F0</a> |
| Ih3AT1    |  | <i>Iris hollandica</i>        | Va | Yoshihara et al. (2006)   |
| MsAAT     |  |                               | Va |   |
| VIAMAT    | Antranilato de metila  | <i>Vitis labrusca</i>         | Va | Wang, De Luca (2005)  |
| MdAAT2    |  | <i>Malus domestica</i>        | Va |   |
| MdAAT1    |  | <i>Malus domestica</i>        | Va |   |
| AtCHAT    |  |                               |    |   |
| CmAAT2    |  | <i>Cucumis melo</i>           | Va |   |
| CmAAT1    |  | <i>Cucumis melo</i>           | Va |   |
| CmAAT3    |  | <i>Cucumis melo</i>           | Va |   |
| LaHMT/HLT | 13-(2-metilcrotonoiloxi)lupanine   | <i>Lupinus albus</i>          | Va | Suzuki et al. (1994)  |
| OsPMT     | Monolignóis, hidroxicinamatos  | <i>Oryza sativa</i>           | Va | Withers et al. (2012)   |

|  |  |                                |    |                       |
|--|--|--------------------------------|----|-----------------------|
| BdPMT<br>ZmpCAT                          | Conjugado de<br>P-coumarato de monolignol          | <i>Brachypodium distachyon</i> | V  | Petrik et al. (2014)  |
| OsAt10<br>SacBAHD01(ou At9)              | Glucuronoarabinoxilano (GAX)<br>FA em hemicelulose | <i>Oryza sativa</i>            | Va | Bartley et al. (2013) |
| SvBAHD01<br>BdAt1<br>OsAt5 (ou<br>OsFMT) | FA em hemicelulose<br>FA em lignina                |                                |    |                       |

Fonte: Própria  
autora.

Flavonóides e antocianinas dão cor, além de apresentarem propriedades medicinais e de defesa para a planta. Vários álcoois como substratos, modificação de alcalóide e ésteres voláteis são responsáveis pelo amadurecimento de frutos e ésteres de álcool benzoato são amplamente utilizados como aromatizantes, agentes em alimentos e cosméticos. Ácidos hidroxicinâmicos apresentam propriedades antioxidantes e podem prevenir doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer.

Os tópicos seguintes descrevem detalhadamente os principais compostos que já foram sintetizados na literatura através da expressão e inibição de genes da família BAHD.

### **3.5.1 Antocianinas (Clado IA)**

O termo antocianina se origina do grego (anthos, uma flor e kyanos, azul escuro). As antocianinas são considerados, após a clorofila, o mais importante grupo de pigmentos oriundos de fonte vegetal, sendo o maior grupo de pigmentos solúveis em água (HARBONE; GRAYER, 1988),.

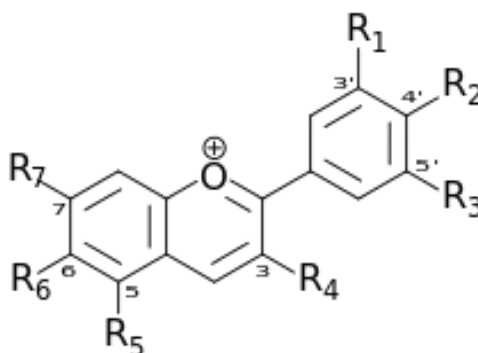
As antocianinas apresentam-se como uma importante alternativa para a substituição gradativa dos corantes sintéticos, pois são abundantes na natureza e apresentam um amplo espectro de cores. Além disso, estudos têm demonstrado efeitos benéficos à saúde humana como atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-mutagênica e efeitos visuais de melhoria da função, sendo uma importante aliada na prevenção/retardamento de doenças cardiovasculares, do câncer e doenças neurodegenerativas (HARBONI, WILLIAMS, 2000).

As funções desempenhadas pelas antocianinas no metabolismo das plantas compreendem antioxidação, proteção à ação da luz, mecanismo de defesa e função biológica. Os pigmentos intensos produzidos têm elevada importância na polinização e na dispersão de sementes, entre outros mecanismos responsáveis pela reprodução das plantas. As antocianinas são as principais responsáveis por inúmeras tonalidades de cores encontradas em flores, frutas e folhas (MAZZA; MINIATI, 1993).

### 3.5.1.2 Estrutura química das antocianinas

Quimicamente, esses pigmentos são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonóides. São compostos solúveis em água e altamente instáveis em temperaturas elevadas. A figura 4 mostra a estrutura química da antocianina baseada em uma estrutura policíclica de quinze carbonos.

**Figura 4** - Estrutura química das antocianinas

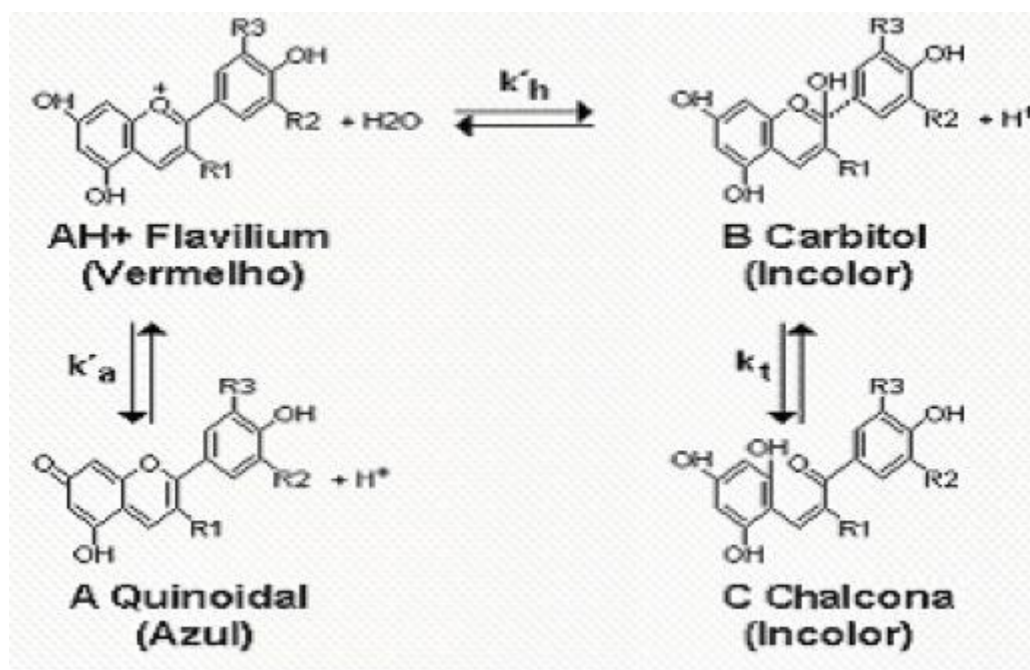


Fonte: Adaptado de (LÓPEZ et al., 2000).

### 3.5.1.2 Equilíbrio químico das antocianinas em solução aquosa

Quando presentes em meio aquoso, as antocianinas se encontram comumente na forma de uma mistura de diferentes estruturas químicas em equilíbrio: cátion flavilium (vermelho), base anidra quinoidal (azul), pseudo-base carbitol (incolor), e chalcona (incolor ou levemente amarela). Presentes em meio ácido (pH menor que 2), as antocianinas apresentam-se em sua forma catiônica; com o aumento do pH, ocorre uma rápida desprotonação, formando a base quinoidal. Em meio aquoso a antocianina se encontra em equilíbrio entre a forma carbitol e chalcona. À temperatura ambiente, e em meio levemente acidificado, o equilíbrio entre as formas carbitol e chalcona é muito lento e leva horas para ser atingido. O aumento da temperatura desloca o equilíbrio na direção da formação da base chalcona (HEREDIA et al., 1998). As soluções contendo pigmentos com pH acima de 7,0, gradualmente mudam a coloração de tonalidade azul para amarela, como um resultado indireto da formação de chalcona, via fissão do anel da anidrobases (HRAZDINA, 1977). A figura 5 mostra as quatro formas da antocianina em solução aquosa.

