

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 14/10/2018.

TIAGO ANTUNES PAZ

Contribuição dos estudos proteômicos de células de *Maytenus ilicifolia* Mart. (Celastraceae)
para o entendimento da regulação do metabolismo secundário com foco nos triterpenos
quinonametídeos

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maysa Furlan
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Maria Soares
Pereira

Araraquara
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

P348c Paz, Tiago Antunes
Contribuição dos estudos proteômicos de células de *Maytenus ilicifolia* Mart. (Celastraceae) para o entendimento da regulação do metabolismo secundário com foco nos triterpenos quinonametídeos / Tiago Antunes Paz. – Araraquara : [s.n.], 2016 295 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Maysa Furlan
Coorientador: Ana Maria Soares Pereira

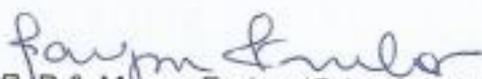
1. Espinheira santa. 2. Proteômica. 3. Células vegetais - Cultura e meios de cultura. 4. Bioinformática. 5. Metabólitos.
I. Título.

TIAGO ANTUNES PAZ

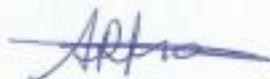
Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Química.

Araraquara, 14 de outubro de 2016.

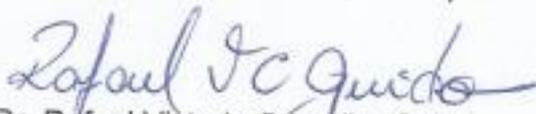
BANCA EXAMINADORA



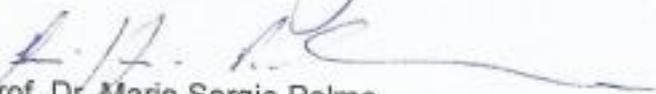
Prof^ª. Dr^ª. Maysa Furlan (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



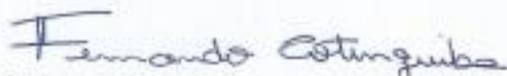
Prof^ª. Dr^ª. Angela Regina Araújo
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Prof. Dr. Rafael Victorio Carvalho Guido
Instituto de Física – USP, São Carlos - SP



Prof. Dr. Mario Sergio Palma
Instituto de Biociências, UNESP – Rio Claro - SP



Prof. Dr. Fernando Continguiuba da Silva
Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais Walter Mors – UFRJ, Rio de Janeiro - RJ

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Tiago Antunes Paz

E-mail: tiagoapaz@gmail.com

Nome em citações bibliográficas: PAZ, T. A.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Localizado em: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Araraquara

Endereço: Av. Prof. Francisco Degni, 55 - Jardim Quitandinha, Araraquara - SP, 14800-900 – Brasil

Telefone: (16) 3301-9500, ramal: 6785

Homepage: <http://www.iq.unesp.br>

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Pós-Graduação

Doutorado em Química (em andamento) – Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, SP (2012-2016).

Título: “Contribuição dos estudos proteômicos de células de *Maytenus ilicifolia* Mart. (Celastraceae) para o entendimento da regulação do metabolismo secundário com foco nos triterpenos quinonametídeos.”

Orientadora: Dra. Maysa Furlan.

Coorientadora: Dra. Ana Maria Soares Pereira.

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Mestrado em Química – Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, SP (2009-2011).

Título: “Aplicação da biotecnologia na obtenção de triterpenos quinonametídeos bioativos utilizando *Salacia campestris* (Celastraceae) como modelo.”

Orientadora: Dra. Maysa Furlan.

Coorientadora: Dra. Ana Maria Soares Pereira.

Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Graduação

Licenciatura em Química – Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, SC (2003-2007).

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Cursos

ESPCA SP, Advanced School on Bioorganic Chemistry. (Carga horária: 40h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, SP (2013).

Quality, antioxidants and technology in plants (Carga horária: 8h). Spring School "Brasil-Itália"- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, SP (2011).

The Importance of Microorganisms for Biotechnology (Carga horária: 8h). 7th Biota Symposium/7th Biota Program Assesment Meeting e 4th Bioprospecta Program Assesment Meeting-University of São Paulo, São Carlos, SP (2011).

RMN na metabolômica. (Carga horária: 6h). 34^a Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), Florianópolis, SC (2011).

RMN na metabolômica. (Carga horária: 6h). 34^a Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), Florianópolis, SC (2011).

Introdução à Genética da Conservação. (Carga horária: 8h). FMRP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto, SP (2010).

I Curso de Biossegurança: Conduas e Riscos. (Carga horária: 16h). Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP, Ribeirão Preto, SP (2010).

Química de produtos naturais: quimiodiversidade (Carga horária: 6h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Bauru, SP (2008).

Química Atmosférica: Princípios e Fatos. (Carga horária: 6h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Bauru, SP (2008).

Síntese Total de Produtos Naturais. (Carga horária: 6h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Bauru, SP (2008).

Biocatalise em química orgânica. (Carga horária: 3h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Bauru, SP (2008).

Tecnologia de Tintas. (Carga horária: 4h). Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, SC (2005).

ESTÁGIOS

Estágios de docência

Universidade: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, SP (2014-2014); **Disciplina da graduação:** Química Orgânica Experimental (P1); **Curso:** Engenharia Química; **Semestre/Ano:** 2º/2014; **Supervisora do estágio:** Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento

Escola: Escola Técnica de Comércio de Tubarão, Tubarão, SC. (fevereiro a julho de 2007); **Disciplina:** Química

Outros estágios

Universidade: Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP. (março a julho de 2008).

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

INÁCIO, M. C.; PAZ, T. A.; BERTONI, B. W.; PEREIRA, A. M. S.. Effect of environmental and phenological factors on the antimicrobial activity of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. roots. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 38, p. 467-473, 2016.

INÁCIO, M. C.; PAZ, T. A.; BERTONI, B. W.; PEREIRA, A. M. S. Germination of *Cochlospermum regium* seeds: influence of seed size, vials, vial sealing *in vitro*, and substrate *in vivo*. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 6, p. 26-33, 2015.

COPPEDE, J. S.; PINA, E. S.; PAZ, T. A.; FACHIN, A. L.; MARINS, M. A.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Cell cultures of *Maytenus ilicifolia* Mart. are richer sources of quinone-methide triterpenoids than plant roots in natura. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 33-43, Mar. 2014.

INÁCIO, M. C.; PAZ, T. A.; BERTONI, B. W.; VIEIRA, M. A. R.; MARQUES, M. O. M.; PEREIRA, A. M. S. Histochemical investigation of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. leaves and chemical composition of its essential oil. **Natural Product Research** (Print), v. 28, p. 1-5, 2014.

PAZ, T. A.; SANTOS, V. A. F. F. M. dos; INÁCIO, M. C.; PINA, E. S.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Production of the quinone-methide triterpene maytenin by *in vitro* adventitious roots of *Peritassa campestris* (Cambess.) A.C.Sm. (Celastraceae) and rapid detection and identification by APCI-IT-MS/MS. **BioMed Research International**, v. 2013, Jan. 2013. doi:10.1155/2013/485837.

INÁCIO, M. C.; CARMONA, F.; PAZ, T. A.; FURLAN, M.; SILVA, F. A. da; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Screening test for antibiotics in medicinal plants (STAMP): using powdered plant materials instead of extracts. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, p. 2340-2350, 2013.

Capítulos de livros publicados

ZINGARETTI, S. M.; PEREIRA, L. DE M.; INÁCIO, M. C., PAZ, T. A.; FRANÇA, S. C. Water stress and agriculture. In: Sener Akıncı. (Ed.). **Responses of Organisms to Water Stress**. 1ed.: Intech, 2013

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

LEAO, A. L.; DALBEN, L. C.; PAZ, T. A.; PUPO, H. F. F. Resíduos e Subprodutos da Indústria Sucroalcooleira, e sua Utilização no Processo de Compostagem em Substituição na Adubação Química. In: XV SIMPEP Simpósio de Engenharia de Produção, 2008, Bauru. Anais, 2008.

LEAO, A. L.; OLIVEIRA, A. F.; GONCALVES, J. E. ; SOUZA, S. F.; PAZ, T. A. Caracterização de Briquetes Produzidos a partir de Carvão Vegetal e Resíduos da

Agroindústria da Mandioca. In: XV SIMPEP - Simpósio de Engenharia de Produção, 2008, Bauru. Anais, 2008.

Resumos publicados em Anais de Congressos

PAZ, T. A.; INACIO, M. C.; PEREIRA, A. M. S.; FRANCA, S. C.; FURLAN, M. Produção de triterpenos quinonametídeos em raízes obtidas *in vitro* de *Salacia campestris* Walp. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis. Anais, 2011.

INACIO, M. C.; PAZ, T. A.; VIEIRA, M. A. R.; MARQUES, M. O. M.; PEREIRA, A. M. S. Caracterização histoquímica e análise dos constituintes voláteis de folhas de *Cochlospermum regium* Mart. Ex. Scharank.. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis. Anais, 2011.

INÁCIO, M. C.; PAZ, T. A.; ARCANJO, F.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S; C.; PEREIRA, A. M. S. P. Innovative method for evaluating plant drug antimicrobial activity: ATVD – Antimicrobial Test for Vegetal Drug. In: 3rd Brazilian Conference on Natural Products (BCNP), 2011, Ouro Preto. Anais, 2011.

PINA, E. S.; PAZ, T. A.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Qualitative analysis of quinone-methide triterpenes from root bark of *Peritassa laevigata*. In: 3rd Brazilian Conference on Natural Products (BCNP), 2011, Ouro Preto. Anais, 2011.

Participação em eventos

7th Biota Symposium/7th Biota Program Assesment Meeting e 4th Bioprospecta Program Assesment Meeting, 2011, USP-São Carlos, SP (Simpósio).

34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2011, Florianópolis, SC. (Congresso).

Algumas relações científicas da Química Orgânica. 2011, 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis, SC. (workshop).

IV Workshop NuBBE. 2009, UNESP-Araraquara, SP. (workshop).

V Semana da Química da UNESP. 2008, UNESP-Bauru, SP. (Encontro).

Semana de Tecnologia da Unisul e Fórum de Ensino de Tecnologia. 2005, UNISUL-Tubarão, SC. (Encontro).

Semana Acadêmica de Ciências Exatas e Tecnológicas. 2003, UNISUL-Tubarão, SC. (Seminário).

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro e mais especial agradecimento vai para minha orientadora, Dr.^a Maysa Furlan, por me oferecer todo o suporte científico possível, pelas discussões sempre produtivas, pela confiança e amizade que me foi concedida.

À minha coorientadora Dr.^a Ana Maria Soares Pereira pela orientação, dedicação, suporte científico, amizade, companheirismo, confiança que me foi dada e muito mais.

À minha fiel amiga e companheira de todas as horas Dr.^a Marielle Cascaes Inácio. Tu “me ajudo” demais Mari!

À todos meus familiares, minhas irmãs Flavia e Ingrid, minha tia Nete minha avó Romilda, meu avô Iardo e todos os outros. Em especial agradeço muito aos meus pais Aurelio e Terezinha por terem me criado com tanto empenho e carinho. Amo todos vocês.

À Erica por me acompanhar nos momentos mais estressantes da minha caminhada científica com tanta paciência.

À todos os professores que me ajudaram a chegar até aqui, em especial do Departamento de Química Orgânica deste Instituto e do Departamento de Biotecnologia de Plantas Medicinais da UNAERP.

À minha grande amiga Vânia, por seus ensinamentos e companheirismo.

Aos meus amigos e colegas de laboratório adquiridos durante o tempo de pós-graduação, em especial ao Amauri, ao Doni e ao Luizinho, vocês serão meus amigos para sempre!

À todos os funcionários do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, em especial aos técnicos João Bronzel e a Dr.^a Juliana Rodrigues.

Ao Prof. Dr. Mario Sérgio Palma e a Dr.^a Nathalia Baptista Dias da Unesp de Rio Claro pelo suporte nas análises proteômicas.

Às professoras que compuseram a minha banca de qualificação Dr.^a Angela Regina Araújo e Dr.^a Isabele Rodrigues Nascimento por suas contribuições.

Ao Instituto de Química da Unesp de Araraquara.

Aos professores que compuseram essa banca de defesa.

À UNAERP pela oportunidade e todo suporte que me foi dado na realização das pesquisas.

À Capes pela bolsa concedida.

RESUMO

Plantas biossintetizam uma ampla variedade de metabólitos secundários cujas atividades farmacológicas são consolidadas. No entanto, a obtenção em escala de metabólitos secundários a partir de plantas, muitas vezes, é restringida pelo acúmulo minoritário desses compostos em seus tecidos. Como muitas dessas moléculas apresentam elevada complexidade estrutural, sua obtenção por síntese orgânica pode ser ainda mais dificultada, tanto do ponto de vista econômico quanto ecológico. Contudo, as elucidações das vias metabólicas utilizadas pelas plantas na biossíntese dessas moléculas, sobretudo do ponto de vista enzimático, podem subsidiar o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas, como a engenharia metabólica, para enfrentar esses desafios. Nesse contexto, surge a espécie *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae), uma planta medicinal conhecida por produzir uma gama de metabólitos secundários bioativos, em especial, os triterpenos quinonametídeos (TQs), moléculas com pronunciada e abrangente atividade antitumoral. Desta forma, no presente trabalho foi realizado um estudo proteômico de células de *M. ilicifolia* com o objetivo principal de inventariar as enzimas de suas vias metabólicas secundárias, principalmente relacionadas a biossíntese dos TQs. Para isso, culturas de células de *M. ilicifolia* produtoras de TQs, maitenina (**1**) e 22- β -hidroximaitenina (**2**), foram elicitadas com metil jasmonato (100 μ M) por 12, 24, 48 e 96 h e monitoradas quanto a produção dos TQs por CLAE-DAD. Das células que apresentaram maior diferença de acúmulo de TQs (entre elicitadas e não - controle), foram realizadas extrações proteicas (proteínas solúveis) e análises por LCMS-IT-TOF, utilizando a estratégia *shotgun*. Por comparação com proteínas de espécies de plantas modelo, utilizando bases de dados, um total de 1319 proteínas foram detectadas em ambas as células. Dentre essas, foram identificadas, enzimas envolvidas na biossíntese de TQs, incluindo dos tipos P450 (CYP450s), que potencialmente catalisam os passos finais desta síntese. Enzimas envolvidas também na biossíntese de outros metabólitos secundários característicos da espécie, além de proteínas relacionadas ao metabolismo primário e ao estresse vegetal, também foram detectadas. Os resultados indicaram que a elicitação das células provocaram uma pronunciada variação em sua composição proteica, no entanto, preservando seu perfil funcional. As vias metabólicas secundárias intrínsecas à espécie, que levam, principalmente, a biossíntese de alcaloides (piridínicos sesquiterpênicos), polifenóis (catequinas, flavonoides e taninos) e terpenoides, permaneceram-se preservadas após a elicitação com MeJA. Em suma, os resultados obtidos neste estudo forneceram valiosas informações do proteoma de células de *M. ilicifolia* e oferecem possibilidades interessantes para futuras pesquisas, incluindo a perspectiva de

utilização do sistema *in vitro* para experimentos de engenharia metabólica, na busca de metabólitos secundários de interesse.

Palavras-chave: *Maytenus ilicifolia*. Cultura de células *in vitro*. Metil jasmonato. Proteômica. Proteoma. Metabólitos secundários. Triterpenos quinonametídeos. Maitenina. 22- β -hidroximaitenina.