**Figura 5** - Equilíbrio das antocianinas em solução aquosa



Fonte: (IACOBUCCI;SWEENI, 1983).

Alguns fatores influenciam diretamente na estabilidade da antocianina como pH, temperatura, influência da copigmentação, presença de substâncias metálicas e oxigênio. A sensibilidade ao pH é um dos principais fatores limitante no processamento e utilização das antocianinas como corante, afetando a cor e a estabilidade química. Em soluções ácidas, a antocianina se apresenta na forma vermelha, mas com o aumento do pH a intensidade de cor diminui. Em solução alcalina, obtém-se a cor azul, sendo esta instável (MAZZA; BROUILLARD, 1987).

### 3.5.1.3 Antocianina aciltransferase (AATs)

Durante a biossíntese da antocianina, ocorre a reação de acilação nas porções glicosil após a formação de antocianidina-3-O-glicosídeo, catalisada por antocianinas aciltransferases (AATs), um grupo específicos de enzimas vegetais, dependente de acil-CoA. Existem dois tipos principais de substituintes acila, grupos acil aromático e alifático, ambos os quais estão comumente ligados a um grupo hidroxil de uma fração glicosil. É importante destacar que as aciltransferases alifáticas não atuam nos acil-CoAs aromáticos, como *p*-coumaroil-CoA e cafeoil-CoA e vice-versa. As maloniltransferases utilizam metilmalonil-CoA e succinil-CoA como fracos doadores acil. Demonstrou-se que as atividades da AATs ocorrem em culturas celulares, flores e outros órgãos vegetais que acumulam acil antocianinas.

Expressões bem-sucedidas de cDNAs da AAT em sistemas heterólogos devem fornecer a base para aplicações de AATs em biotecnologia. Diversas tentativas foram feitas abordando a engenharia genética para modificar a via flavonóide em busca de cores de flores. Sabe-se que a acilação aromática estabiliza a coloração de antocianinas a pH de meios intracelulares de flores (pH=4-7), por exemplo, a intensidade da cor azul aumenta à medida que o número de grupos aromáticos também aumenta. Assim, genes que codificam aciltransferases aromáticas de antocianina com diferentes especificidades são importantes ferramentas para a modificação da cor das flores (TANAKA et al., 1998). A acilação alifática (também chamada de malonilação) aumenta a estabilidade da coloração de antocianina e impede pigmentos do ataque da glicosidase (SUZUKI et al., 2002).

No aspecto medicinal, a acilação permite a construção e modificação funcional de medicamentos e bioativos. A acilação das antocianinas pode melhorar a solubilidade, estabilidade físico-química, semi-vidas biológicas, permeabilidades de membrana e absorção intestinal dos pigmentos.

### **3.5.2 Síntese de Triacilglicerol (Clado IB)**

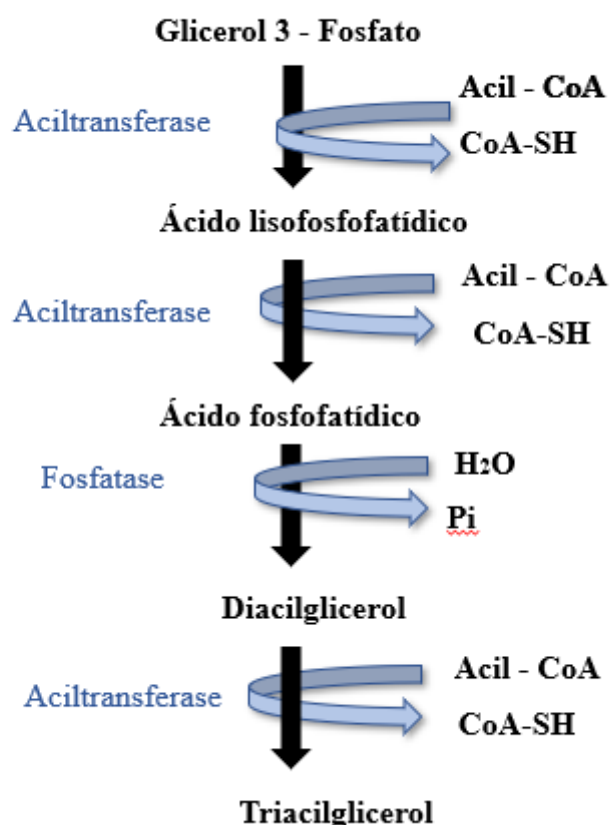
O triacilglicerol (TAG), um éster acílico glicerol, é a forma mais eficiente de armazenamento de energia em células eucarióticas (FARESE et al., 2000). O TAG é sintetizado principalmente durante o desenvolvimento de sementes e frutos, sendo o principal componente dos óleos de sementes. Óleos oriundos de plantas têm um valor econômico significativo para a indústria de alimentos, assim como na produção de lubrificantes e biocombustíveis. Eles também estão se tornando matérias-primas cada vez mais importantes na indústria petroquímica como substituto de petróleo cru. Sendo assim, numerosos sistemas convencionais e estratégias envolvendo genética molecular estão sendo exploradas em tentativas de aumentar o teor de TAG e modificar a composição de ácidos graxos dos óleos de sementes de plantas (LUNG; WESELAKE, 2006).

O TAG é geralmente sintetizado pela incorporação sequencial de grupos acila em glicerol 3-fosfato por aciltransferases para formar ácido lisofosfatídico e ácido fosfatídico, respectivamente (KENNEDY, 1961). O fosfatídico sintetizado é o ácido desfosforilado em diacilglicerol (DAG). Este é catalisado por acil-CoA: DAG aciltransferase (DGAT; EC 2.3.1.20) que transfere um grupo acil para o DAG, formando assim, o TAG.



Rani e colaboradores (2010) descreveram a acilação do DAG para formação do TAG por meio do gene recombinante At5g23940. O estudo mostrou de modo pioneiro a identificação, purificação e caracterização funcional do gene DRC At5g23940, um membro da família BAHD necessário para a incorporação de monômero na matriz polimérica de cutina. A proteína At5g23940 possui um motivo conservado HX4D na extremidade N-terminal e uma ligação lipídica VX2GF no meio da sequência. Quando o gene apresentava atividade em *Escherichia coli*, produzia uma proteína solúvel com atividade DGAT. A proteína recombinante purificada é específica para 1,2-DAG e oleoil-CoA. Notou-se que a superexpressão de At5g23940 em *S. cerevisiae*, mutante DGAT quádruplo (H1246), resulta na formação de TAG. A figura 6 mostra a via de formação do triacilglicerol.

**Figura 6** – Via de formação do triacilglicerol



Fonte: Adaptado de (ESTUDO DE BIOLOGIA, 2012).

### 3.5.3 Ácido graxos de cadeia longa (Clado II)

As superfícies das porções aéreas das plantas são cobertas por cutícula, que serve como uma barreira entre a planta e o meio ambiente. A porção externa da cutícula é

composta por uma mistura complexa de acil lipídios, comumente denominada graxa epicuticular. Acredita-se que estas desempenhem papéis importantes para as plantas ajudando a resistir à seca, geadas, patógenos e insetos e protegê-las da irradiação UV, bem como influenciar retenção de produtos químicos aplicados (MARTIN ; JUNIPER, 1970).