ABSTRACT

Plants biosynthesize a wide variety of secondary metabolites with consolidated pharmacological activities. However, the large-scale production of secondary metabolites by plants is often restricted by minor accumulation of these compounds in their tissues. Many of these molecules shows high structural complexity so their obtainment by organic synthesis can be further complicated both economically and ecologically. However, the elucidation of metabolic pathways used by plants in the biosynthesis of these molecules, especially from the enzymatic point of view, can support the development of biotechnological tools such as metabolic engineering, to address these challenges. In this context, emphasis can be given to *Maytenus ilicifolia* species (Celastraceae), a medicinal plant that produces a range of bioactive compounds, including quinonamethide triterpenes (QMTs). Thus, in this study we performed a proteomic study of *M. ilicifolia* cells with the primary goal to provide an enzyme inventory of their secondary metabolic pathways, mainly for biosynthesis of QMTs. Based on it, *M. ilicifolia* cell cultures producing the QMTs maytenin (**1**) and 22- β -hydroxymaytenin (**2**) were elicited with methyl jasmonate (100 μ M) during 12, 24, 48 and 96 h and monitoring for QMTs production by HPLC-DAD. Cells that showed a higher QMTs accumulation (when comparing elicited and control cells.) were submitted to protein extractions and analyzed by LCMS-IT-TOF, using shotgun strategy. We have found 1319 proteins in both cells by comparison with proteins of the model plants from databases. Among them, enzymes involved in the biosynthesis of QMTs, including the cytochrome P450 (CYP450s) that potentially catalyze the final steps of this synthesis. We also have found enzymes involved in the biosynthesis of others secondary metabolites characteristic of the species, and proteins related to primary metabolism and the plant stress. The results indicated that the elicitation of cells caused pronounced change in their protein composition, however, maintaining its functional profile. The secondary pathways of species, leading mainly to alkaloid (sesquiterpene pyridine) biosynthesis, polyphenols (catechins, flavonoids and tannins) and terpenoids remained be preserved after elicitation with MeJA. In short, the results of this study provided valuable information *M. ilicifolia* cell proteome and offer interesting possibilities for future research, including *in vitro* system using perspective for metabolic engineering experiments in the search for secondary metabolites of interest.

Keywords: *Maytenus ilicifolia*. *In vitro* cell culture. Methyl jasmonate. Proteomics. Proteome. Secondary metabolites. Quinonamethide triterpenes. Maitenin. 22- β -hidroximaitenina.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Planta da espécie <i>Maytenus ilicifolia</i> .	28
Figura 2 - Congorinas isoladas de cascas de raízes de <i>Maytenus ilicifolia</i> .	29
Figura 3 - Alcaloides piridínicos sesquiterpênicos isolados de cascas de raízes de <i>Maytenus ilicifolia</i> .	30
Figura 4 - Maitansinoides (ansamicinas) isolados de <i>Maytenus ilicifolia</i> e trastuzumabe entansina (Kadcyla®), fármaco derivado de maitansina utilizado no tratamento de câncer de mama.	31
Figura 5 - Triterpenos lupanos (1-3), oleananos (5-7), ursano (8) e damarano isolados de folhas de <i>Maytenus ilicifolia</i> .	33
Figura 6 - Núcleo base (D: A-friedo-oleanano) dos triterpenos friedelanos.	34
Figura 7 - Triterpenos friedelanos isolados de <i>Maytenus ilicifolia</i> .	34
Figura 8 - Núcleo base (24- <i>nor</i> -D: A-friedo-oleonano) dos triterpenos quinonametídeos.	35
Figura 9 - Principais classes (tipos) de triterpenos quinonametídeos.	36
Figura 10 - Triterpenos quinonametídeos quinonametídeos e 14(15)-eno quinonametídeo isolados de cascas de raízes de <i>Maytenus ilicifolia</i> .	37
Figura 11 - Triterpenos quinonametídeos fenólicos e 6-oxofenólicos isolados de cascas de raízes de <i>Maytenus ilicifolia</i> .	39
Figura 12 - Triterpenos quinonametídeos diméricos isolados de cascas de raízes de <i>Maytenus ilicifolia</i> .	40
Figura 13 - Rota biossintética dos jasmonatos a partir do ácido linolênico.	44
Figura 14 - Reação da formação do bioativo (+)-7-isojasmônico-L- isoleucina	45
Figura 15 - Módulos de percepção e sinalização de jasmonato (JAs) na regulação do metabolismo secundário em plantas.	46
Figura 16 - Estrutura química de um peptídeo com as principais fragmentações.	54
Figura 17 - Calos e células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i> cultivados <i>in vitro</i> .	72
Figura 18 - Cromatograma de um extrato diclorometânico de células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i> obtido por CLAE.	72
Figura 19 - Proposta biossintética das etapas finais da biossíntese de maitenina (1) e 22 β -hidroximaitenina (2) a partir de celastrol e pristimerina.	73

Figura 20 - Curva analítica com padronização externa na faixa de 2,00 a 115 µg/mL para a maitenina (1).	75
Figura 21 - Curva analítica com padronização externa na faixa de 2,00 a 115 µg/mL para o 22β-hidroximaitenina (2).	75
Figura 22 - Gráfico do teor dos triterpenos quinonametídeos maitenina (1) e 22β-hidroximaitenina (2) nas células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i> , elicitadas e não elicitadas com 100 µM de MeJa, incubadas por 0, 6, 12, 48 e 96 h.	76
Figura 23 - Curva analítica construída com valores de concentração de albumina bovina <i>versus</i> absorbância.	78
Figura 24 - Perfil eletroforético dos extratos proteicos de <i>M. Ilicifilia</i> .	79
Figura 25 - Origem taxonômica das proteínas identificadas nas células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i> elicitadas e não elicitadas (células controle) com 100 µM de metil jasmonato por 48 h, nas espécies vegetais modelo. Gráfico construído a partir dos dados gerados do pelo Blast2GO.	81
Figura 26 - Classificação funcional das proteínas das células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i> não elicitadas e elicitadas com 100 µM de metil jasmonato por 48 h. As proteínas foram categorizadas de acordo com seus termos GO (<i>Gene Ontology</i>) utilizando o Blast2GO.	84
Figura 27 - Classificação geral das enzimas das células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i> não elicitadas e elicitadas com 100 µM de metil jasmonato por 48 h. As enzimas foram categorizadas de acordo com seus números EC (<i>Enzyme Commission</i>) a partir da base de dados <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway database</i> (KEGG), utilizando o Blast2GO.	85
Figura 28 - Resumo das vias metabólicas preditas a partir das enzimas encontradas nas células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i> não elicitadas (células controle, CCs) e elicitadas (CEs) com 100 µM de metil jasmonato por 48 h.	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Método de eluição para as análises por CLAE.	62
Tabela 2 - Padrões proteicos utilizados no experimento de eletroforese e suas respectivas massas moleculares.	66
Tabela 3 - Teor dos triterpenos quinonametídeos maitenina (1) e 22 β -hidroximaitenina (2) nas células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i> , elicitadas e não elicitadas com 100 μ M de MeJa, incubadas por 0, 6, 12, 48 e 96 h.	76
Tabela 4 - Anotações funcionais realizadas a partir do UniProt referentes à função molecular (FM, <i>molecular function</i>), processo biológico (PB, <i>biological processes</i>) e atividade catalítica (AC) das proteínas encontradas nas células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i> elicitadas (CEs) e não elicitadas (células controle, CCs) por 48 h.	80
Tabela 5 - Subclasses das enzimas oxidorreduções encontradas nas células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i> não elicitadas (células controle, CCs) e elicitadas (CEs) com 100 μ M de metil jasmonato por 48 h. As enzimas foram categorizadas de acordo com seus números EC (<i>Enzyme Commission</i>) a partir da base de dados <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway database</i> (KEGG), utilizando o Blast2GO.	86
Tabela 6 - Subclasses das enzimas transferases encontradas nas células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i> não elicitadas (células controle, CCs) e elicitadas (CEs) com 100 μ M de metil jasmonato por 48 h. As enzimas foram categorizadas de acordo com seus números EC (<i>Enzyme Commission</i>) a partir da base de dados <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway database</i> (KEGG), utilizando o Blast2GO.	87
Tabela 7 - Subclasses das enzimas hidrolases encontradas nas células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i> não elicitadas (células controle, CCs) e elicitadas (CEs) com 100 μ M de metil jasmonato por 48 h. As enzimas foram categorizadas de acordo com seus números EC (<i>Enzyme Commission</i>) a partir da base de dados <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway database</i> (KEGG), utilizando o Blast2GO.	88
Tabela 8 - Subclasses das enzimas liases encontradas nas células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i> não elicitadas (células controle, CCs) e elicitadas (CEs) com 100 μ M de metil jasmonato por 48 h. As enzimas foram categorizadas de acordo com seus números EC (<i>Enzyme Commission</i>) a partir da base de dados <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway database</i> (KEGG), utilizando o Blast2GO.	88
Tabela 9 - Subclasses das enzimas isomerases encontradas nas células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i> não elicitadas (células controle, CCs) e elicitadas (CEs) com 100 μ M de metil jasmonato por 48 h. As enzimas foram categorizadas de acordo com seus números EC (<i>Enzyme Commission</i>) a partir da base de	

dados <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway database</i> (KEGG), utilizando o Blast2GO.	89
Tabela 10 - Subclasses das enzimas ligases encontradas nas células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i> não elicitadas (células controle, CCs) e elicitadas (CEs) com 100 µM de metil jasmonato por 48 h. As enzimas foram categorizadas de acordo com seus números EC (<i>Enzyme Commission</i>) a partir da base de dados <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway database</i> (KEGG), utilizando o Blast2GO.	90
Tabela 11 - Vias metabólicas das enzimas encontradas nas células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i> não elicitadas (células controle, CCs) e elicitadas (CEs) com 100 µM de metil jasmonato por 48 h, preditas pelo Blast2GO em conjunto com a base de dados KEGG pathway.	91
Tabela 12 - Enzimas encontradas nas células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i> não elicitadas (células controle, CCs) e elicitadas (CEs) com 100 µM de metil jasmonato por 48 h com seus respectivos números EC (<i>Enzyme Commission</i>), nomes aceitos (oficiais) substratos e produtos. As informações foram extraídas do <i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i> (IUBMB, http://www.iubmb.org/).	98
Tabela A1 - Proteínas encontradas nas células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i> não elicitadas (células controle, CCs), categorizadas de acordo com o Gene Ontology (GO) seus números EC (<i>Enzyme Commission</i>), a partir da base de dados <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway database</i> (KEGG), utilizando o Blast2GO.	132
Tabela A2 - Proteínas encontradas nas células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i> elicitadas (CEs) com 100 µM de metil jasmonato por 48 h, categorizadas de acordo com o Gene Ontology (GO) seus números EC (<i>Enzyme Commission</i>), a partir da base de dados <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway database</i> (KEGG), utilizando o Blast2GO.	220

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(+)-7-iso-JA	(+)-7-isojasmônico
1D	unidimensional
2,4-D	ácido diclorofenoxiacético
2D	bidimensional
2-OG	2-oxoglutarato
ACN	acetonitrila
ADC	<i>arginine decarboxylase</i>
AJ	ácido jasmônico
AOC	<i>allene oxide cyclase</i>
AOS	<i>allene oxide synthase</i>
AS	ácido salicílico
ATP	trifosfato de adenosina
B2G	Blast2GO
CAD	dissociação induzida por colisão (<i>collisionally activated dissociation</i>)
CAD1	<i>cinnamyl-alcohol dehydrogenase cad 1</i>
CB	calos brancos
CBS	calos brancos secos
CCs	células controle
CEs	células elicidadas
CES	calos escuros secos
CID	dissociação induzida por colisão (<i>collision-induced dissociation</i>)
CL	cromatografia líquida
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CoA	coenzima A
COI1	<i>coronatine-insensitive 1</i>

C-terminal	carbono terminal
CYP450s	monooxigenases dependentes do citocromo P450
DAD	detector de arranjo de diodos
DCM	diclorometano
DMAPP	difosfato de dimetilalilo
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	ditiotreitól
EC	Enzyme Commission
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético (dissódico)
EFS	extração em fase sólida
EM	espectrometria de massas
EM ⁿ	espectrometria de massas sequencial
ESI	ionização por <i>electrospray</i>
EtOH	etanol
FPP	difosfato de farnesila
FR	fase reversa
FS	friedelina sintase
FT-ICR	ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier
GO	Gene Ontology
GPP	difosfato de geranila
HIV	vírus da imunodeficiência humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
IAA	iodoacetamida
IC ₅₀	50% da concentração inibitória máxima (<i>half maximal inhibitory concentration</i>)
IPP	difosfato de isopentenilo
IT	armadilha de íons (<i>ion-trap</i>)
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology

JA-Ile	(+)-7-isojasmônico-L-isoleucina
JAR1	ácido jasmônico-amino sintetase
JAs	jasmonatos
JAZ	<i>jazmonate zim domain</i>
JMT	<i>jasmonic acid carboxyl methyltransferase</i>
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LCMS-IT-TOF	cromatografia líquida/espectrometria de massas/armadilha de íons/tempo de voo (<i>liquid chromatograph/mass spectrometry/ion trap/time-of-flight</i>)
L-Glu	L-glutamato
LOX2S	lipoxigenase
<i>m/z</i>	relação massa-carga
MALDI	dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz (<i>matrixassisted laser desorption/ionization</i>)
MeJA	metil jasmonato
MeOH	metanol
MEP	fosfato de metileritritol
min	minutos
mL	mililitros
MM	massa molecular
MudPIT	tecnologia multidimensional para identificação de proteínas (<i>multidimensional protein identification technology</i>)
MVA	mevalonato
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NCBInr	National Center for Biotechnology Information non-redundant protein database
N-terminal	nitrogênio terminal
<i>on/off switch</i>	ativação/desativação de gene interruptor

OPC-8:0	8-[(1R,2R)-3-oxo-2-{(Z)-pent-2-enil}ciclopentil]octanoato
OPR3	12-oxo-fitodienoico redutase
Orbitrap	espectrômetro de massas de alta resolução com analisador do tipo armadilha de íons de Kingdon
OSB	o-succinilbenzoato
OSC	<i>oxidosqualene cyclase</i>
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PAL	<i>phenylalanine ammonia-lyase (PAL)</i>
PEP	fosfoenolperuvato
Pi	fosfato inorgânico
PMF	impressão digital de massas peptídicas (<i>peptide mass fingerprint</i>)
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
POD	<i>peroxidase</i>
OPR3	<i>acid 12-oxophytodienoate reductase</i>
PPi	difosfato inorgânico
ppm	partes por milhão
PVP	polivinilpirrolidona
PVPP	polivinilpolipirrolidona
RENISUS	relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS
RMN ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RNA	ácido ribonucleico
ROS	espécies reativas de oxigênio
rpm	rotações por minuto
SCX	cromatografia de troca catiônica forte (<i>strong cation exchange</i>)
SDS	dodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SQS	<i>squalene synthase</i>

TCA	ácido tricarbóxico
TCA ciclo	ciclo do citrato
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilenodiamina
TFA	ácido trifluoroacético
TFs	fatores transcritoriais
Tify <i>motif</i>	motivo proteico Tify
TOF	tempo de vôo (<i>time-of-flight</i>)
TPL	TOPLESS
TQs	triterpenos quinonametódeos
TRIS	triidroxiaminometano
UFLC	cromatografia líquida ultrarrápida (<i>Ultra Fast Liquid Chromatography</i>)
UniProt	Universal Protein Resource
UV	ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	micro
$<$	menor que
\leq	menor ou igual a
$=$	sinal de igual
$>$	maior que
\geq	maior ou igual
\approx	aproximadamente
a	coeficiente angular
Ar	argônio
atm	atmosfera
b	coeficiente linear
Da	daltons
E	glutamato
g	gramas
h	horas
Hz	hertz
K	lisina
k	quilo
L	litros
M	metionina
m ²	metro quadrado
mg	miligramas
mseg	milissegundos
N	asparagina
°C	grau Celsius

P	prolina
P	probabilidade absoluta
Pa	pascal
Q	glutamina
Q	glutamina
R	arginina
R	resíduos de aminoácidos
r	coeficiente de correlação
s	segundos
S	serina
T	treonina
V	volts
λ	comprimento de onda
μm	micrometros
π	pi

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
1.1	A família Celastraceae e o gênero <i>Maytenus</i>	26
1.3	Triterpenos de <i>Maytenus ilicifolia</i>	32
1.3.1	Triterpenos quinonametídeos	34
1.4	Cultura de tecidos vegetais como fonte metabólitos secundários	40
1.5	Elicitação em culturas <i>in vitro</i> de células vegetais	41
1.6	Jasmonatos: biossíntese, percepção, sinalização e resposta do metabolismo secundário vegetal	42
1.6.1	Biossíntese	43
1.6.2	Percepção e sinalização	44
1.7	Proteoma	47
1.8	Proteômica	48
1.8.1	Digestão proteolítica para análises de <i>shotgun</i>	49
1.8.2	Métodos de separação e fracionamento em proteômica	50
1.8.3	Espectrometria de massas aplicada em proteômica <i>shotgun/bottom-up</i>	51
1.8.4	Identificação de proteínas em bancos de dados	52
1.8.5	Processos de fragmentação de peptídeos	53
1.8.6	Anotação funcional de proteínas	56
2	OBJETIVOS	58
2.1	Geral	58
2.2	Específicos	58
3	MATERIAL E MÉTODOS	59
3.1	Condições gerais dos experimentos	59
3.2	Multiplicação do material vegetal <i>in vitro</i>	59
3.2.1	Calos de <i>Maytenus ilicifolia</i>	59
3.2.2	Células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i>	59
3.3	Controle da oxidação fenólica das células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i>	59
3.4	Elicitação das células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i> com metil jasmonato (MeJA)	60
3.5	Análises fitoquímicas	60
3.5.1	Preparo dos extratos	60
3.5.2	<i>Clean-up</i> das amostras para análise por CLAE-DAD	61
3.5.3	Quantificação dos TQs por CLAE-DAD	61
3.5.4	Curva analítica	62

3.6	Análises proteômicas	62
3.6.1	Preparo dos extratos proteicos (proteínas solúveis) dos calos de <i>Maytenus ilicifolia</i>	63
3.6.2	Preparo dos extratos proteicos (proteínas solúveis) das células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i>	63
3.6.3	Dosagem proteica dos extratos	63
3.6.3.1	Preparo do reagente de Bradford	64
3.6.3.2	<i>Construção da curva analítica utilizando albumina bovina</i>	64
3.6.3.3	<i>Análise dos extratos</i>	64
3.6.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (monodimensional)	64
3.6.5	Preparo das amostras e dos padrões para a análise de eletroforese	66
3.6.6	Preparo, desenvolvimento e revelação do gel	66
3.6.7	Revelação do gel	67
3.6.8	Experimentos para as análises em <i>shotgun</i>	68
3.6.8.1	<i>Digestão “em-solução” das proteínas para análise em shotgun</i>	68
3.6.8.2	<i>Espectrometria de massas – LCMS-IT-TOF</i>	68
3.6.8.3	<i>Detecção das proteínas</i>	69
3.6.8.4	<i>Análise dos dados, bioinformática e anotação funcional das proteínas</i>	70
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1	Multiplicação de células em suspensão e calos <i>Maytenus ilicifolia</i> e controle da oxidação fenólica	71
4.2	Análises por CLAE-DAD dos TQs biossintetizados pelas células de <i>Maytenus ilicifolia</i>	72
4.2.1	Análises quantitativas dos TQs das células de <i>Maytenus ilicifolia</i> elicidadas e não elicidadas com MeJA realizadas por CLAE-DAD	74
4.3	Análises proteicas	77
4.3.1	Dosagem proteica dos extratos	77
4.3.2	Análise do perfil proteico em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (monodimensional)	78
4.4	Identificação das proteínas por espectrometria de massas	79
4.4.1	Anotação funcional das proteínas realizadas manualmente	80
4.4.2	Identificação e anotação funcional das proteínas realizadas com o Blast2GO (B2G)	80
4.4.3	Classificação das enzimas realizadas com o Blast2GO (B2G)	85
4.4.3.1	<i>Oxidoredutases (EC 1.x.x)</i>	86
4.4.3.2	<i>Transferases (EC 2.x.x)</i>	87
4.4.3.3	<i>Hidrolases (EC 3.x.x)</i>	87
4.4.3.4	<i>Liases (EC 4.x.x)</i>	88
4.4.3.5	<i>Isomerases (EC 5.x.x)</i>	88

4.4.3.6 <i>Ligases (EC 6.x.x)</i>	89
4.4.4 Vias metabólicas das enzimas	90
4.4.4.1 <i>Enzimas envolvidas na biossíntese dos triterpenos quinonametídeos (TQs)</i>	104
4.4.4.2 <i>Outras enzimas envolvidas no metabolismo secundário</i>	107
4.4.4.3 <i>Enzimas envolvidas no metabolismo primário</i>	108
4.4.4.4 <i>Proteínas relacionadas ao estresse</i>	110
5 CONCLUSÃO	111
REFERÊNCIAS	112
APÊNDICE A - Proteínas detectadas nas células em suspensão de <i>Maytenus ilicifolia</i> .	132

1 INTRODUÇÃO

1.1 A família Celastraceae e o gênero *Maytenus*

A família Celastraceae é composta, em sua maioria, por espécies vegetais distribuídas nas regiões tropicais de todo o planeta e, em sua minoria, nas regiões subtropicais e temperadas¹. Essa família consiste de árvores, arbustos, lianas lenhosas e, menos comumente, ervas perenes e anuais. Suas flores são normalmente pequenas, actinomorfas, bi ou unissexuais, tetrâmeras ou pentâmeras e apresentam uma ampla variedade de tipos de frutos e carúnculas.²

No táxon Celastraceae estão incluídos cerca de 100 gêneros e 1200 espécies, agrupadas e quatro subfamílias: Celastroideae, Hippocrateoideae, Salacioideae e Stackhousioideae³. Entretanto, principalmente em razão do número limitado de trabalhos taxonômicos realizados na família e da delimitação controversa de alguns gêneros, esses números podem variar de 55 a 94 gêneros e de 850 a 1300 espécies.⁴

A família foi descrita em 1814 pelo naturalista Robert Brown e, desde então, diversas variações em sua delimitação ocorreram, de acordo com os sistemas de classificação adotados⁵. Uma das mais importantes divergências foi o caso da Hippocrateaceae, ora reconhecida como uma família independente^{6,7}, ora considerada membro de Celastraceae⁸. No entanto, baseado nas últimas pesquisas em filogenia molecular, Celastraceae só pode ser considerada monofilética se Hippocrateaceae estiver incluída.^{1,4,5}

Dentre os numerosos gêneros de Celastraceae encontrados no continente americano, o maior deles é o *Maytenus*. Este agrupa cerca de 120-140 espécies, as quais são amplamente distribuídas e ocorrem desde as regiões subantárticas da Terra do Fogo, no extremo sul do continente, até o sul dos Estados Unidos (estados da Flórida e Texas), numa amplitude que vai desde o nível do mar até 3900 m de altitude em regiões andinas.⁹

Exemplares de *Maytenus* podem ser encontrados em praticamente todos os tipos de vegetação. Além de diversificadas áreas florestais e savânicas (Cerrado), há espécies presentes em chacos úmidos e secos, salinas, campos rupestres, mangues e afloramentos rochosos⁵. Seu centro de diversidade é a América do Sul¹⁰, sendo o Brasil o país que possui o maior número de espécies deste gênero: 49 táxons, dos quais 36 são endêmicos, distribuídos em todos os domínios fitogeográficos e ao longo de todos os estados brasileiros.¹¹

Do ponto de vista etnofarmacológico, as plantas do gênero *Maytenus* desempenham um papel de grande destaque, principalmente no cenário Sul Americano. Um grande número espécies de *Maytenus* têm sido relatadas por sua utilização na medicina popular, para os mais

variados fins terapêuticos, em especial para o tratamento de gastrites. Dentre as várias espécies relatadas para esses propósitos, a mais comumente utilizada é a *Maytenus ilicifolia*.¹²

Em relação a estudos químicos das espécies de Celastraceae, uma grande variedade de metabólitos secundários bioativos têm sido isolados, com destaque para terpenos, incluindo sesquiterpenos de esqueleto agarofurano^{13,14}, diterpenos dos tipos ent-rosano¹⁵, abietano^{16,17}, ent-labdano¹⁸, kaurano¹⁹, norisopimaradieno²⁰, totarano¹⁷ e podocarpano²¹ e triterpenos dos tipos friedelano^{14,22}, lupano²³, oleanano, ursano²⁴, glutinano²⁵, fenólico²⁶, dimérico²⁷, trimérico²⁸ e quinonametideo.²⁹⁻³²

1.2 A Espécie *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek

A espécie *Maytenus ilicifolia* (Figura 1) ocorre no Brasil, nos Estados de Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, no Paraguai, na Bolívia e no leste da Argentina^{33,34}. Pesquisas etnobotânicas em conjunto com levantamentos bibliográficos realizados por Mariot e Barbieri³⁵ em 2007, revelaram que *Maytenus ilicifolia* é conhecida popularmente no Brasil, dependendo da região, como: “cancerosa”, “cancorosa”, “cancorosa-de-sete-espinhos”, “congorça”, “erva-cancerosa”, “erva-santa-maria”, “espinheira-santa”, “espinho-de-deus” e “salva-vidas”. Na Argentina e Uruguai pode ser conhecida como “quebrachillo”, “sombra-de-toro”, “maiteno”, “cancerosa”, “cancrosa” e “coromilho-do-campo”.

Há relatos etnofarmacológicos de que *M. ilicifolia* é utilizada na medicina tradicional para o tratamento de problemas renais, intestinais, de bexiga, como depurativa do sangue, como analgésica, contraceptiva, afrodisíaca, cicatrizante, antitumoral e, em especial, para tratamento de distúrbios estomacais como gastrites crônicas e úlceras.³⁵⁻³⁷

Atualmente, a espinheira-santa é explorada comercialmente pela indústria de fitoterápicos e não é difícil encontrá-la no comércio informal na forma de extrato seco liofilizado (para preparação de chás), na forma de tintura, em cápsulas e como droga vegetal (planta *in natura* seca e moída)³⁸. Atualmente, a indústria farmacêutica tem produzido e comercializado fitomedicamentos contendo *M. ilicifolia* (Gastrosil®, Gastriless®, Epaliv® e outros)³⁹. A ação farmacológica antiulcerogênica *M. ilicifolia* é reconhecida pelo Ministério da Saúde do Brasil e atualmente está presente na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS).⁴⁰

Os inúmeros estudos químicos pioneiros e contemporâneos realizados com a espécie em questão, possibilitaram a aquisição de um pequeno inventário das estruturas químicas

intrínsecas ao metabolismo secundário de *M. ilicifolia*. Entre as classes de metabólitos secundários isolados na espécie, destacam-se: flavonoides⁴¹, taninos⁴², alcaloides⁴³ e triterpenoides quinonametídeos.^{22,44-46}

Figura 1 - Planta da espécie *Maytenus ilicifolia*.

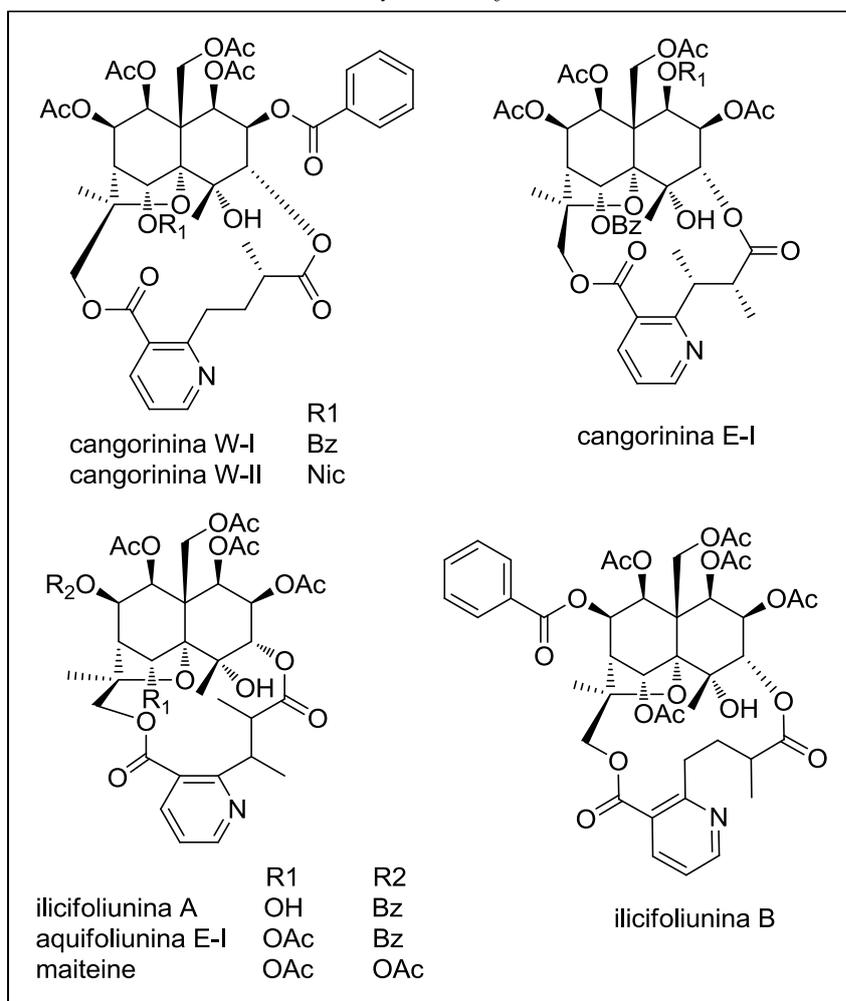


Fonte: Lorenzi³³(1998, p. 70).

Análises por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (IES-EM) realizadas (*off-line*) com extratos de folhas de *M. ilicifolia*, previamente fracionados por cromatografia, culminaram na identificação mono-, di-, tri- e tetra-glicosídeos de flavonol contendo kaempferol, quercetina ou miricetina⁴¹. Outras investigações químicas de folhas

I, do tipo evoninato de base euoniminol⁶² (Figura 3). As cangorininas citadas também se incluem na categoria de alcaloides piridínicos sesquiterpênicos.^{53,62,63}

Figura 3 - Alcaloides piridínicos sesquiterpênicos isolados de cascas de raízes de *Maytenus ilicifolia*.

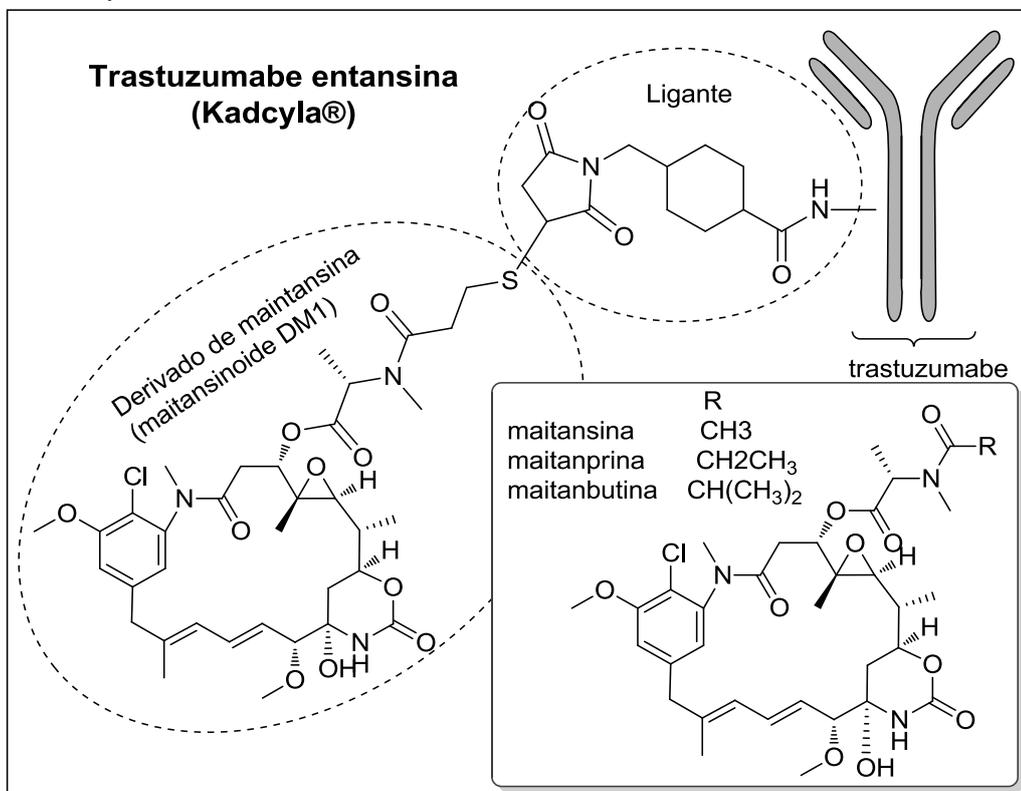


Fonte: Elaborada pelo autor.