As graxas epicuticulares são misturas complexas de ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFAs) e seus derivados (TULLOCH, 1976). A composição química dessas ceras varia de acordo com diferentes espécies vegetais. Por exemplo, as ceras cuticulares encontradas nas folhas de *Arabidopsis* são compostas principalmente por alcanos, álcoois e ácidos graxos (JENKS et al., 1995). Em contraste, ceras encontradas nas folhas das mudas de milho são compostas principalmente de álcoois, aldeídos e ésteres (BIANCHI et al., 1985).

Os dois membros conhecidos do clado II são *Glossy2* de *Z. mays* e *CER2* de *A. thaliana*, responsáveis pela síntese de graxas epicuticulares. Embora não existam dados bioquímicos em relação à sua função enzimática, estudos de localização subcelular usando anticorpos contra um peptídeo sintético CER2 sugere a possibilidade de estar localizado no núcleo. No entanto, *Glossy2* e *CER2* não contêm nenhum dos sinais de localização nuclear reconhecidos. Expressão do gene *CER2* foi medido em um estudo tentando determinar os níveis de expressão de genes envolvidos na biossíntese de cera. Os níveis moderados de expressão detectados neste estudo, juntamente com estudos de localização realizados anteriormente, sugerem que o *CER2* desempenha um papel regulador em vez de biossintético em biossíntese de cera epicuticular (XIA et al., 1997).

### **3.5.4 Modificação de alcaloides e ésteres voláteis (Clado III)**

A maioria das proteínas BAHD do clado III aceita uma gama diversificada de substratos de álcool, embora a vasta maioria dessas enzimas utiliza acetil-CoA como principal doador de acila. Uma subfamília dentro do clado inclui Acetiltransferases de BAHD envolvidas na modificação e identificação de compostos alcalóides, como a vindolina e precursor da morfina thebaine (ST PIERRI, 1998). Um estudo recente sobre a produção de capsaicina na pimenta revelou que a aciltransferase BAHD codificada pelo gene *Pungency1* (*Pun1*) é responsável pelas diferenças entre calor e variedades suaves de pimenta (STEWART et al., 2005).

O segundo subgrupo principal do clado III (denominado clado IIIA) consiste em acetiltransferases envolvidas em reações voláteis responsáveis pela biossíntese de ésteres em flores e frutos maduros, como a enzima RhAAT1 de *Rosa hybrida*, que produz o éster acetílico do geraniol (SHALIT et al., 2003). Essas enzimas são capazes de aceitar uma variedade de álcool como substratos que produzem uma variedade de ésteres voláteis (DUDAREVA et al., 1998). No entanto, os compostos reais encontrados provavelmente na planta são determinados pela disponibilidade de substratos endógenos.

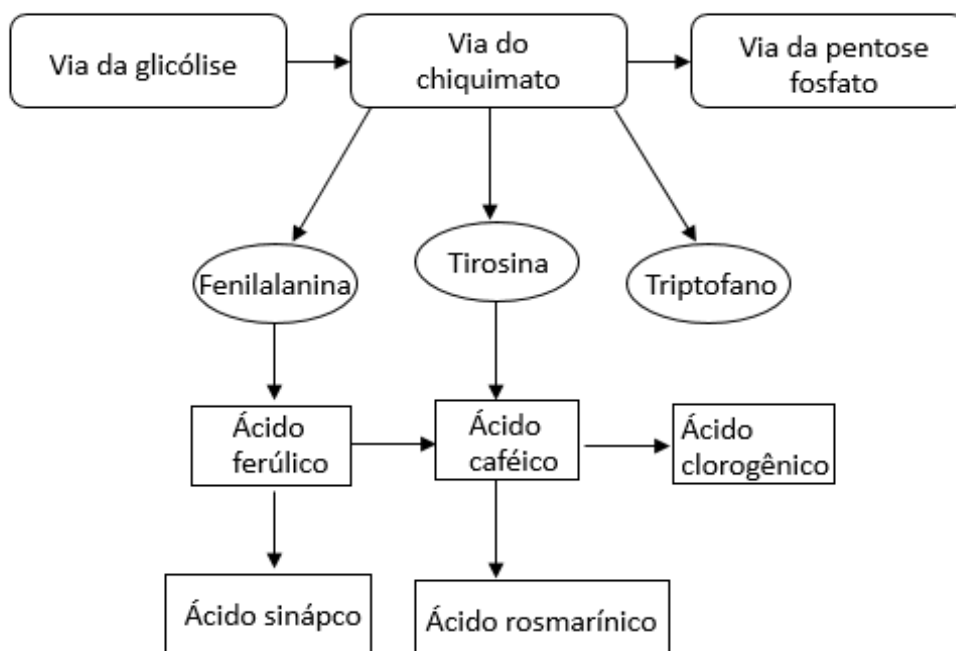
#### **3.5.5 Agmatina coumaroiltransferase (Clado IV)**

A enzima agmatina coumaroiltransferase (ACT) foi demonstrada a terceira BAHD aciltransferase a realizar a acilação de um nitrogênio para formar a amida correspondente, as demais são o HCBT e AsHHT1. ACT contém o Motivo HXXXD comum a todos os membros da família BAHD e também contém um motivo DFGWG ligeiramente alterado com triptofano em vez de glicina. Burhenne e colaboradores também relataram sequências semelhantes ao ACT da cevada que ainda não foram caracterizados bioquimicamente.

#### **3.5.6 Produção de conjugados de ácido hidroxicinâmico (Clado V)**

Os ácidos hidroxicinâmicos (HCAs) são uma das principais classes de ácidos fenólicos encontrados na natureza. Os ácidos fenólicos são derivados da via do chiquimato que envolve várias etapas enzimáticas responsáveis pela conversão de intermediários da via da pentose fosfato e glicólise para formar três aminoácidos aromáticos cruciais (fenilalanina, tirosina e triptofano). OS HCAs são metabólitos secundários derivados de fenilalanina e tirosina e todos eles têm um esqueleto de carbono  $C_6C_3$  com uma dupla ligação na cadeia lateral que pode ter uma configuração *cis* ou *trans* (EL-SEEDI et al., 2012). A figura 7 representa o esquema de síntese do ácido hidroxicinâmico. Os grupos funcionais hidroxila no anel benzeno e a ligação insaturada de sua cadeia lateral etilênica são locais importantes para reações com espécies reativas de oxigênio (ERO), retratando uma relação estrutura-atividade. Assim, sua atividade biológica depende do padrão de substituição da fração aromática.

**Figura 7-** Esquema de síntese de ácido hidroxicinâmico



Fonte: Própria autora.

Hidroxicinamas (HCs) são produzidos principalmente em plantas, sendo responsáveis pela produção de ácido caféico (AC), ácido *p*-cumárico (AP), ácido ferúlico (AF) e ácido sinápico (AS). A biossíntese de conjugados de HC é mediada por hidroxicinamoil transferases (HCTs), que utilizam um tio éster de coenzima A como doador e variados compostos, entre eles o quinato e o chiquimato, como aceitadores. A formação de tio éster de coenzima A com HC é catalisada pelo ácido *p*-cumárico. Assim, os genes que codificam *4CL* e *HCT* são essenciais para a produção de conjugados de HC. Os *HCTs* mostram especificidade não só para o doador do grupo acilo, mas também o aceitor do grupo acilo. Quando os receptores do grupo acil são chiquimato e quinato, os conjugados resultantes são *p-coumaroyl-O-shikimate* e ácido clorogênico, respectivamente.

Devido á propriedades antioxidantes dos HCs, que eliminam os radicais livres, estudos têm sugerido que o consumo de HCs poderia prevenir doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. Além disso, a literatura descreve várias funções biológicas do HCs como proteção contra efeitos colaterais da quimioterapia e atividade anti-osteoclástica. A farmacocinética e biodisponibilidade dos ácidos hidroxicinâmicos, bem como sua atividade

antimicrobiana, são altamente dependentes de estruturas químicas e dos tipos de moléculas às quais eles são conjugados (EL-SEEDI et al., 2012).

Kim et al. e colaboradores (2013) sintetizaram *coumaroyl-O-shikimate* e ácido clorogênico através da coexpressão de *Hydroxycinnamoyl transferases* (HCTs) incluindo *hydroxycinnamate-CoA shikimate transferase* (HST) e *hydroxycinnamate-CoA quinate transferase* (HQT) com 4-coumarato CoA: ligase (4CL) em um meio de cultura de *Escherichia coli* suplementado com HCs.

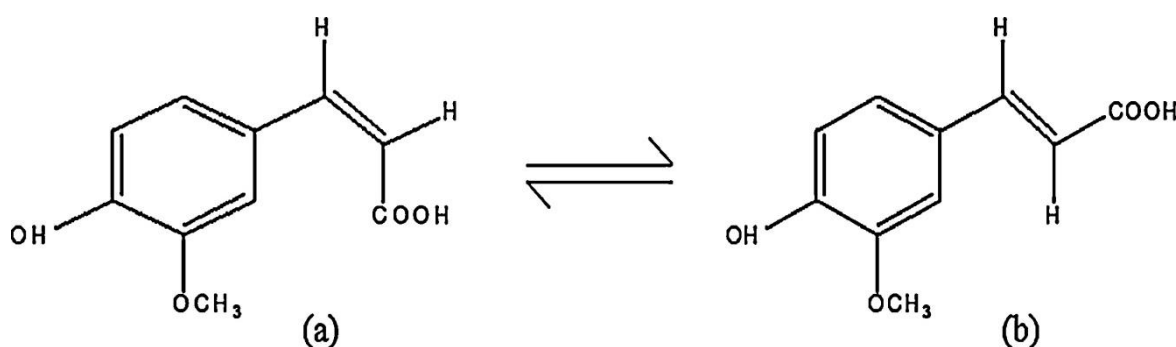
Os compostos aromáticos ácidos cinâmico e *p*-hidroxicinâmico (pHCAs) são fenilpropanóides tendo aplicações como precursores para a síntese de produtos termoplásticos, aromatizantes, cosméticos e de saúde. Estes dois ácidos aromáticos podem ser obtidos por duas rotas: síntese química ou biotecnológica através da extração a partir de tecidos vegetais. No entanto, ambos os processos de fabricação apresentam deficiências, como a geração de subprodutos tóxicos ou uma baixa concentração de material vegetal. Métodos de produção alternativos estão sendo desenvolvidos para permitir a produção biotecnológica de cinâmicos e (pHCAs) por engenharia genética de vários hospedeiros microbianos, incluindo *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas putida* e *Streptomyces lividans*.

Com essa finalidade, Vargas-Tah; Gosset (2015) realizaram modificações genéticas que incluem a expressão heteróloga de genes que codificam atividades fenilalanina amônia-liase e tirosina amônia-liase, que catalisam a conversão de l-fenilalanina (l-Phe) e l-tirosina (l-Tyr) em ácido cinâmico e (pHCA), respectivamente. Modificações adicionais do hospedeiro incluem a engenharia metabólica para aumentar o fluxo de carbono do metabolismo central para as vias biossintéticas l-Phe ou l-Tyr. Essas estratégias incluem a expressão de versões mutantes insensíveis ao *feedback* de enzimas das vias aromáticas, bem como modificações genéticas no metabolismo central do carbono para aumentar a disponibilidade biossintética dos precursores fosfoenolpiruvato e eritrose-4-fosfato. Esses esforços foram complementados com a otimização de deformação para a utilização de matéria-prima, incluindo várias fontes simples de carbono, além de polímeros e misturas de açúcar derivados da biomassa vegetal.

### 3.5.6.1 Ácido ferúlico

Ácido ferúlico (FA) é um derivado fitoquímico fenólico presente nos componentes da parede celular da planta como cadeias laterais covalentes. Juntamente com o ácido dihidroferúlico é o componente presente em lignoceluloses, conferindo rigidez à parede celular, responsável pela ligação cruzada entre polissacarídeos e lignina (KRUMAR; PRUTHI, 2014). A figura 8 mostra a representação esquemática de duas formas isoméricas diferentes de ácido ferúlico.

**Figura 8-** Representação esquemática de duas formas isoméricas diferentes de ácido ferúlico encontradas na natureza (a) conformação cis e (b) conformação trans de ácido ferúlico.



Fonte:( KRUMAR; PRUTHI,2014).

Embora AF seja encontrada na parede celular de madeiras, gramíneas e na casca de milho, ela não está disponível sem esforço nessas fontes naturais, pois está covalentemente ligada a uma variedade de carboidratos como um conjugado glicosídico, ou um éster ou amida. Portanto, ele só pode ser liberado por hidrólise alcalina (TILAY et al., 2008).

Várias tentativas foram feitas para liberar enzimaticamente FA a partir de fontes naturais. O isolamento de AF para produção comercial por meios enzimáticos é um desafio para a comunidade científica, porque a maior parte do conteúdo de FA nas plantas está covalentemente ligada à lignina e outros biopolímeros. Recentemente, Uraji et al. (2013) melhorou com sucesso a produção enzimática de AF a partir de farelo de arroz desengordurado e sugeriu que as enzimas ( $\alpha$ -l-arabinofuranosidase, múltiplas xilanases e uma acetil xilan esterase) de *Streptomyces* também podem ser usadas para a extração de AF de outras fontes viz., farelo de arroz cru, farelo de trigo e sabugo de milho. A separação por TLC de extratos brutos e visualização por uma variedade de reagentes de pulverização e luz UV oferece um caminho rápido para a detecção regular de FA de alto rendimento.

Aproximadamente > 45% (> 2,0% / g de peso seco) do conteúdo total de AG foi liberado durante o tratamento enzimático do caule da batata-doce que foi alcançado durante o período de incubação de 12 h com 1,0% de Ultraflo L. Estudos de biotransformação para a produção de AG a partir do eugenol foram realizados usando a cepa recombinante de *Ralstonia eutropha* H16. Lambert et al. (2013) obteve rendimentos de quase 90% na produção de FA a partir de eugenol e álcool coníferílico usando uma cepa recombinante de *S. cerevisiae*.

Os usos biotecnológicos do ácido ferúlico foram notados quando um grupo de pesquisadores japoneses descobriram propriedades antioxidantes dos ésteres esterílicos do FA, extraídos do óleo de arroz. AF exibe uma ampla gama de efeitos biomédicos, incluindo antioxidantes, antialérgicos, hepatoprotetores, anticarcinogênicos, anti-inflamatórios, antimicrobianos, antivirais, efeito vasodilatador, antitrombótico e ajuda a aumentar a viabilidade dos espermatozóides. Também possui aplicações na preservação de alimentos como agente de reticulação, constituinte fotoprotetor em filtros solares e loções para a pele. Um derivado de amida do AF, formado pela condensação de AF com tiramina, pode ser usado como um indicador de estresse ambiental nas plantas. Na indústria de panificação, amidas de ácido ferúlico com aminoácidos ou dipeptídeos são comumente usados para fins de preservação. Em muitos países, o uso de AF como aditivo alimentar foi aprovado pelo governo, pois elimina efetivamente o radical aniônico superóxido e inibe a peroxidação lipídica (KRUMAR; PRUTHI, 2014).

### 3.5.6.2 Ácido caféico

O ácido caféico (AC; ácido 3,4-di-hidroxicinâmico) é um composto aromático obtido pela via do fenilpropanóide. Este produto natural também possui atividades antioxidantes, antitumorais, antivirais e anti-inflamatórias. Sendo também precursor do éster fenetílico da AC (CAPE), um composto com potencial como agente antidiabético e protetor do fígado. O AC pode ser encontrada em baixas concentrações nos tecidos das plantas e, portanto, sua purificação é difícil e de elevado custo. O conhecimento sobre as vias, enzimas e genes envolvidos na biossíntese da AC abriu o caminho para permitir o projeto e a construção de linhagens microbianas com a capacidade de sintetizar esse metabólito (HÉRNANDEZ-CHAVEZ; MARTINEZ; GOSSET, 2019).