Mais recentemente (2012), também a partir das cascas de raízes da espécie, foram isolados quatro alcaloides piridínicos cujas estruturas químicas foram estabelecidas por análises espectrométricas como: ilicifoliuninas A e B, maiteina e aquifoliunina E-I (Figura 3). Avaliações das atividades biológicas desses alcaloides revelaram que a aquifoliunina E-I é um potente antiprotozoário. Seus valores de IC₅₀ frente à *Leishmania chagasi* e *Trypanosoma cruzi*, respectivamente, foram de 1,4 e 41,9 µM, números similares aos apresentados pelos controles positivos (pentamidina, IC₅₀ = 5,1 µM e benzonidazol, IC₅₀ = 42,7 µM), os quais são fármacos atualmente utilizados nos tratamentos de leishmaniose e tripanossomíase. Os autores do mesmo trabalho sugerem que a ação antiprotozoária dessas substâncias nitrogenadas está relacionada

aos diferenciados substituintes ésteres do diidro- β -agarofurano (porção sesquiterpênica) desses alcaloides.⁴³

Figura 4 - Maitansinoides (ansamicinas) isolados de *Maytenus ilicifolia* e trastuzumabe entansina (Kadcyla®), fármaco derivado de maitansina utilizado no tratamento de câncer de mama.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Além dos alcaloides piridínicos sesquiterpênicos, em *Maytenus ilicifolia* foram isolados três maitansinoides: maitansina, maitanprina e maitanbutina⁶⁴ (Figura 4). Os maitansinoides são alcaloides macrolídeos pertencentes à classe das ansamicinas, moléculas conhecidas por sua potente ação antibiótica, bem como citotóxica⁶⁵⁻⁶⁸. Entre eles, maitansina é uma potente droga que atua nos microtúbulos de células tumorais⁶⁹. Este agente citotóxico liga-se à proteína tubulina, localizada nas extremidades dos microtúbulos, provocando sua supressão dinâmica (despolimerização) e, conseqüentemente, interrompendo o ciclo celular⁷⁰. Com o propósito de atenuar sua extrema citotoxicidade, bem como direcionar sua ação especificamente para células carcinogênicas, extensivos estudos utilizando maitansina conjugada à anticorpos foram realizados⁷¹. Conseqüentemente, em 2013, o complexo formado pela conjugação de maitansina e o anticorpo monoclonal trastuzumabe, através de uma molécula adaptadora (ligante) (Figura 4), foi aprovado como medicamento antineoplásico para utilização no tratamento de câncer de mama⁷². Atualmente, esse medicamento, trastuzumabe entansina, é comercializado pela companhia farmacêutica Roche (F. Hoffmann-La Roche AG) com o nome de Kadcyla®.

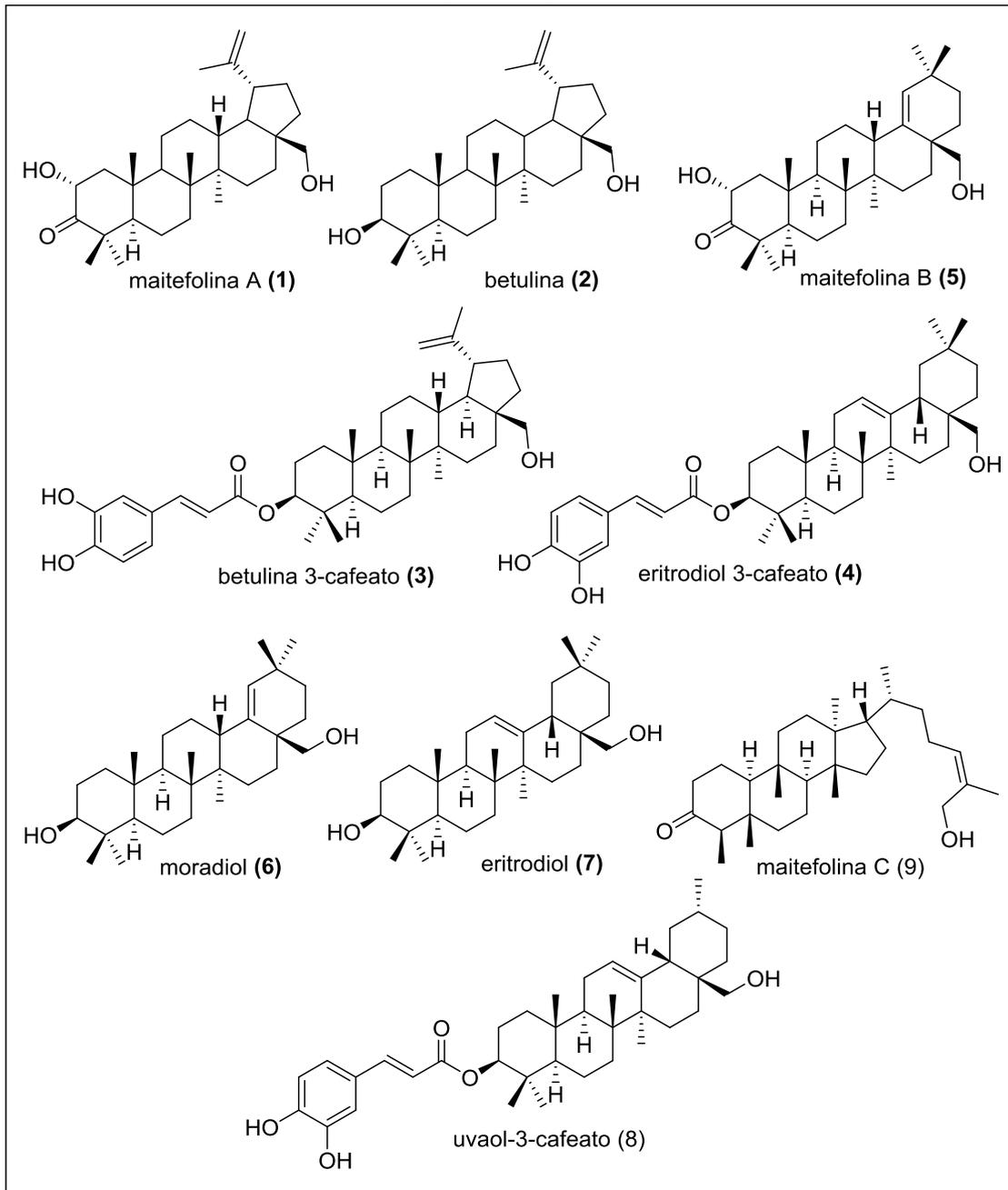
Embora a diversidade química de *Maytenus ilicifolia* já se afigure rica pelo exposto, a maior pluralidade, dentre os metabólitos secundários relatados na espécie, é atribuída aos triterpenos, em especial aos triterpenos quinonametídeos, biossintetizados a partir do triterpeno friedelano friedelina.²²

1.3 Triterpenos de *Maytenus ilicifolia*

Variadas classes de triterpenoides têm sido reportadas na espécie *Maytenus ilicifolia*, tanto nas folhas quanto nas raízes. Nas folhas, Ohsaki et al.⁷³ isolaram e caracterizaram as estruturas dos triterpenos lupanos maitefolina A, betulina, e betulina-3-cafeato, dos triterpenos oleananos maitefolina B, moradiol, eritrodiol e eritrodiol-3-cafeato, do ursano uvaol-3-cafeato e do triterpeno damarano, derivado do esqueleto D:A-friedoeufano, maitefolina C (Figura 5). No mesmo trabalho, os pesquisadores verificaram ação citotóxica de todos os compostos e encontraram significativa ação citotóxica para eritrodiol frente à três linhagens de células tumorais.

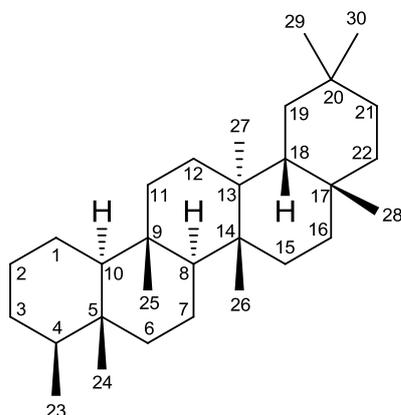
Outra importante classe de metabólitos secundários biossintetizados pela espécie é a dos friedelanos, um grupo de triterpenoides pentacíclicos baseados no esqueleto D: A-friedo-oleanano^{74,75} (Figura 6). Na natureza, os friedelanos são os triterpenos mais frequentemente encontrados na família Celastraceae⁷⁶.

Figura 5 - Triterpenos lupanos (1-3), oleananos (5-7), ursano (8) e damarano isolados de folhas de *Maytenus ilicifolia*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

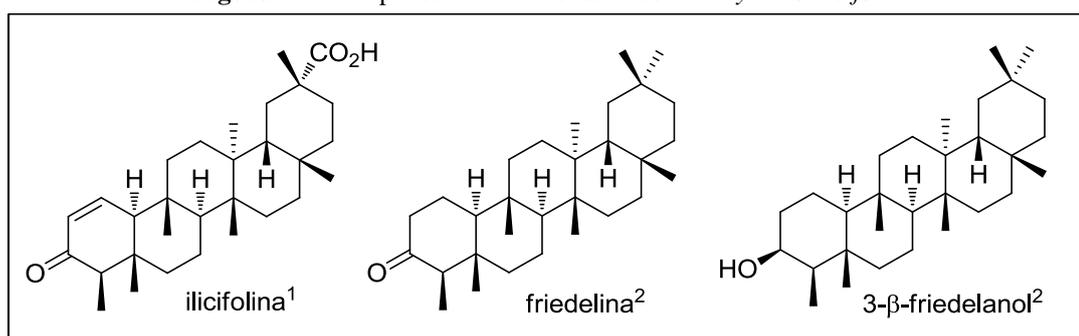
Figura 6 - Núcleo base (D: A-friedo-oleanano) dos triterpenos friedelanos.



Fonte: Adaptado de Shirley; Hooper⁷⁴ (1979, p. 711).

A partir de folhas de *M. ilicifolia*, foram caracterizados os triterpenos friedelanos 3 β -friedelanol e friedelina⁷⁷, enquanto nas cascas de raízes foi detectado a ilicifolina⁷⁸ (Figura 7). Experimentos de biossíntese realizados por incorporação *in vitro* de mevalonolactona-5-³H em folhas de *M. aquifolia* e *Peritassa campestris* (Celastraceae) e determinação de atividades das enzimas ciclases presentes no mesmo órgão, demonstraram que os últimos triterpenos friedelanos 3 β -friedelanol e friedelina citados são biossintetizados nas folhas e posteriormente translocados para as raízes, onde são biotransformados nessas espécies (por oxidações enzimáticas) nos triterpenos quinonametídeos.²²

Figura 7 - Triterpenos friedelanos isolados de *Maytenus ilicifolia*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

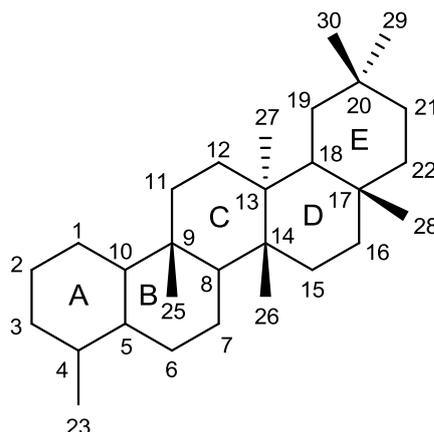
¹Isolado de cascas de raízes; ²isolados de folhas.

1.3.1 Triterpenos quinonametídeos

Os triterpenos quinonametídeos (TQs) constituem um grupo relativamente pequeno de metabólitos que ocorrem exclusivamente em plantas da família Celastraceae. Sendo assim, são

considerados marcadores quimiotaxômicos da família e também conhecidos como “celastroides”^{79,80}. Do ponto de vista estrutural, são moléculas derivadas do núcleo 24-*nor*-D: A-friedo-oleonano (figura 8) que apresentam um conjunto de insaturações variáveis e funcionalidades oxigenadas nos carbonos 2 e 3, invariavelmente.^{79,80}

Figura 8 - Núcleo base (24-*nor*-D: A-friedo-oleonano) dos triterpenos quinonametídeos.

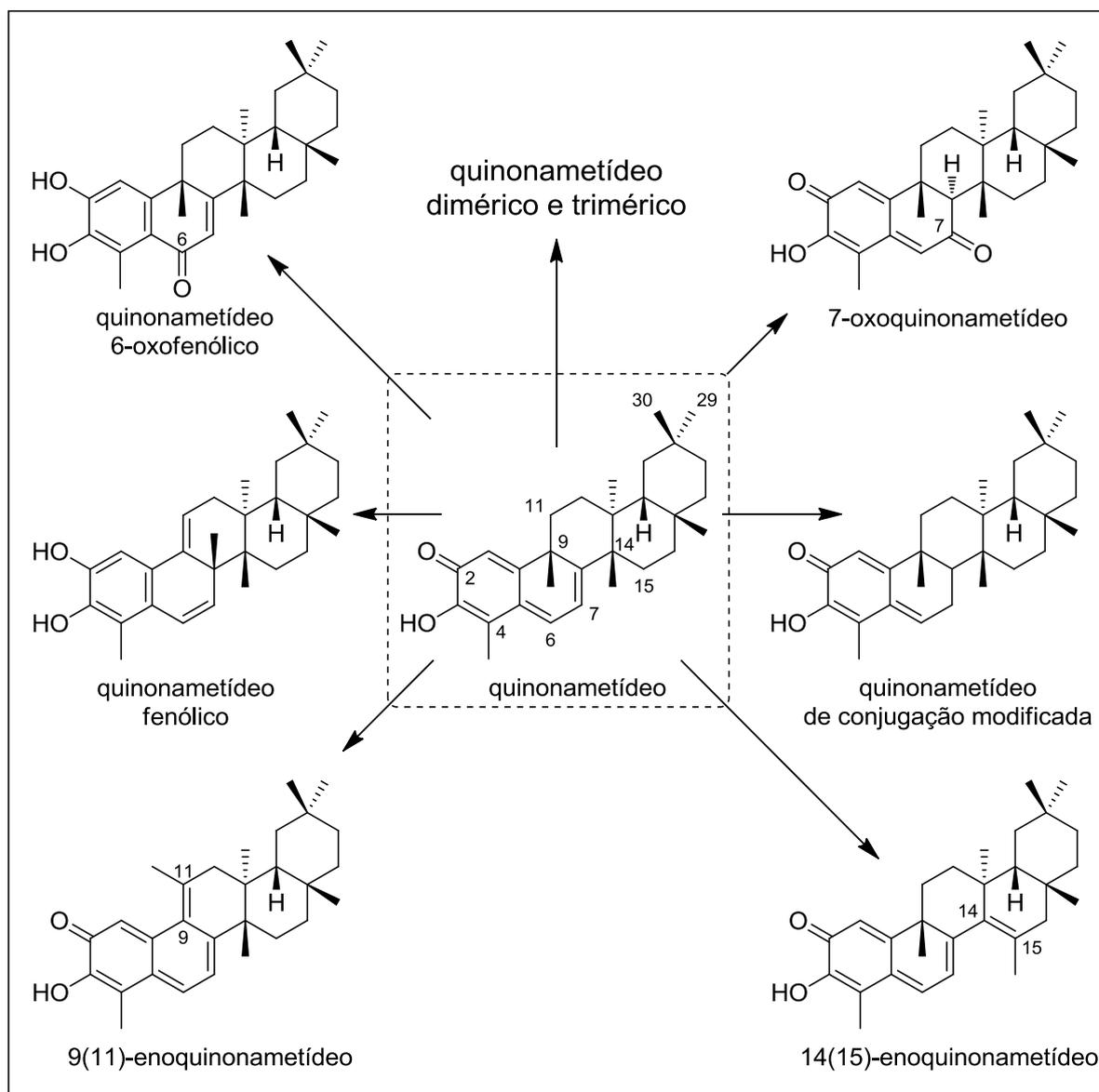


Fonte: Adaptado de Gunatilaka⁸⁰ (1996, p. 4).