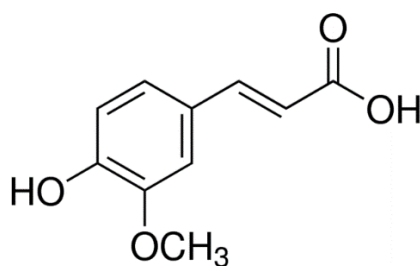
### 3.5.6.3 Ácido *p*-cumárico

O ácido *p*-cumárico (*p*-CA) desempenha um papel central no metabolismo secundário em plantas e cogumelos porque pode ser subsequentemente transformado em ácidos fenólicos (por exemplo, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido clorogênico e ácido sinápico), flavonóides, lignina e outros metabólitos secundários. Existe de forma livre em plantas em baixas concentrações e em forma conjugada em altas concentrações. O *p*-CA mostra várias atividades biológicas, e as atividades aumentam bastante após a formação de conjugados. Investigações extensivas mostraram que eles (especialmente conjugados de *p*-CA) exibem várias bioatividades, incluindo antioxidantes, anti-inflamatórios, antimutagênicos, anti-úlceras, antiagregantes plaquetários e atividades anticâncer, além de mitigar a aterosclerose, dano cardíaco oxidativo, dano induzido por UV nos tecidos oculares, lesão neuronal, ansiedade, gota e diabetes (PEI et al., 2015).

### 3.5.6.4 Ácido sinápico

O ácido sinápico, ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico (Figura 9), pode ser encontrado na forma livre, mas, assim como os demais ácidos hidroxicinâmicos, também é encontrado na forma de ésteres. Os ésteres hidroxicinâmicos são encontrados como ésteres de açúcar (glicosídeos) ou como ésteres de uma variedade de compostos orgânicos. Dois principais ésteres sinapílicos são o malato de sinapílo, geralmente encontrado nas folhas, e a sinapina (sinapil colina) acumulada nas raízes (TZAGOLOFF, 1963; CHAPPLE et al., 1992; SHIRLEY; CHAPPLE, 2003). A figura 9 mostra a representação do ácido sinápico.

**Figura 9-** Representação esquemática do ácido sinápico



Fonte: (NICIFOROVIC; ABRAMOVIC, 2014).

O ácido sinápico apresenta propriedades variadas como ação antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e anti-câncer, que são interessantes tanto do ponto de vista biológico como para indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêutica.



Conceitualmente, aceita-se que substâncias capazes de doar hidrogênio ou um elétron para o 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), um radical estável sintético centrado em nitrogênio, podem ser consideradas como antioxidantes e, portanto, captadores de radicais. Em uma concentração de 20  $\mu$ M, o ácido sinápico foi capaz de inibir 33,2% do radical DPPH, que foi comparável à atividade de eliminação de ácido caféico (49,6%) e  $\alpha$ -tocoferol (41,8%), bem como a atividade do hidroxitolueno butilado (BHT) (29,2%) (KIZUZAKIA et al., 2002).

Os efeitos anti-inflamatórios e anticarcinogênicos do ácido sinápico e seus derivados foram bem documentados na literatura. Os macrófagos são apontados como mediadores-chave da interação entre inflamação, imunidade e câncer. O papel dos macrófagos no câncer recebeu atenção devido à descoberta de seus efeitos promotores de tumores (Connelly e outros, 2011). Yun et al. (2008) relataram que o ácido sinápico inibe a ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) em macrófagos. NF- $\kappa$ B regula o *status* inflamatório e desempenha um papel fundamental na resposta imune à infecção; no entanto, a regulação incorreta do NF- $\kappa$ B tem sido associada a câncer, doenças inflamatórias e autoimunes, choque séptico, infecção viral e desenvolvimento imune inadequado (SHUKLA; SINGH, 2011).

### 3.5.6.5 Síntese de ácido rosmarínico

O composto fenólico ácido rosmarínico (RA) e seus derivados são sintetizados a partir da fenilalanina através da esterificação do ácido caféico e da tirosina através de 3,4-ácido di-hidroxifeniláctico (ELLIS;TOWERS, 1970). Ácido Rosmarínico (RA) e seus análogos possuem fortes efeitos antioxidantes, apresentando várias propriedades benéficas para a saúde humana como efeito anti-inflamatório, antialérgico, antimicrobico e antiviral (KIM et al., 2015).

Eudes et al. (2016) selecionaram um membro da família BAHD, RA sintase LaAT1 da lavanda (*Lavandula angustifolia*), para expressão em levedura devido a seu substrato compatível com vários doadores e aceptores. Uma cepa de *S. cerevisiae* co-expressando *4CL5* e *LaAT1* foi gerada e cresceu na presença de 4-hidroxifenilactato (aceptor de preferência do LaAT1), *p*-cumarato, cafeato e ferulato obteve-se a produção de 4-hidroxifenilactato de *p*-coumaroilo, cafeoil, 4'-hidroxifenilactato (ácido isorínico) e feruloyl 4'-hidroxifenilactato, respectivamente.

### 3.5.6 Síntese de ésteres de álcool benzoato (clado V)

Ésteres de álcool benzoato são amplamente utilizados como aromatizantes, agentes em alimentos e cosméticos, bem como em higiene e produtos farmacêuticos (OLMO; CALZADA; NUÑEZ, 2015).

Benzoil-CoA: benzilo álcool / feniletanol benzoiltransferase (BPBT), uma enzima BAHD de petúnia (*Petunia x hybrida*), utiliza benzoil-CoA como doador e vários álcoois como receptores para a formação de ésteres de álcool benzoato. Uma cepa de *S. cerevisiae* foi gerada para a co-expressão de *4CL5* e *BPBT*, baseado na preferência de substrato de BPBT observado *in vitro*, a cepa 4CL5-BPBT foi alimentado com ácido benzóico em combinação com etanol, butanol, isopentanol ou 2-feniletanol. Por comparação com a eluição de padrões autênticos, análise LC-MS dos meios de cultura mostrou a presença de etil benzoato ( $1,39 \pm 0,40 \mu\text{M}$  ou  $209 \mu\text{g} / \text{L}$ ), benzoato de butila ( $2,65 \pm 0,69 \mu\text{M}$  ou  $471 \mu\text{g} / \text{L}$ ), benzoato de isopentila ( $2,50 \pm 0,50 \mu\text{M}$  ou  $481 \mu\text{g} / \text{L}$ ) e benzoato de fenila ( $7,80 \pm 1,73 \mu\text{M}$  ou  $1763 \mu\text{g} / \text{l}$ ), respectivamente (EUEDES et al., 2016).

## 3.6 Aspectos econômicos dos produtos sintetizados pela família BAHD no contexto de uma biorrefinaria

### 3.6.1 Aspectos econômicos de antocianinas

Somavat et al. (2018) conduziram um estudo de viabilidade econômica da produção simultânea de etanol e extração de antocianinas de milhos coloridos. A produção de etanol para as usinas que processam 1113,11 MT / dia de milho estimaram 42, 37 e 35,2 milhões de galões / ano para o milho amarelo, azul e roxo, respectivamente.

O processamento do milho azul produziu 26,5 MT / ano de extrato de antocianina enquanto o rendimento foi 33 vezes maior para o milho roxo. Essas diferenças de rendimento podem ser atribuídas às diferenças composicionais das cultivares de milho e à distribuição relativa de antocianinas nas frações de milho. Teor total de antocianinas no milho roxo e azul foram 4,91 e 0,363 g / kg de milho seco, respectivamente (Somavat, 2017). A tabela 1 mostra os rendimentos anuais do processo durante o processamento de moagem a seco de milho amarelo e milho colorido (Extração de SO<sub>2</sub> para milho colorido).

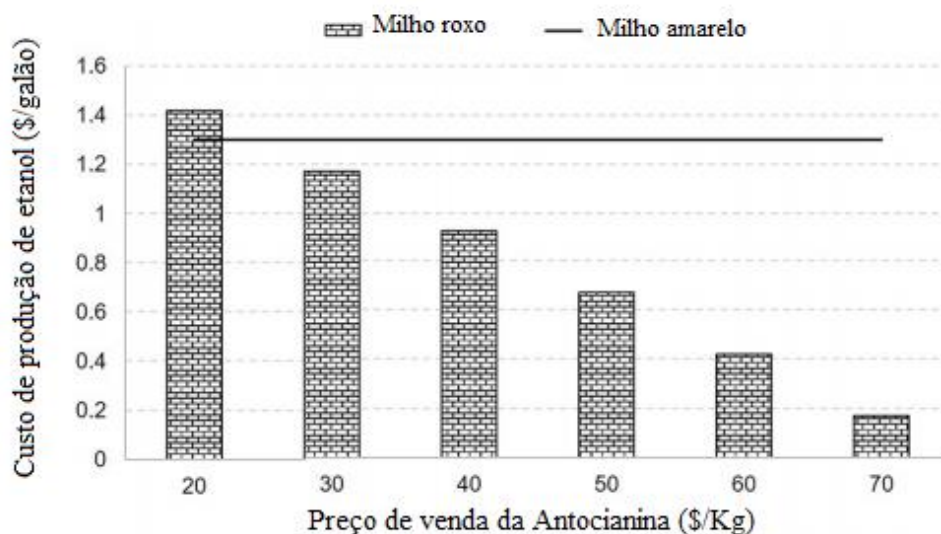
**Tabela 1** - Rendimentos anuais do processo durante o processamento de moagem a seco de milho amarelo e milho colorido (Extração de SO<sub>2</sub> para milho colorido)

|                             | Milho amarelo | Milho azul | Milho roxo |
|-----------------------------|---------------|------------|------------|
| Etanol (Gal/mil)            | 42.0          | 36.9       | 35.2       |
| Extrato de antocianina (MT) | 0             | 26.5       | 878.9      |
| DDGS (MT)                   | 106780        | 100742     | 111752     |
| Óleo de milho (MT)          | 3567          | 6064       | 5049       |
| Fibra (MT)                  | 0             | 46187      | 37947      |

Fonte: Adaptado de (SOMAVAT, 2017).

Notou-se que o preço de venda da antocianina tem uma influência significativa na economia geral do processo. Devido a melhor qualidade, as antocianinas extraídas apenas com água apresentam um preço mais alto no mercado comparado aos extraídos com SO<sub>2</sub>. Nesse estudo, o preço das antocianinas extraídas usando SO<sub>2</sub> contendo água foi assumido dois terços (US \$ 46,7 / kg) daqueles extraídos de água pura (US \$ 70 / kg). São notórios os efeitos da variação do preço de venda de antocianina (US \$ 20 de 70 kg / kg) extraídos do milho roxo nos custos de produção de etanol. A um preço de venda de antocianina de US \$ 30 / kg, os custos de produção de etanol foram 9,7% inferiores aos do milho amarelo convencional. Quando o preço foi aumentado para US \$ 50 / kg, os custos de produção de etanol foram 62,6% menores. A um preço de US \$ 70 / kg de antocianinas, o custo de produção de etanol tornou-se sete vezes menor do que os de uma planta da convenção usando milho amarelo.

**Figura 10** - Efeito do preço de venda de antocianina no custo de produção de etanol no processo de moagem a seco utilizando milho roxo



Fonte: Adaptado de Somavat et al., 2018.

Independente de investimentos de capital e custos operacionais brutos, o custo de produção de etanol durante o processamento do milho roxo foi 42% menor comparado ao milho amarelo (US \$ 0,75 vs. US \$ 1,3 / gal de etanol) devido à alta extração de antocianina. A produção anual de extrato de antocianinas a partir de milho azul foi de apenas 26,5 MT em comparação com 879 MT para milho roxo, portanto, o processo não era economicamente viável. A taxa interna de retorno para o processamento da planta utilizando milho roxo como matéria-prima foi de 21,2%, comparado a apenas 8,7% para uma planta convencional que utiliza milho dentado amarelo. O uso de milho roxo em instalações de moagem a seco pode melhorar significativamente a economia do processo e fornecer antocianina para indústria alimentícia em detrimento aos corantes sintéticos (SOMAVAT et al., 2018).

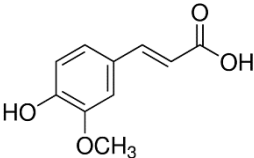
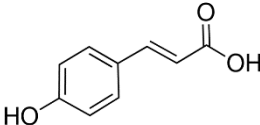
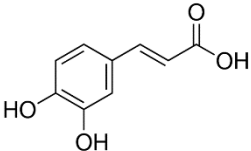
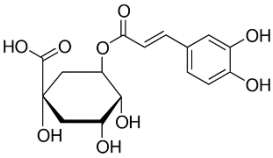
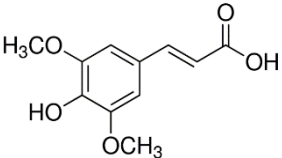
### 3.6.1 Aspectos econômicos de ácidos hidroxicinâmicos

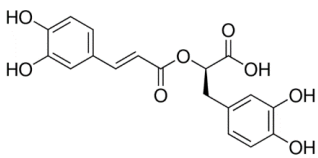
Pesquisadores tem dado importância para a extração de ácidos fenólicos como ácidos hidroxicinâmicos, mas há pouco estudo na literatura sobre os aspectos econômicos desses compostos. Solange et al. (2013) realizaram uma análise tecno econômica sobre o uso de grãos gastos de uma cervejaria no aspecto de uma biorrefinaria. Segundo os autores, o rendimento de ácidos fenólicos correspondem a 9,65 mg por g de lignina solúvel e 9,22 mg por g de lignina solúvel para os ácidos ferúlico e *p*-cumárico, respectivamente. No caso dos ácidos fenólicos sua capacidade de produção é consideravelmente menor do que os

outros produtos. No entanto, em uma biorrefinaria são esperados produtos com altos volumes de produção e preços relativamente baixos e produtos com baixos volumes de produção, mas altos preços de venda (CHERUBINI, 2010; MONCADA et al., 2013).

O quadro seguinte representa os valores de venda dos principais ácidos hidroxicinâmicos descritos anteriormente tendo como base a empresa Sigma-Aldrich.

**Quadro 2** – Valores de ácidos hidroxicinâmicos disponibilizados na Sigma-Aldrich.

| Produto                  | Fórmula   | Pureza        | Preço (BRL)         |
|--------------------------|---|---------------|---------------------|
| Ácido ferúlico           |    | -             | 100 MG – R\$ 802,00 |
| Ácido <i>p</i> -cumárico |   | -             | 25G – R\$ 851,00    |
| Ácido caféico            |  | ≥98.0% (HPLC) | 25G – R\$ 1338,00   |
| Ácido clorogênico        |  | ≥95%          | 5G – R\$ 3380,00    |
| Ácido sinápico           |  | ≥98%          | 5G – R\$ 860,00     |

|                      |   |     |                    |
|----------------------|---|-----|--------------------|
| Ácido<br>rosmarínico |  | 96% | 5G –<br>R\$1920,00 |
|----------------------|---|-----|--------------------|

Fonte: Próprio autor.