Os celastroides, de acordo com suas características estruturais, em específico, nos diferenciados sistemas de conjugação que podem apresentar, assim como oxigenações adicionais no anel B (C-6 e C-7), podem ser diferentemente classificados (Figura 9)^{79,80}. A classe mais comum e amplamente conhecida de celastroides, reportada simplesmente pelo seu homônimo (quinonametídeos), constitui-se de moléculas baseadas no esqueleto triterpênico citado, biossintetizadas a partir da friedelina, cujo cromóforo quinonametídico é estendido pelos anéis A e B. Os triterpenos mais comuns e amplamente conhecidos são o celastrol e a pristimerina, os quais, inclusive, têm sido isolados da espécie alvo deste trabalho, *Maytenus ilicifolia*⁸¹.

A espécie *Maytenus ilicifolia* também tem demonstrado biossintetizar e acumular nas cascas de suas raízes não apenas celastrol e pristimerina, mas também maitenina (ou tingenona), 20 α -hidroximatenina e 22 β -hidroximatenina⁸¹ (Figura 10). Além desses, também tem sido reportado nas mesmas partes da planta o netzahualcoieno⁴⁶, triterpeno 14(15)-enoquinonametídeo (Figura 10).

Figura 9 - Principais classes (tipos) de triterpenos quinonametídeos.

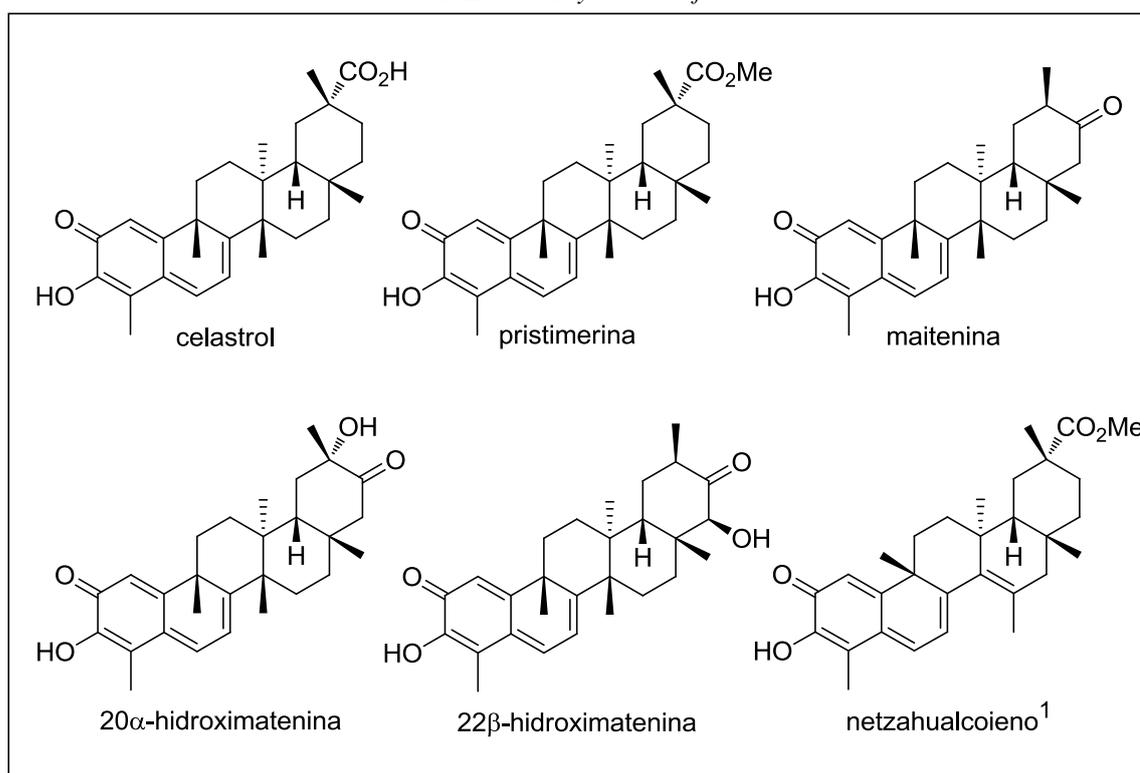


Fonte: Elaborada pelo autor.

Atualmente, existe um grande interesse pelos TQs devido a sua variada gama de atividades biológicas, as quais incluem: anti-inflamatória⁸², antioxidante⁸³, contraceptiva⁸⁴, antifúngica⁸⁵, anti-tripanicida⁸⁶, antimicrobiana⁸⁷, bacteriostática, fungistática⁸⁸ e, principalmente, antitumoral.^{29,89-94} Os cinco TQs reportados em *M. ilicifolia* possuem atividades citotóxicas expressivas frente à uma infinidade de células tumorais, entre elas: 1A9⁹⁵, SK-OV3⁹⁶ (ambas de ovário), SNO (esôfago)⁹⁷, T47D⁹⁸, COL-2⁹⁹, HCT-8⁹⁵ (todas de cólon), U373 (glioblastoma)⁹⁹, W256¹⁰⁰, ZR-7 5-1⁹⁹, MDA-MB-231^{87,98}, MCF-7^{95,101}, BC-1⁹⁹ (todas de mama), KB (boca)^{95,99}, KB-v1 (+vLB) (boca resistente a vimblastina), KB-VIN (boca resistente à vincristina)⁹⁹, PC-3⁹⁵, LNCaP⁹⁹ (ambas de próstata), HL60¹⁰¹, (leucemia), HeLa (colo do

útero)⁹⁷, P-388 (leucemia murina)⁹⁹, NCI-H460¹⁰², LU-1⁹⁹, A549⁹⁵ (ambas de pulmão), RPMI8226 (mieloma)¹⁰³, A431 (carcinoma epidermóide), HT-1080 (fibrosarcoma) e MEL-2 (pele)⁹⁹. O triterpeno enoquinonametídeo netzahualcoieno apresenta atividades antiproliferativas frente às células tumorais A2780 (ovário), HBL-100, T-47D (ambas de mama), HeLa (colo do útero), SW1573 (pulmão), WiDr (colón).¹⁰⁴

Figura 10 - Triterpenos quinonametídeos quinonametídeos e 14(15)-eno quinonametídeo isolados de cascas de raízes de *Maytenus ilicifolia*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

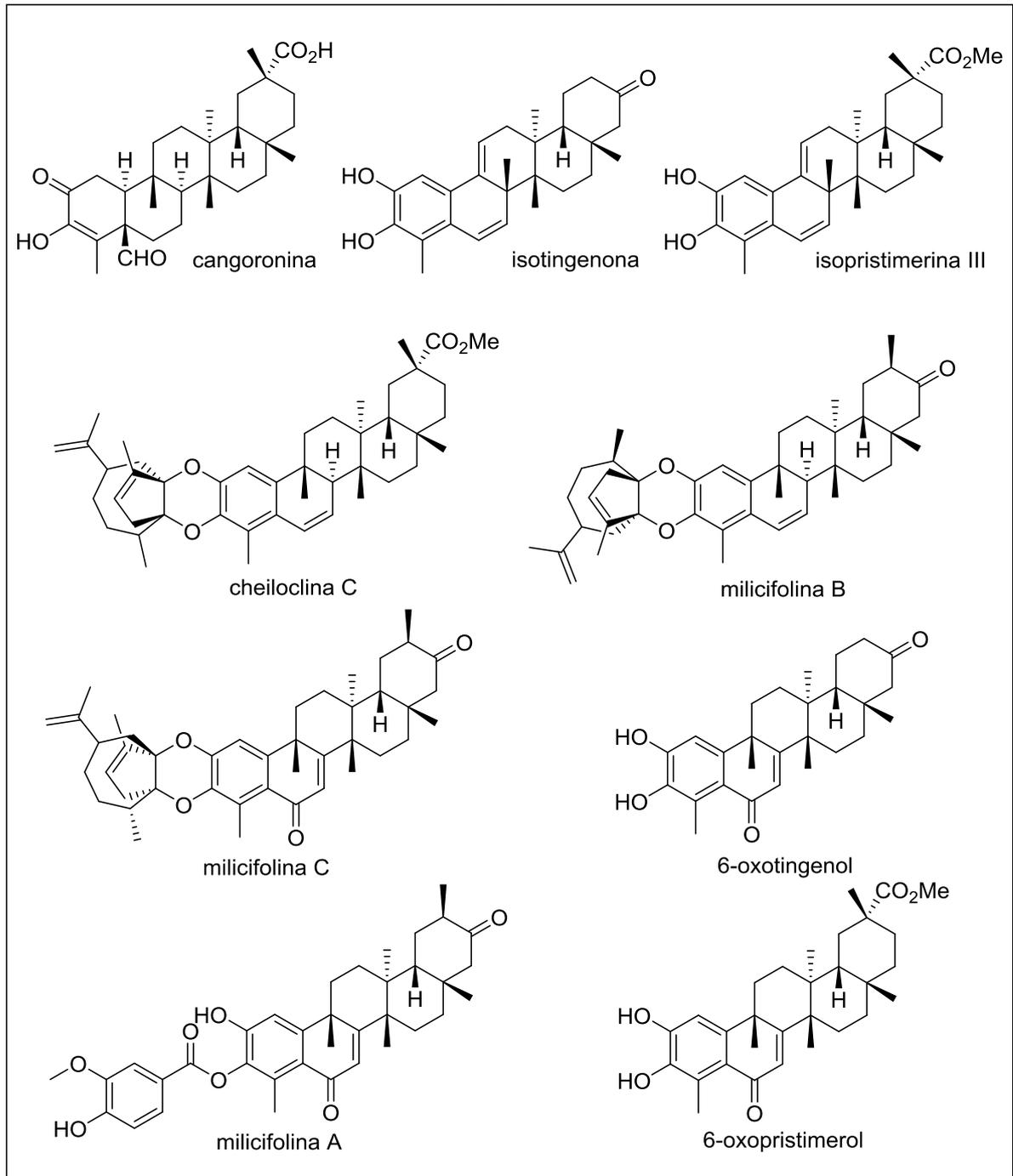
¹Triterpeno 14(15)-eno quinonametídeo.

Além dos TQs citados, outros têm sido isolados de cascas de raízes de *M. ilicifolia*, tais como a cangoronina, celastroide que não apresenta sistema conjugado de insaturações estendidas entre ciclos, os TQs fenólicos isotingenona, isopristimerina III⁷⁸, milicifolina B e cheiloclina C⁴⁶ e os TQs 6-oxofenólicos milicifolina A, milicifolina C, 6-oxotingenol¹⁰⁵ e 6-oxopristimerol⁴⁶ (Figura 11). Em se tratando de TQs diméricos, em *Maytenus ilicifolia* alguns exemplares têm sido identificados. Em 1990, por exemplo, Itokawa et al.¹⁰⁶ isolaram de cascas de raízes quatro triterpenos diméricos, os quais foram caracterizados estruturalmente e nomeados como cangorisina A, atropcangorosina A, diidroatropcangorosina A e cangorisina B. Em investigação realizada sete anos depois, os mesmos quatro triterpenos foram reisolados e, a partir de técnicas espectrométricas e principalmente espectroscópicas mais atuais e robustas,

especialmente de ressonância magnética nuclear bidimensional, suas estruturas químicas foram revisadas. Finalmente, após evidenciarem equívocos na elucidação das quatro substâncias, os autores retificaram as estruturas dos quatro TQs dímeros e sugeriram a renomeação de dois deles: atropcangorosina A renomeada para isocangorosina A e diidroisocangorosina A e para 6',7'- isocangorosina A¹⁰⁷ (Figura 12). Outros dois exemplares de TQs dímeros foram identificados posteriormente em raízes de *M. ilicifolia*: 7,8-diidroescutidina α B e milicifolina D⁴⁶. Na figura 12 estão representados todos os TQs dímeros encontrados na espécie até momento.

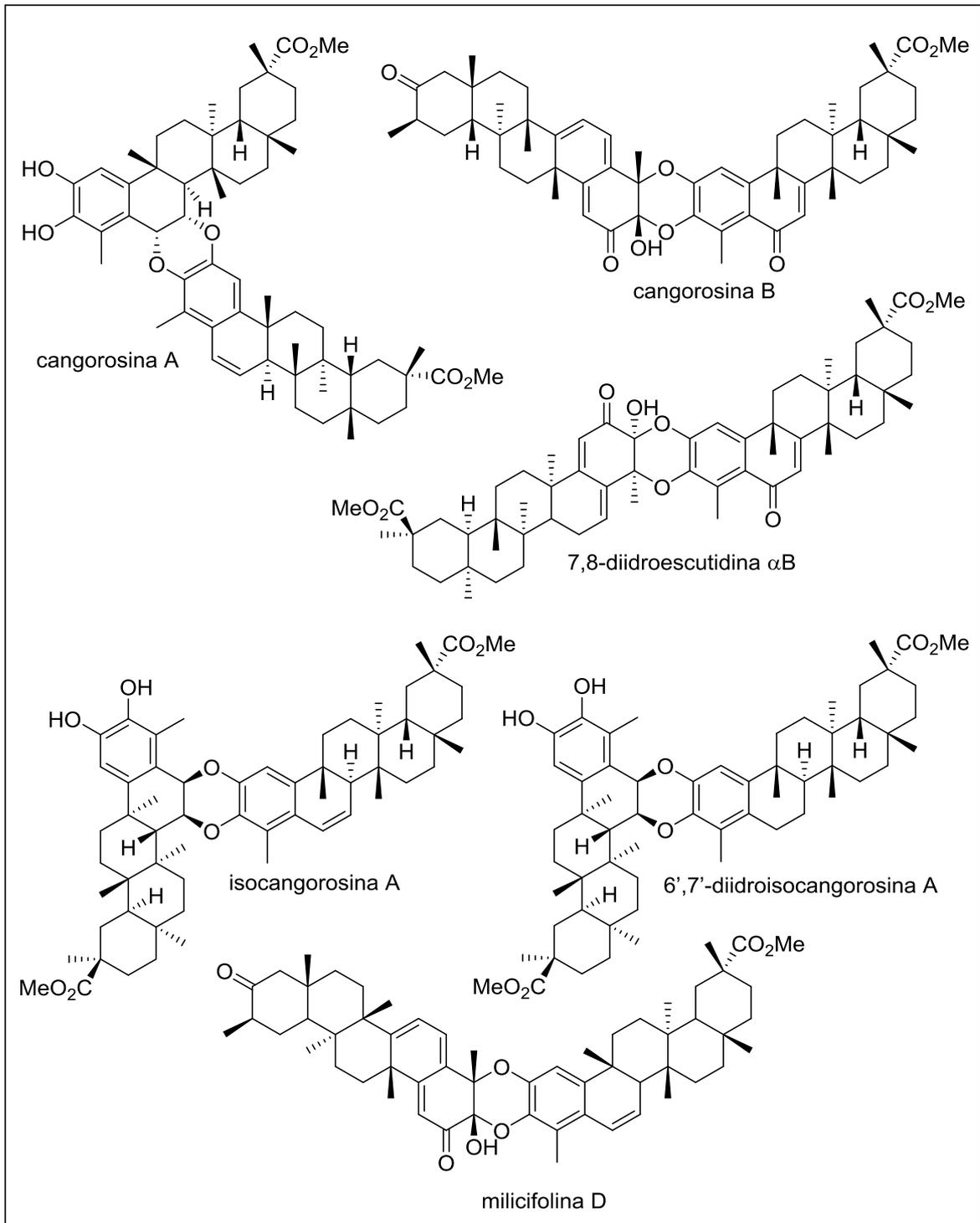
Diante do exposto, a riqueza da diversidade química intrínseca à espécie *M. ilicifolia* se configura evidente. Porém, existe um limitante importante quando se trata da exploração das atividades biológicas dessas biomoléculas, sua obtenção. Este fato justifica-se pela alta complexidade estrutural desses metabólitos, o que torna sua síntese química desafiadora, e por serem compartimentalizadas, em sua maioria, apenas numa porção mínima da planta (cascas das raízes) e ainda em concentrações ínfimas. Neste contexto, ferramentas biotecnológicas como a cultura de tecidos vegetais surgem como uma alternativa para suprir essa demanda.