### 3.7 Identificação, anotação e análise filogenética dos genes da superfamília BAHD aciltransferases em *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*

O sequenciamento completo do genoma de arroz e *Arabidopsis* revelou um grande número de sequências BAHD. As proteínas BAHD codificadas pelos genomas de *Arabidopsis*, sorgo, arroz e *Brachypodium* já foram identificadas em trabalhos anteriores (D'AURIA et al., 2005; YU et al., 2009; TUOMINEN et al., 2011; BARTLEY et al., 2013). As proteínas pertencentes à superfamília das BAHD aciltransferases, contendo o domínio PFAM PF02458 (transferase), foram previamente anotadas pelo grupo, na espécie modelo *Arabidopsis* e na gramínea arroz, identificando 63 e 132 sequências de proteínas preditas do genoma destas espécies, respectivamente (SOUZA, 2019).

Gerou-se, então, uma árvore filogenética contendo sequências de BAHD aciltransferases já caracterizadas, os genes BAHD aciltransferases em *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* a fim de prever funções gênicas até então desconhecidas pela literatura. A partir da filogenia, foi possível separar essas sequências nos oito clados existentes classificados por Tuominen et al. (2011). Observou-se que no clado IV somente foram identificadas sequências de gramíneas, enquanto no clado IIIa foram identificadas apenas sequências da eudicotiledônea *Arabidopsis thaliana*. A tabela 2 mostra a quantidade de sequências transferases encontradas em *Arabidopsis* e arroz.

**Tabela 2** – Quantidade de sequências transferases encontradas em *Arabidopsis* e arroz.

| Espécie                     | Total | Ia | Ib | II | IIIa | IIIb | IV | Va | Vb |
|-----------------------------|-------|----|----|----|------|------|----|----|----|
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | 63    | 12 | 13 | 4  | 9    | 4    | -  | 14 | 3  |
| <i>Oryza sativa</i>         | 132   | 27 | 13 | 4  | -    | 9    | 16 | 52 | 10 |

Fonte: Próprio autor.

Em *Arabidopsis*, do total de 63 sequências transferases anotadas por técnicas de bioinformática, apenas 20 foram funcionalmente caracterizadas e suas atividades estão

disponíveis no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. O gene At1g24430 pertencente ao clado IIIa possivelmente possui função similar à *RsVISY* da espécie *Petunia hybrida* sendo um álcool coniferílico aciltransferase (<https://www.uniprot.org/uniprot/A1XWY7>). Os genes At3g29690 e At3g29680 são sequências próximas filogeneticamente e possivelmente relacionadas a síntese de agmatina. At2g39980 e At5g01210 possivelmente desempenham funções similares assim como At5g42830, At5g07850, At5g07860 e At5g07870 são próximas entre si. O gene At5g57840 classificado como pertencente ao clado Va possui sequência com alta similaridade com *DcHCBT* responsável pela síntese de hidroxinamoil.

Em arroz, foram anotadas funcionalmente um total de 27 sequências, sendo que Mitchell et al. (2007) inicialmente identificaram o grupo responsável pela biossíntese de ácido hidroxicinâmico, com 12 proteínas em arroz, e Bartley et al. (2013) ampliaram a análise identificando 20 proteínas em arroz e verificaram que esse clado se subdivide em dois: um contendo *OsAt1* a *OsAt10* (grupo A) e outro *OsAt11* a *OsAt20* (grupo B).

O subclado que contém *OsAt5*, foi relacionado com a incorporação de FA ao monolignol (KARLEN et al., 2016), já o subclado contendo *OsAt10* foi identificado como responsável pela incorporação de *pCA* à hemicelulose (BARTLEY et al., 2013) e o grupo *At9*, cuja função foi recentemente descrita como associada à incorporação de FA à hemicelulose (DE SOUZA et al., 2018, 2019). Já para o grupo de genes *At6* e *At7*, ainda não existem estudos que atribuam uma função específica.

Pela análise filogenética, pode-se inferir que o gene Os04g56910 possui similaridade ao gene *HvACT* responsável pela formação de hidroxicinamoil agmatina. O gene Os08g44840 pertencente ao clado Ib é ortólogo ao gene AtDCR (At5g23940), que codifica *PERMEABLE LEAVES 3 (PEL3)*, uma acil-transferase putativa. A mutação nesse *locus* resulta em fenótipo de tricoma alterado (os tricomas ficam emaranhados durante a expansão da folha).

Através da construção da filogenia de genes BAHD aciltransferases já identificados, *Arabidopsis* e arroz foi possível separar os genes em clados, prever funções de alguns deles e confirmar funções já existentes, porém muitos genes foram próximos filogeneticamente apenas de genes de *Arabidopsis* e arroz não identificados, não sendo possível, por apenas esse método, a previsão de suas funções.

## 4 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

A utilização de técnicas de engenharia genética para a inibição e ativação de genes da família BAHD aciltransferase para produção de produtos no contexto de uma biorrefinaria é extremamente interessante. Os produtos oriundos desta superfamília apresentam aplicações econômicas no contexto biotecnológico, farmacêutico, na agricultura e indústrias de cosméticos.

Além disso, esses metabólitos de fontes naturais, atuam também na mitigação de impactos ambientais que são causados através de produtos oriundos de fontes fósseis, como a diminuição de emissão gases que são responsáveis pelo efeito estufa.

Foi possível a classificação de sequências de arroz e *Arabidopsis* nos oito clados, assim como a confirmação de funções gênicas já descritas na literatura, demonstrando a eficácia da metodologia utilizada e a previsão funcional de alguns genes.

Como perspectiva futura, estudos precisam ser desenvolvidos visando a caracterização por meio de bioinformática e o estudo da funcionalidade de genes em diferentes espécies de interesse econômico que ainda não foram caracterizados pela literatura, além de estudo em laboratório para a caracterização funcional dos genes selecionados com potencial biotecnológico. Além da simulação em larga escala dos produtos sintetizados pela família BAHD aciltransferase através de *Softwares* de engenharia como o Aspen, assim como simulações econômicas destes metabólitos quando aplicados no contexto de uma biorrefinaria.



## REFERÊNCIAS

- BARTLEY, L. E. et al. Overexpression of a BAHD Acyltransferase, OsAt10, Alters Rice Cell Wall Hydroxycinnamic Acid Content and Saccharification. **Plant Physiology**, v. 161, n. 4, p. 1615–1633, 2013.
- BIANCHI, G. Glossy mutants: Level of action and level of analysis. In *Maize Breeding and Genetics*, D.B. Walden, ed (New York: John Wiley and Sons), p. 533-551, 1978.
- BURHENNE, K.; KRISTENSEN, B.K.; RASMUSSEN, S.K. A new class of N-hydroxycinnamoyltransferases. Purification, cloning, and expression of a barley agmatine coumaroiltransferase (EC 2.3.1.64). **J Biol Chem**, v. 278, p.13919-13927, 2003.
- CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 7, p. 1412–1421, 2010.
- COSTAGLIOLI, P.; JOUBES, K.; GARCIA, C.; STEF, M., ARVEILER, B.; LESSIRE R.; GARBAY, B. Profiling candidate genes involved in wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* by microarray analysis. **Biochim Biophys Acta**, v.1734, p.247-258, 2005.
- D'AURIA, J. C. Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 3, p. 331–340, 2006.
- D'AURIA, J. C. ; GERSHENZON, J. The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p.308-316, 2005.
- DE SOUZA, W. R. et al. Silencing of a BAHD acyltransferase in sugarcane increases biomass digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 111, p. 1–14, Dec. 2019.
- DUDAREVA, N., D'AURIA J.C.; NAM, K. H.; RAGUSO, R. A., PICHERS E. Acetyl-CoA:benzylalcohol acetyltransferase — an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. **Plant J**, v. 14, p. 297-304, 1998.
- EUDES, A. et al. Exploiting members of the BAHD acyltransferase family to synthesize multiple hydroxycinnamate and benzoate conjugates in yeast. **Microbial Cell Factories**, p. 1–16, 2016.
- ELLIS, B. B. E.; TOWERS, G. H. N. Biogenesis of Rosmarinic Acid in *Mentha*. p. 291–297, 1970.
- EL-SEEDI, HR, Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. **J Agric Food Chem**. 2012.
- FARESE, R. V.; Jr., CASES, S.; SMITH, S. J. Triglyceride synthesis: insights from the cloning of diacylglycerol acyltransferase. **Curr. Opin. Lipidol**. 11, p. 229–234, 2000.
- GIL, A. C. **Métodos e técnicas de pesquisa social**. 6th. ed. São Paulo : Atlas, 2008.
- HARBORNE, J.B.; GRAYER, R.J., The anthocyanins. In: *The flavonoids: advances in research since 1980*. Chapman & Hall, London, 1988, p. 1-20.
- HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A., *Phytochemistry* 55 (2000) 481–504.