Figura 11 - Triterpenos quinonametóides fenólicos e 6-oxofenólicos isolados de cascas de raízes de *Maytenus ilicifolia*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 12 - Triterpenos quinonametídeos diméricos isolados de cascas de raízes de *Maytenus ilicifolia*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

1.4 Cultura de tecidos vegetais como fonte metabólitos secundários

Há uma série de vantagens na produção de metabólitos secundários a partir de cultura de tecidos e órgãos. Dentre elas, destaca-se: 1) a produção de metabólitos de interesse pode ser

contínua durante todo o ano, não havendo interferências sazonais; 2) o isolamento do composto de interesse é facilitado, em comparação à extração da planta inteira, pela ausência (ou menor presença) de compostos como clorofila, hidrocarbonetos, entre outros e 3) a produtividade dos metabólitos secundários de interesse pode ser intensificada pelo uso de fitoreguladores e elicitores como o metil jasmonato (MeJA).¹⁰⁸⁻¹¹⁰

São vários os exemplos de sucesso em produção de metabólitos secundários utilizando essas técnicas biotecnológicas¹¹¹⁻¹¹⁵, inclusive em escala industrial¹¹⁶. Estudos realizados pelo nosso grupo têm demonstrado que células de *M. ilicifolia* em suspensão acumulam maitenina e 22 β -hidroximaitenina em concentrações 3 e 100 vezes maiores, respectivamente, que a planta cultivada em seu habitat natural.⁴⁴

1.5 Elicitação em culturas *in vitro* de células vegetais

Elicitação é uma estratégia bem conhecida e amplamente utilizada para aumentar a produção de várias classes de metabólitos secundários em sistemas vegetais¹¹⁷. Um elicitador é um composto de origem natural ou sintética que, quando adicionado à uma cultura, simula condições de estresse nas células vegetais, provocando respostas que ocorreriam no ambiente natural da planta. Isso geralmente resulta em maior acúmulo de metabólitos secundários, pois os elicitores provocam alterações fisiológicas que envolvem a expressão ascendente de genes associados ao metabolismo secundário.^{118,119}

Vários compostos têm sido utilizados como elicitores em culturas vegetais *in vitro*, sendo os mais comuns o ácido jasmônico (AJ), o ácido salicílico (AS) e principalmente o metil jasmonato (MeJA).¹¹⁶

Estudos têm demonstrado que culturas de células em suspensão de 36 espécies vegetais distintas, tratadas com ácido AJ e/ou seu éter metílico MeJA, aumentaram o acúmulo dos mais diversos metabólitos secundários¹²⁰. Culturas de células *Taxus* spp elicitadas com MeJA produziram até 46 vezes mais paclitaxel do que células não elicitadas.¹²¹⁻¹²³

Com relação aos triterpenos, trabalhos realizados demonstraram que eles podem ser produzidos por culturas vegetais *in vitro* em concentrações muito maiores quando estas são elicitadas com MeJA. Por exemplo, Norrizah et al.¹²⁴ demonstraram que células em suspensão da espécie *Hedyotis corymbosa* acumularam os ácidos ursólico e oleanólico em concentrações muito superiores quando adicionado no meio de cultura 200 e 100 μ M de MeJA, respectivamente. Células em suspensão de *Centella asiatica*, quando tratadas com 0,2 mM de MeJA e mantidas por quatro dias nestas condições, produziram os triterpenos madecassosídeo,

asiaticosideo, ácido madecássico e ácido asiático em concentrações 24,8, 38,6, 17,0 e 23,7 vezes superiores, respectivamente, quando comparadas à células não tratadas.¹⁰⁰

Nosso grupo também tem investigado o efeito do MeJA no acúmulo de triterpenos em culturas de células em suspensão. Um exemplo que deve ser destacado é o caso de células de *M. ilicifolia* em suspensão elicitadas com MeJA, as quais acumularam os TQs maitenina e 22 β -hidroximaitenina em concentrações muito superiores que células não elicitadas (dados não publicados).

Além da produção em maior escala de substâncias de interesse, a elicitação também pode ser utilizada para compreender a regulação de processos metabólicos secundários através de estudos de expressão proteica diferencial.¹²⁵

1.6 Jasmonatos: biossíntese, percepção, sinalização e resposta do metabolismo secundário vegetal

Metil jasmonato (MeJA), ácido jasmônico (AJ) e seus derivados, conhecidos como jasmonatos (JAs), são fito-hormônios oriundos da via do octadecanóide (Figura 13). Os JAs regulam uma grande variedade de processos fisiológicos vegetais que vão desde o crescimento até a reprodução e defesa vegetal. Por estarem presentes no perfume das flores de jasmim (*Jasminum* spp.), essas oxilipinas chegaram a ser classificadas apenas como produtos do metabolismo secundário, mas, atualmente, é amplamente conhecido que as mesmas atuam como indutores na produção de metabólitos secundários em todo reino vegetal, tanto em angiospermas quanto em gimnospermas, sendo assim considerados também como uma classe hormonal.^{119,126-128}

Estudos apontam que os JAs podem induzir a síntese de todas as principais classes de metabólitos secundários (terpenos, alcaloides, fenilpropanoides, entre outros) e, além disso, podem atuar na modulação de vias metabólicas primárias para fornecer precursores de metabólitos secundários relacionados com os substratos necessários.^{119,127,129}

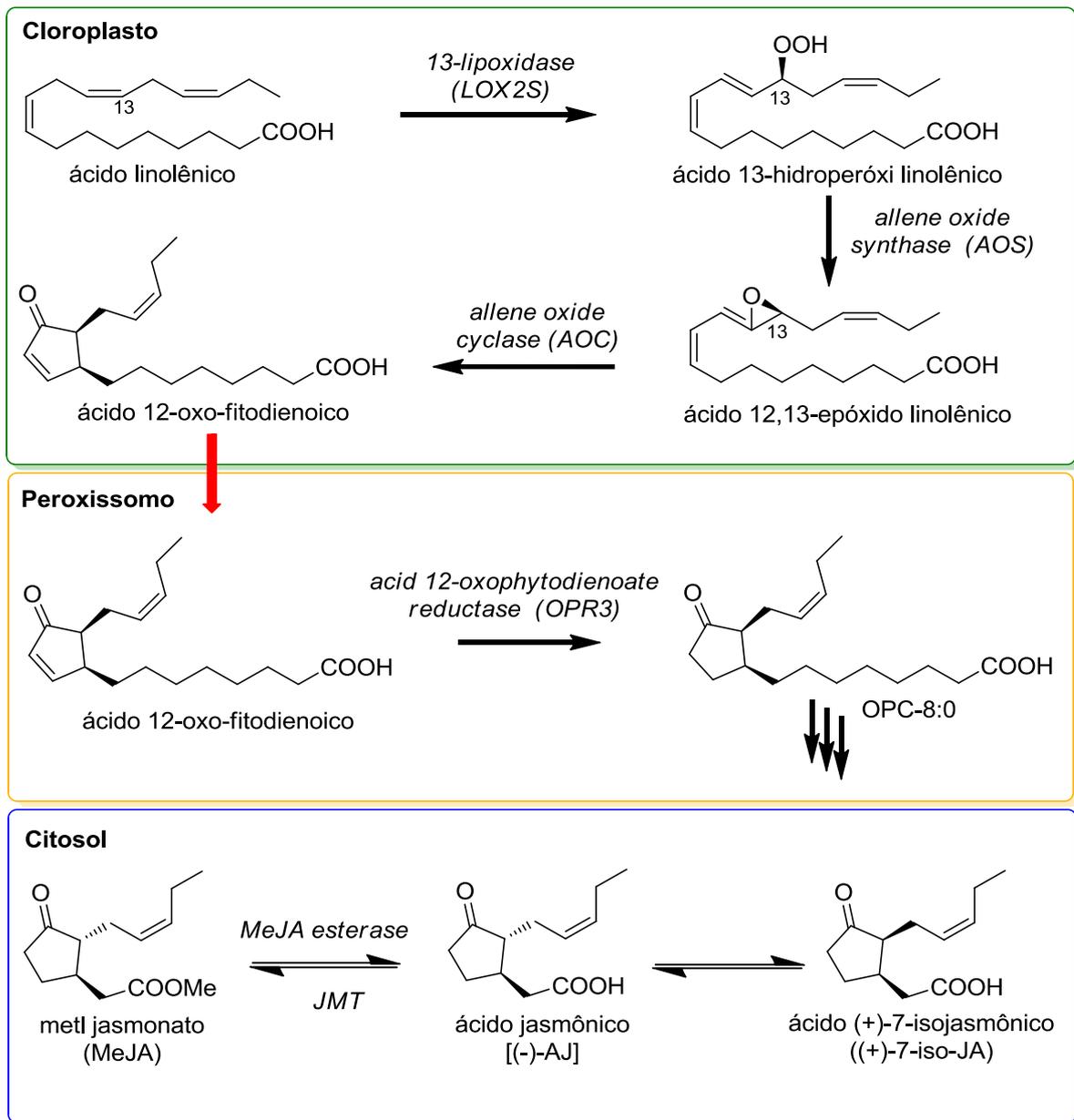
Análises de perfil de transcrição demonstram que os JAs desencadeiam uma extensa reprogramação transcricional do metabolismo. A expressão de genes que codificam enzimas de uma via metabólica secundária específica, muitas vezes, exibe uma regulação ascendente (*upregulation*) peculiar após a elicitação com JAs, levando ao reconhecimento dos chamados *transcriptional regulons*. Este fato incentivou pesquisadores do mundo todo a iniciarem projetos para identificar os chamados genes interruptores mestres (*master switches*) do metabolismo secundário, ou seja, proteínas capazes de ativar a expressão de todos (ou a

maioria) dos genes que codificam as enzimas envolvidas numa via metabólica específica^{127,130}. Esse conhecimento poderia ser convertido no desenvolvimento de ferramentas poderosas “mais genéricas” na área de engenharia metabólica de plantas. A identificação de fatores transcricionais (TFs) tais como *octadecanoid-derivative responsive Catharanthus AP2-domain 2 e 3 (ORCA2 e ORCA3)*, que dirigem a biossíntese de alcaloides indólicos terpênicos em *Catharanthus roseus*, *production of anthocyanin pigment 1 (AtPAP1)* em *Arabidopsis thaliana*, *C1/R* em *Zea mays* (milho), que dirigem a biossíntese de antocianinas, entre outros, aumentaram muito essas expectativas¹³⁰⁻¹³³.

1.6.1 Biossíntese

Os JAs são sintetizados pelas plantas a partir do ácido linolênico (Figura 13) o qual é liberado dos lipídeos da membrana plasmática. Duas organelas participam da biossíntese: o cloroplasto e o peroxissomo. No cloroplasto, o ácido linolênico é oxigenado pela *linoleate 13S-lipoxygenase* sendo convertido em ácido 13-hidroperóxi linolênico o qual, pela ação da enzima *allene oxide synthase (AOS)*, converte-se no epóxido ácido 12, 13-epóxido linolênico que em seguida é ciclizado pela *allene oxide cyclase (AOC)* no ácido 12-oxo-fitodienoico. Após ser transportado para o peroxissomo, o ácido 12-oxo-fitodienoico é reduzido pela enzima *acid 12-oxophytodienoate reductase (OPR3)* a um intermediário (OPC-8:0) que sofre três etapas consecutivas de β -oxidação para formar o ácido (+)-7-isojasmônico [(+)-7-iso-JA]. Esse, por sua vez, é translocado para o citosol e convertido em AJ através de uma reação reversível. Por fim, o MeJA, seu homólogo volátil, é formado pela ação da *jasmonic acid carboxyl methyltransferase (JMT)* e, como na etapa anterior, a partir de uma reação reversível (reação de equilíbrio), AJ pode ser formado a partir da desesterificação do MeJA catalisada pela *methyl jasmonate esterase (MeJA-esterase)*.^{126,134-140}

Figura 13 - Rota biossintética dos jasmonatos a partir do ácido linolênico.



Fonte: Elaborada pelo autor.

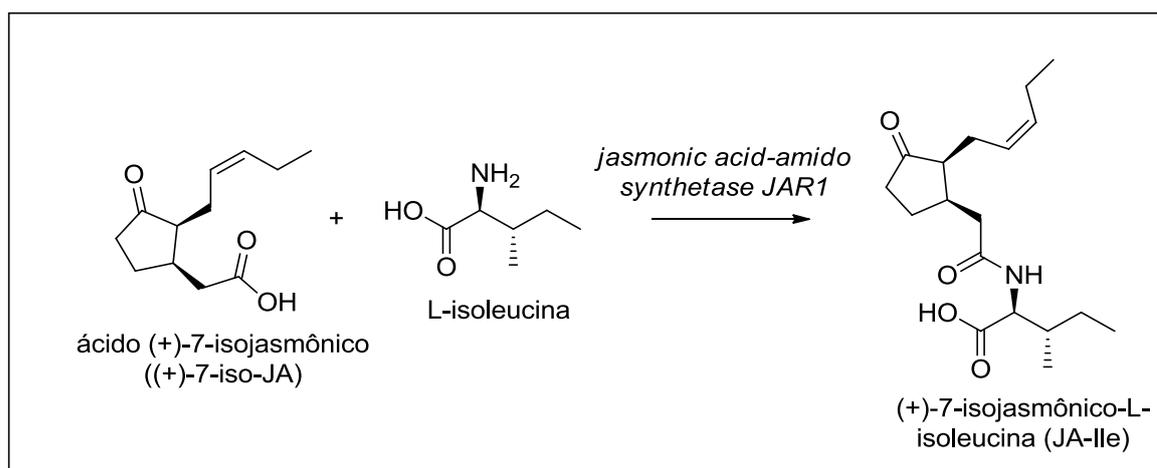
1.6.2 Percepção e sinalização

Nos últimos vinte anos, uma imensa gama de informações foi adquirida sobre proteínas e enzimas envolvidas nas vias de percepção e sinalização reguladas por JAs em plantas. Neste contexto, a via ubiquitina-proteassoma foi reconhecida como o sistema central da regulação de sinalização dos JAs em 1998, quando *coronatine-insensitive 1 (COI1)* foi identificado como uma proteína do tipo F-box. *COI1* forma um complexo *Skp1/Cullin/F-box (SCF^{COI1})*, um tipo de proteína *E3 ubiquitin ligase*, cujos alvos deste são as proteínas repressoras da família JAZ

(*Jasmonate zim domain*). As JAZs são conhecidas por serem reguladoras negativas de expressão de genes induzidos por JAs.¹⁴¹⁻¹⁴⁴

As JAZs possuem um motivo proteico Tify (*Tify motif*) altamente conservado dentro de um domínio chamado ZIM, o qual media interações homo- e heterodiméricas entre diferentes proteínas JAZ^{143,145,146}. O domínio ZIM também permite que essas proteínas aliem-se à co-repressores de transcrição como o *TOPLESS (TPL)* por meio de uma “proteína adaptadora” chamada *NINJA (Novel INteractor of JAZ)*. Assim, ambas as proteínas *NINJA* e *TPL* agem como reguladores negativos funcionais de resposta a JAs¹⁴⁷. As proteínas JAZ ainda são caracterizadas por um importante domínio C-terminal conservado (denominado “jas”) que é responsável pela ligação com COI1, mas também com uma gama de TFs¹²⁷, as quais acabam sendo funcionalmente desativados.¹⁴⁸

Figura 14 - Reação da formação do bioativo (+)-7-isojasmônico-L-isoleucina

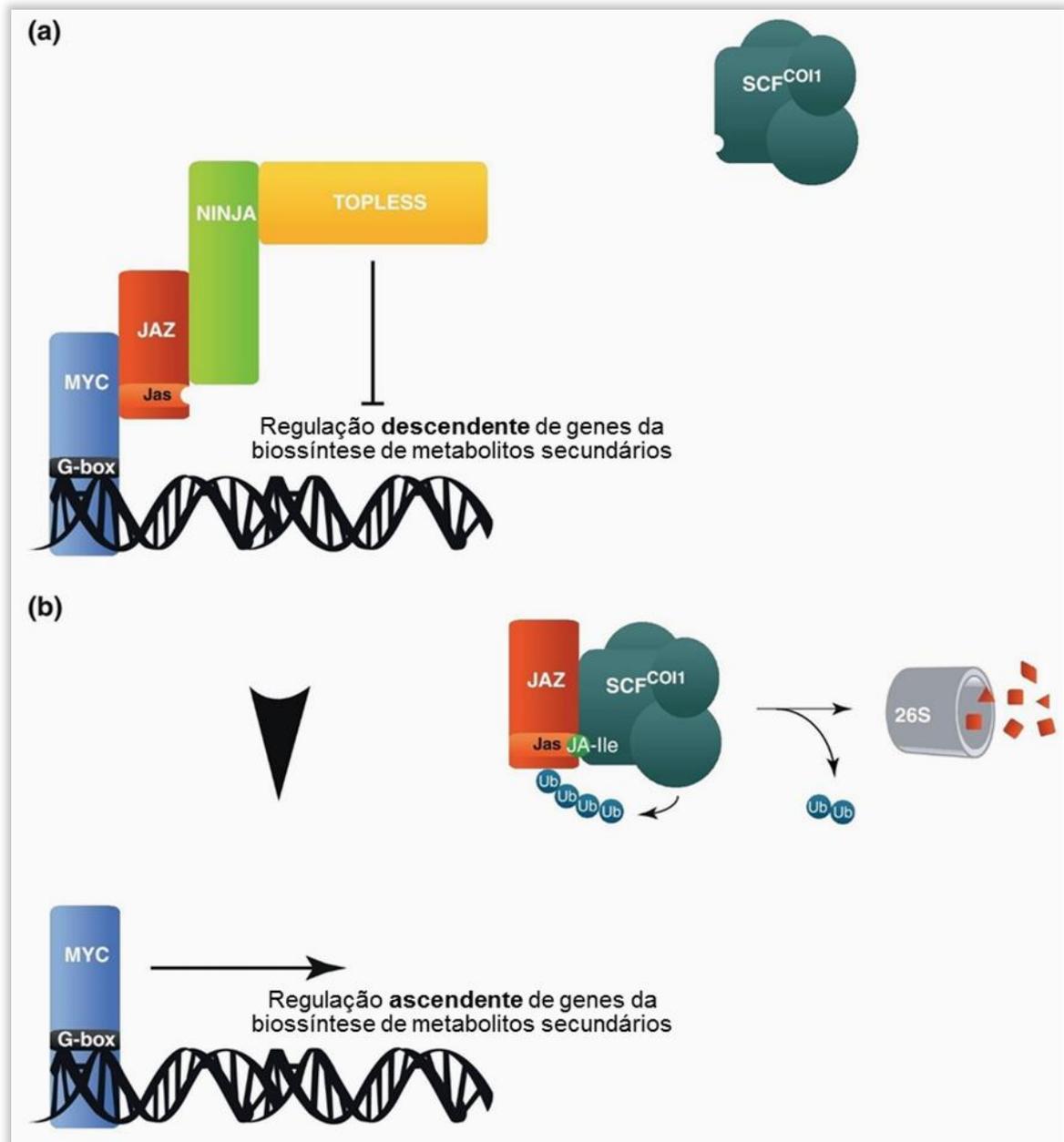


Fonte: Elaborada pelo autor.

Em um estado elicitado por JAs, ou seja, com níveis elevados desses compostos disponíveis para a planta, os mecanismos de percepção e sinalização regulados pelos hormônios iniciam-se pela formação de um conjugado bioativo pela reação de (+)-7-iso-JA e L-isoleucina (JA-Ile) catalisada pela *jasmonic acid-amido synthetase JAR1 (JAR1)*¹⁴⁹ (Figura 14). O complexo proteico SCF^{COI1}, após ligar-se à JA-Ile, conjuga-se com uma proteína JAZ, por meio do domínio jas, para formar um complexo co-receptor. A ligação do complexo SCF^{COI1}/JA-Ile à proteína JAZ leva à poliubiquitinação e à subsequente degradação de JAZ pelo proteossomo 26S. A degradação proteossomal de JAZ, além de neutralizar a ação das proteínas repressoras de genes induzidos por JAs, como supracitado, permite a liberação de TFs tais como os das

famílias *MYC* e *MYB*, os quais ligam-se a promotores de genes de resposta a JAs (Figura 15).^{150,151}

Figura 15 - Módulos de percepção e sinalização de jasmonato (JAs) na regulação do metabolismo secundário em plantas.



Fonte: Adaptado de DE GEYTER¹³⁰ (2012, p. 351).

(a) Na ausência de jasmonato-isoleucina (JA-Ile), proteínas com domínios AJ ZIM (JAZ) interagem com complexos co-repressores tais como *NINJA* e *TOPLESS* os quais podem se ligar fatores transcritoriais (TFs), como *MYC*, e inibirem sua ação. (b) Com altos níveis de JA o complexo Skp1/Cullin/F-box (*SCF*^{CO11}), após ligar-se a JA-Ile, conjuga-se com as proteínas JAZ levando-as à poliubiquitinação e subsequente degradação no proteossomo 26S. Finalmente ocorre a liberação de TFs que modulam a expressão de genes envolvidos na biossíntese de metabolitos secundários.

O fator de transcrição alvo mais conhecido das JAZ em *Arabidopsis* é *MYC2*, envolvido tanto direta quanto indiretamente na regulação de metabólitos secundários. *MYC2* regula positivamente outros TFs e enzimas envolvidas na biossíntese de flavonoides e, por outro lado, controla negativamente a síntese de alcaloides indólicos derivados do triptofano na mesma planta¹⁵². Em *Catharanthus roseus*, um TF homólogo ao *MYC2* regula a expressão de outros TFs que atuam diretamente na ativação/desativação do gene interruptor (*on/off switch*) do gene *ORCA3*, que controla a rota dos alcaloides indólicos terpênicos¹⁵³. Outros TFs alvo das JAZ, relacionados a regulação ascendente de metabólitos secundários, foram encontradas em outras espécies vegetais¹⁵⁴⁻¹⁵⁷. Essas informações indicam que o complexo co-receptor COI1-JAZ exerce o papel principal na reprogramação do metabolismo secundário mediada por JAs em várias espécies vegetais¹³⁰.

Apesar de ser elevado nível de compreensão sobre os mecanismos moleculares mediados pelos JAs, ele restringe-se, quase que exclusivamente, a plantas modelo. Muitas lacunas referentes aos mesmos (ou análogos) mecanismos moleculares relacionados à biossíntese de inúmeros metabólitos de interesse, em plantas não modelo, ainda precisam ser desvendados. Neste contexto, abordagens utilizando técnicas “ômicas”, como a proteômica, surgem como uma alternativa no esclarecimento de muitos desses processos bioquímicos.

1.7 Proteoma

O termo “proteoma” foi cunhado pela primeira vez em 1994 a partir da adaptação (e analogia) de outro termo já bastante difundido na época, o “genoma”. Proteoma foi definido originalmente como o conjunto de todas as proteínas expressas por um genoma, célula, tecido ou organismo. Atualmente, deve ser entendido como o conjunto total de espécies proteicas ou produtos de genes em uma unidade biológica (ecossistema, população, organismo, órgão, tecido, célula, ou organela), em um estágio de desenvolvimento específico sob determinadas condições externas (bióticas ou abióticas).¹⁵⁸⁻¹⁶⁰

Em se tratando de plantas, muitas espécies apresentam mais genes do que o genoma humano e, por isso, podem ser consideradas como um dos organismos com proteoma mais complexo. Não obstante, o número de genes de um organismo não pode ser facilmente correlacionado com o número total de proteínas, tendo em vista que a expressão gênica pode ser regulada durante a transcrição, *splicing*, tradução e após modificações pós-traducionais de proteínas. Além disso, vários fatores físicos, tais como: o tipo de tecido, estágio de desenvolvimento, estímulo ambiental e estresse também afetam a expressão gênica e,

consequentemente, modificam seu proteoma. Todos esses fatores contribuem para que a investigação completa de um proteoma seja muito mais complexa e desafiadora que o sequenciamento de um genoma.^{161,162}

1.8 Proteômica

O ramo da ciência responsável pelo estudo do proteoma é a “proteômica” que surgiu já em 1995 com a publicação de um estudo de proteínas em larga-escala da espécie *Arabidopsis thaliana*¹⁶³. Entretanto, o termo “proteômica” foi utilizado pela primeira vez em 1997 em analogia ao termo “genômica”, estudo do genoma.¹⁶⁴

Nas últimas décadas, o desenvolvimento tecnológico das técnicas de separação de proteínas/peptídeos, tais como a espectrometria de massas (EM), marcação isotópica para quantificação de proteínas e bioinformática para análises de dados, tem contribuído substancialmente para evolução dos estudos proteômicos contemporâneos. Dentre essas, a EM exerce papel de grande destaque na evolução das análises de proteínas em larga escala, devido ao acelerado avanço da espectrometria de massas, principalmente em se tratando de resolução, precisão e velocidade de varredura.¹⁶¹

De modo geral, os estudos proteômicos seguem duas abordagens distintas: a proteômica *bottom-up* e a proteômica *top-down*. Na abordagem *bottom-up* as proteínas são caracterizadas a partir da análise de peptídeos, derivados da mesma, através de proteólise. Quando uma análise *bottom-up* é realizada em uma mistura de proteínas, esta é chamada de proteômica *shotgun*^{165,166}.

Em um experimento de *shotgun* típico, uma mistura de peptídeos é fracionada e submetida a uma análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM). Os espectros de massas, resultantes das fragmentações peptídicas, são então comparados com espectros de massas teóricos de peptídeos, os quais são gerados a partir de digestão *in silico* de proteínas depositadas em bases de dados. Por fim, infere-se a identidade da(s) proteína(s), depositada(s) nas bases de dados, pela atribuição da(s) sequência(s) de peptídeo(s) identificada(s)¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Em contrapartida, a abordagem *top-down* é empregada na caracterização das proteínas intactas. Está estratégia possui vantagens em relação a proteômica *bottom-up*, em especial quando trata-se de análises de espécies proteicas criadas após modificações pós-traducionais e determinação de isoformas de proteínas. Utilizando essa técnica, proteínas intactas de até 200 KDa têm sido analisadas com sucesso¹⁷⁰, além da

identificação de mais de 1000 proteínas a partir de amostras complexas utilizando separações multidimensionais.¹⁷¹

No entanto, quando comparado ao *shotgun*, o método *top-down* apresenta limitações significativas, tais como: proteínas são difíceis de manusear e degradam-se com facilidade; tanto a solubilização quanto o fracionamento (separação) de proteínas podem ser desafiantes; e, a ionização e fragmentação em fase gasosa não é facilmente controlada. Em contrapartida, como peptídeos podem ser mais facilmente solubilizados, fracionados, ionizados e fragmentados, a proteômica *shotgun* pode ser universalmente adaptada para análises de proteínas. Nos últimos anos, incontáveis avanços no campo da biologia de sistemas têm sido alcançados com a aplicação da proteômica *shotgun* nos mais variados experimentos, incluindo: perfil proteômico; quantificação de proteínas; estudo de proteínas formadas após modificações pós-traducionais; interações proteína-proteína; entre outros¹⁷²⁻¹⁷⁸

1.8.1 Digestão proteolítica para análises de *shotgun*

Muitos desafios associados a caracterização de proteínas intactas por EM, tais como separação e ionização, podem ser contornados analisando-se seus peptídeos proteolíticos. Em geral, um lisado proteico é constituído de uma mistura altamente heterogênea de proteínas que apresentam diferenciadas propriedades físico-químicas e, no primeiro momento, pensar em aumentar essa complexidade antes da análise, pode parecer um contrassenso. Entretanto, em uma digestão proteolítica seletiva/controlada a peptídeos, ocorre a normalização e compartimentalização da heterogeneidade bioquímica das proteínas de uma amostra, facilitando a análise. Adicionalmente, múltiplas representações de uma proteína em particular, na forma de peptídeos, aumentam sua probabilidade de identificação quando presente em baixa concentração na amostra e/ou quando é produto de modificações pós-traducionais.¹⁶¹

Com relação as enzimas proteolíticas (proteases), estas diferem-se por sua especificidade ao clivarem as ligações peptídicas entre os resíduos individuais de uma proteína. A clivagem ocorre por hidrólise de uma ligação peptídica antes ou após um resíduo específico, resíduos, ou combinação de resíduos. Em análises de *shotgun*, a enzima de digestão de proteínas mais utilizada é a *trypsin*, uma serino protease que cliva as ligações na extremidade C-terminal dos resíduos da arginina (R) e da lisina (K), desde que o resíduo seguinte não seja a prolina (P), gerando peptídeos com massas moleculares e cargas adequadas para análise por CL-EM/EM.¹⁷⁹⁻¹⁸¹

1.8.2 Métodos de separação e fracionamento em proteômica

Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é um método altamente eficiente para separação de proteínas de misturas complexas e é o mais utilizado em análises proteômicas baseadas em gel. Nesse método, as separações das proteínas podem ser conduzidas no gel em uma única direção (1D), com base nas massas moleculares das espécies proteicas, ou em duas dimensões (2D), com base nas massas moleculares em uma dimensão e nos pontos isoeletricos (focalização isoeletrica) das proteínas em outra. Em uma análise típica, após serem separadas por SDS-PAGE, as proteínas são analisadas diretamente por MALDI-EM, no caso de uma abordagem *top-down*, ou analisadas por CL-EM, após uma digestão *in-gel*, na forma de peptídeos (*bottom-up*).^{162,182}

Eletroforese 2D-SDS-PAGE é a abordagem mais difundida em proteômica de plantas, uma vez que permite a separação e posterior identificação de milhares de proteínas em um único gel¹⁸³. Entretanto, géis 2D possuem várias limitações em termos de resolução de separação de proteomas complexos, número de *spots* e recuperação de proteínas. Não obstante, a utilização de géis 2D no dia-a-dia de um laboratório de pesquisa exige um trabalho técnico altamente intensivo, além de um tempo consideravelmente demorado. Contudo, as técnicas eletroforéticas atuais de separação de proteínas ainda são deficitárias e melhorias tecnológicas/metodológicas nessa área são indispensáveis.^{162,184}