- HEREDIA, F.J.; FRANCIA-ARICHA, E.M.; RIVAS-GONZALO, J.C., et al. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes-I. PH effect, **Food Chemistry**, v.63, n.4, p.491-498, 1998.
- HRAZDINA, G.; IREDALE, H.; MATTICK, L.R. et al. Anthocyanin composition of *Brassica oleracea* cv. Red Danish. **Phytochemistry**, v.16, n. 2, p. 297-299, 1977.
- IACOBUCCI, G.A.; SWEENEY, J.G., The chemistry of anthocyanins, anthocyanidins and related flavylum salts, *Tetrahedron*, v.39, p. 3005-3038, 1983.
- IEA. IEA bioenergy Task 42 on biorefineries: co-production of fuels, chemicals, power and materials from biomass. In: Minutes of the third Task meeting, Copenhagen, Denmark, 25–26 March 2007 <<http://www.biorefinery.nl/ieabioenergy-task42/>>; 2008.
- JENKS, M.A.; TUTTLE, H.A.; EIGENBRODE, S.D.; FELDMANN, K.A. Leaf epicuticular waxes of the *ecriferum* mutants in *Arabidopsis*. **Plant Physiol**, v.108, p. 369-377, 1995.
- JIN, Q. et al. Integrated processing of plant-derived waste to produce value-added products based on the biorefinery concept *Trends in Food Science & Technology* Integrated processing of plant-derived waste to produce value-added products based on the biorefinery concept. **Trends in Food Science & Technology**, v. 74, n. February, p. 119–131, 2018.
- KENNEDY, E. P. Biosynthesis of complex lipids. **Fed. Proc.** 20, p. 934–940, 1961.
- KIM, G. et al. Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds. p. 2083–2092, 2015.
- LAMBERT, F.; ZUCA, J.; NESS, F.; AIGLE, M. Production of ferulic acid and coniferyl alcohol by conversion of eugenol using a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Flavour Fragr. J.**, 29, p. 14-21, 2013.
- LÓPEZ O.P.; JIMÉNEZ A.R.; VARGAS F.D. et al. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability, *Critical Reviews Food Science Nutrition*, v.40, n.3, p.173-289, 2000.
- LUNG, S. C., and WESELAKE, R. J. *Lipids* 41, P 1073–1088, 2006.
- MARTIN, J.T.; JUNIPER, B.E. *The Cuticle of Plants*. **Edin-burgh, Scotland: Edward Arnold Ltd.**, 1970.
- MAZZA, G.; BROUILLARD, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chemistry*, v.25, p. 207-225, 1987.
- MAZZA, G.; MINIATI, E., *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. CRC Press, London, 1993, 362 p.
- OLMO, A.; CALZADA, J.; NUÑEZ, M. Benzoic Acid and Its Derivatives as Naturally Occurring Compounds in Foods and as Additives : Uses , Exposure and Controversy. v. 8398, n. December, 2015.

PEI K., OU, J., HUANG, J., Ou, S. p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.96(9), p.2952–2962

RICO, J.A .P.;SAUER,I.L.A review of Brazilian biodiesel experiences.**Renewable and Sustainable Energy Reviews**.v.45,p.513-529,2015.

SHALIT, M.; GUTERMAN, I;VOLPIN, H., BAR, E; TAMARI, T.; MENDA, N., ADAM, Z., ZAMIR, D.;VAINSTEIN, A.;WEISS, D.Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme A geraniol/citronellol acetyltransferase in developing rose petals.**Plant Physiol**, v. 131, p.1868-1876, 2003.

SOMAVAT, P.; KUMAR, D.; SINGH, V. Techno-economic feasibility analysis of blue and purple corn processing for anthocyanin extraction and ethanol production using modified dry grind process. **Industrial Crops and Products**, v. 115, p. 78–87, 2018.

SOUZA. A.F. **Análise filogenética e caracterização funcional de genes BAHD de cana-de-açúcar potencialmente envolvidos com a incorporação de ácidos hidroxicinâmicos na parede celular**. 2019. 146 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

ST-PIERRE B., DE LUCA V. EVOLUTION OF ACYLTRANSFERASE GENES : Origin and Diversification of the BAHD Superfamily of Acyltransferases Involved in Secondary Metabolism. 2000.

ST PIERRE, B.; LAFLAMME, P.; ALARCO, AM., DE LUCA, V.The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A dependent acyl transfer. **Plant J**, v. 14, p.703-713, 1998.

STEWART, C. Jr. et al. The Pun1 gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. p. 675–688, 2005.

SUZUKI,H. et al. cDNA Cloning, Heterologous Expressions, and Functional Characterization of Malonyl-Coenzyme A:Anthocyanidin 3-O-Glucoside-6"-O-Malonyltransferase from Dahlia Flowers.**Plant Physiol**. v.130, p. 2142–2151, 2002.

TANAKA,Y.;TSUDA,S.;KUSUMI,T.Metabolic Engineering to Modify Flower Color.**Plant Cell Physiol**. v. 39, p. 1119–1126, 1998.

THOMAS, D. Biochimie Biorefinery : Toward an industrial metabolism. v. 91, p. 659–664, 2009.

TILAY,A.; BULE, M.;KISHENKUMAR,J.; ANNAPURE,U. Preparation of ferulic acid from agricultural wastes: Its improved extraction and purification. **J. Agric. Food Chem.**, 56 , pp. 7644-7648, 2008.

TORNEY, F.; MOELLER, L.; SCARPA, A.; WANG, K.. Genetic engineering approaches to improve bioethanol production from maize. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18(3), p. 193–199, 2007.

TULLOCH, A.P. Chemistry of waxes of higher plants. In Chemistry and Biochemistry of

Natural Waxes, PE. Kolattukudy. **Elsevier**, p. 235-287, 1976.

TUOMINEN, L. K.; JOHNSON, V. E.; TSAI, C.-J. J. Differential phylogenetic expansions in BAHD acyltransferases across five angiosperm taxa and evidence of divergent expression among *Populus* paralogues. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 236, 2011.

URAJI, M.; KIMURA, M.; INOUE, Y.; KAWAKAMI, K.; Y. Kumagai, HARAZONO, K.; HATANAKA, T. Enzymatic production of ferulic acid from defatted rice bran by using a combination of bacterial enzymes **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 171, p. 1085-1093, 2013.

VERPOORTE, R. et al. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 467–479, 1999.

XIA, Y.; NIKOLAU, B. J.; SCHNABLE P. S. Developmental and hormonal regulation of the *Arabidopsis* CER2 gene that codes for a nuclear-localized protein required for the normal accumulation of cuticular waxes. **Plant Physiol**, v. 115, p. 925-937, 1997.