Muitas das limitações da proteômica baseada em gel podem ser superadas com a proteômica livre de gel. O desenvolvimento recente de metodologias livres de gel tem proporcionado um grande avanço na investigação de proteomas. Essas metodologias baseiam-se na MudPIT (tecnologia multidimensional para identificação de proteínas) e, apesar existirem atualmente abordagens não baseadas em EM, tais como microarranjo de proteínas, que possibilitam detectar proteínas de misturas complexas com concentrações extremamente baixas¹⁸⁵, métodos baseados em EM são considerados atualmente como padrão ouro e são amplamente utilizados pelos pesquisadores.¹⁵⁸

De modo geral, nas análises proteômicas livres de gel, misturas complexas de proteínas são digeridas em solução e os peptídeos resultantes são fracionados a partir de cromatografia de troca catiônica forte (SCX), seguida de cromatografia em fase reversa (FR) acoplada a EM sequencial (EMⁿ)¹⁸⁶. Inicialmente, esses estudos de *shotgun* eram realizados com sistemas cromatográficos que operavam em vasos extremamente baixas (nano vaso), acoplados a espectrômetros de massas do tipo triplo quadrupolo ou IT. No entanto, os aparatos em questão,

apresentavam limitações significativas, especialmente quando tratava-se de sensibilidade, resolução e velocidade na caracterização e quantificação de proteomas.^{187,188}

O desenvolvimento de uma nova geração de espectrômetros de massas, principalmente o Orbitrap¹⁸⁹, tem permitido um avanço sem precedentes no campo da proteômica, possibilitando a caracterização completa de peptídeos presentes em amostras com sensibilidade de partes por milhão (ppm).¹⁹⁰

1.8.3 Espectrometria de massas aplicada em proteômica *shotgun/bottom-up*

Uma das principais razões que têm impulsionado a utilização da abordagem *shotgun* em proteômica é a compatibilidade de acoplamento de métodos cromatográficos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) aos espectrômetros de massas, os quais realizam a separação de peptídeos antes da EM. Entre as modalidades de CLAE, destacam-se: a extração em fase sólida (EFS); a cromatografia de troca catiônica forte e a cromatografia líquida em fase reversa.¹⁶¹

Nos últimos anos, os crescentes projetos dedicados à investigação de proteomas por EM têm impulsionado significativamente o desenvolvimento de novos métodos experimentais, bem como instrumentação. Um dos desenvolvimentos instrumentais mais importantes foi a introdução dos métodos de ionização por *electrospray* (ESI, *electrospray ionization*) e dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz (MALDI, *matrix-assisted laser desorption/ionization*), ambos métodos suaves que possibilitam a vaporização e subsequente ionização dos peptídeos sem extensiva degradação estrutural. ESI aplicada à análise de peptídeos produz preferencialmente espécies duplamente carregadas, enquanto MALDI gera quase que exclusivamente íons monocarregados.¹⁹⁰

Ainda em se tratando de instrumentação, os analisadores de massas mais comuns aplicados em análise de proteínas/peptídeos, a partir de misturas complexas, são os do tipo quadrupolo, armadilha de íons (IT) (tridimensionais e lineares), tempo de voo (TOF), ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (FT-ICR), Orbitrap, entre outros. Cada analisador possui suas vantagens, ou desvantagens, de acordo com o tipo de experimento e o resultado esperado.^{161,191}

Atualmente, equipamentos que combinam diferentes analisadores de massas e fontes de ionização/fragmentação têm sido desenvolvidos. Comparados aos instrumentos tradicionais, os equipamentos híbridos têm possibilitado a realização de análises de peptídeos com altíssimo grau de resolução e rapidez. Este fato tem contribuído para uma melhora substancial na acurácia

das medições de íons peptídicos precursores bem como seus fragmentos (EM/EM), disponibilizando profundas informações sobre fragmentação peptídica a partir de diferentes métodos de fragmentação. Neste contexto, esses instrumentos estão na vanguarda dos estudos proteômicos.^{158,161,192}

Um exemplo de equipamento híbrido é o LCMS-IT-TOF [cromatografia líquida/espectrometria de massas/armadilha de íons/tempo de voo (*liquid chromatograph/mass spectrometry/ion trap/time-of-flight*)] um tipo de espectrômetro de massas constituído de um CLAE acoplado aos analisadores de massas IT e TOF combinados. Analisadores do tipo IT comuns destacam-se por serem altamente eficientes em realizar experimentos de EM em sequenciais, mas com baixa acurácia e resolução. Por outro lado, os do tipo TOF possuem alta capacidade tanto de resolução quanto de acurácia nas medições, mas com capacidades limitadas na execução de experimentos EM/EM. Neste contexto, o LCMS-IT-TOF permite analisar com altíssimo grau de precisão e resolução íons peptídicos precursores bem como seus fragmentos, pois, considera simultaneamente, as características positivas dos dois analisadores combinados.¹⁹³⁻¹⁹⁵

1.8.4 Identificação de proteínas em bancos de dados

Concomitantemente com o aumento da eficiência dos equipamentos, a evolução de ferramentas de bioinformática, principalmente algoritmos de busca, tais como: Mascot, Sequest, X! Tandem, OMSSA, entre outros, tem permitido o mapeamento quase que completo dos mais variados proteomas, incluindo proteomas vegetais, tanto de plantas modelo como de plantas não modelo.¹⁹⁶⁻¹⁹⁸

Na abordagem *shotgun*, as análises por LC- EM geram os espectros de massas referentes a massa molecular (MM) dos peptídeos intactos (oriundos da digestão enzimática). Para esse resultado dá-se o nome de impressão digital de massas peptídicas (PMF, *peptide mass fingerprint*). Após a obtenção do PMF, os peptídeos detectados (íons precursores) são então isolados e submetidos à fragmentação (ou múltiplas fragmentações) para obtenção dos espectros EM/EM (ou EMⁿ). Os algoritmos de busca processam esses espectros experimentais (não interpretados) e compara-os com espectros teóricos (calculados *in silico* pelos próprios softwares) de sequências de aminoácidos de proteínas depositadas em bases de dados. De modo geral, os algoritmos têm como objetivo encontrar a sequência de aminoácidos, em um determinado banco de dados, que melhor descreve os íons fragmentos encontrados em um espectro.^{165,191}

Muitas vezes, a identificação *en masse* de proteínas é co-dependente da identificação de centenas de milhares de peptídeos a partir do processamento de mais de um milhão de espectros EM/EM pelos softwares.¹⁷⁸

Além das bases de proteínas, os referidos softwares possibilitam fazer o mesmo tipo de correlação com bases de dados de sequências de nucleotídeos. Para isso, a partir do código genérico universal, os softwares simulam sequências primárias de aminoácidos de uma proteína correspondentes às sequências de nucleotídeos encontrados nas bases gênicas. Posteriormente, a digestão enzimática e os espectros das fragmentações das sequências peptídicas das proteínas são simulados.¹⁹¹

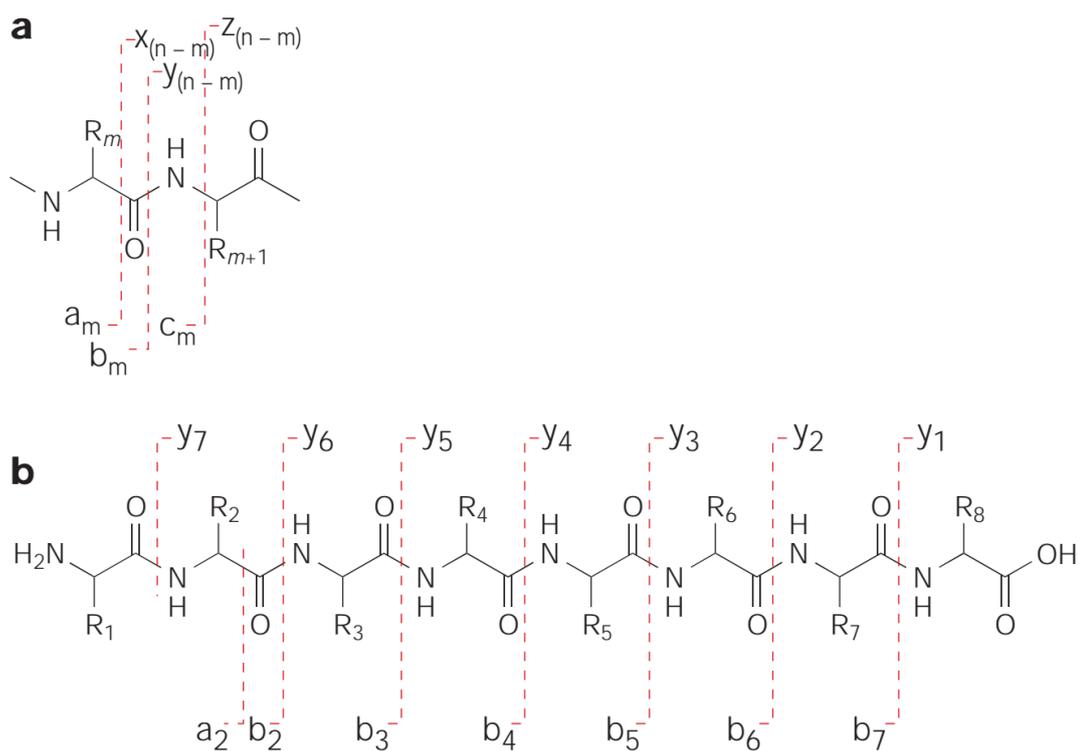
Dentre os algoritmos citados anteriormente, um dos mais conhecidos e comumente empregado em proteômica *shotgun* é o Mascot. Assim como outros softwares de busca, o Mascot compara os valores de m/z obtidos experimentalmente (sequências candidatas), referentes a MM dos peptídeos (PMF) e as fragmentações EMⁿ dos mesmos, com valores de m/z obtidos a partir de fragmentação *in silico* de todos os peptídeos contidos em uma base de dados. Os resultados das comparações são sempre baseados em termos probabilísticos, os quais indicam se os valores obtidos são significantes ou não. A probabilidade absoluta (P) dos valores de m/z teóricos coincidirem com os valores experimentais, de forma randômica, é calculada experimentalmente pelo algoritmo e expressa em termos de *score*, o qual é calculado como o negativo do logaritmo de P (- Log P). Assim, quanto maior for o valor de *score* para uma “correspondência” (um *matching*) de valores de m/z observada, menor é a probabilidade de se de configurar em um evento aleatório, ou seja, maior a confiabilidade do resultado. O Mascot também fornece para cada busca realizada um valor limite (dependendo das condições utilizadas) a partir do qual o valor obtido indica que a determinação possui probabilidade inferior a 5% de ser um evento randômico.^{191,193,199}

1.8.5 Processos de fragmentação de peptídeos

Peptídeos podem ser fragmentados por EM e posteriormente analisados para fornecer informações sobre a composição de seus aminoácidos. Métodos de fragmentação com diferentes mecanismos fundamentais têm sido implementados em proteômica *shotgun*. Entretanto, o método de fragmentação mais comum e robusto aplicado em análises de peptídeos é a dissociação induzida por colisão (*Collision-induced dissociation*, CID), também chamada de dissociação ativada por colisão (*collision-activated dissociation*, CAD).¹⁶¹

Em um experimento típico utilizando o método de fragmentação CID, peptídeos em solução levemente ácida são introduzidos para uma região de vácuo do espectrômetro de massas via ESI ou MALDI. Os íons peptídicos são então acelerados e levados à colisão com moléculas de um gás inerte, geralmente hélio, argônio ou nitrogênio. Utilizando uma descrição simplificada, a energia adicional gerada nas colisões é convertida em energia interna que induz transferências intramoleculares de prótons resultando na desestabilização das ligações peptídicas, provocando sua clivagem e, conseqüentemente, produzindo fragmentos iônicos. Outros tipos de ligações contidas em peptídeos também podem ser quebradas, mas a aplicação de CID de baixa energia cliva preferencialmente as ligações peptídicas (formando íons do tipo b- e y-). Uma vez produzidos os íons fragmentos, o espectrômetro de massas registra suas relações m/z em um espectro obtido via EMⁿ.²⁰⁰

Figura 16 - Estrutura química de um peptídeo com as principais fragmentações.



Fonte: Steen;Mann²⁰³ (2004; p. 704).

(a) Principais fragmentações (nomenclatura proposta por Roepstorff–Fohlmann–Biemann) observadas em dissociação induzida por colisão (CID); (b) Os íons formados são inumerados a partir do N-terminal.

Os íons fragmentos de peptídeos possuem uma classificação (nomenclatura) universal a qual foi proposta por Roepstorff–Fohlmann–Biemann em 1984 e posteriormente revista/modificada em 1987^{201,202}. De acordo com a classificação, quando a carga fica retida no lado do peptídeo que possui o N-terminal, os íons fragmentos formados são rotulados como a_m ,

b_m ou c_m e quando a carga permanece no fragmento que possui o C-terminal, os íons produzidos são os $x_{(n-m)}$, $y_{(n-m)}$ ou $z_{(n-m)}$. Números em subscrito indicam a quantidade de grupos R (resíduos) contidos em cada íon, contados consecutivamente a partir do N-terminal original. A letra n é o número total de resíduos, ou grupos R, contidos no peptídeo inteiro e m representa o número de grupos R que os íons a-, b- ou c- conteriam (Figura 16).²⁰³

Apesar de, teoricamente, todos os tipos de íons supracitados poderem ser produzidos em condições de CID, os íons b- e y- correspondem a grande maioria, enquanto os do tipo a-, a minoria²⁰⁰. Peptídeos trípticos duplamente carregados produzem íons y- e b- quase que exclusivamente, entretanto, formação de íons a- pode ocorrer pela perda de CO (diferença de 27,9949 Da) relativos a íons b-, mas, isso geralmente é observado apenas para íons b_2 , dando origem assim a pares a_2/b_2 (figura 16)²⁰⁴. Cabe ainda salientar que peptídeos tripsinizados formam preferencialmente íons y- em relação à b-, devido à elevada basicidade de alguns resíduos. Além disso, como CID geralmente é utilizado em baixa energia para análises proteômicas, dificilmente ocorrerá rompimento de ligações entre o carbono- α e o carbono da carbonila, bem como entre o nitrogênio e o carbono- α adjacente, e assim, os íons c-, x- e z- raramente são observados no espectro.²⁰⁰

Além dos fragmentos citados, íons “satélites” podem ser produzidos pelas perdas de NH_3 , bastante pronunciada para os aminoácidos **R**, **K**, **Q** e **N** (arginina, lisina, glutamina, asparagina) e H_2O , comum para os aminoácidos **S**, **T** e **E** (serina, treonina e glutamato)²⁰⁵. Quando as fragmentações ocorrem simultaneamente nas posições N- e C-terminal do mesmo resíduo de aminoácido, íons imônio são produzidos, os quais também servem como íons diagnóstico, indicando a presença ou não de certos aminoácidos na sequência. Ademais, modificações pós-traducionais específicas tais como fosforilação ocorridas nas cadeias laterais de **S** e **T**, oxidação de **M**, entre outros, aumentam a labilidade desses grupos laterais, favorecendo a perda neutra destes íons.^{191,203}

É importante ressaltar que, apesar da extensa gama de estudos dedicados ao entendimento de fragmentações peptídicas por CID, os mecanismos ainda não são completamente conhecidos.^{206,207}

Apesar de ser possível determinar sequências de aminoácidos de peptídeos a partir de espectros, aplicando-se cálculos simples como diferenças de massas entre picos vizinhos, este pode ser um trabalho extremamente árduo. Uma série de fatores podem contribuir para este fato. Só para citar alguns, a ausência de conjuntos de íons das séries b- e y-, que são sempre esperados, podem não estar presentes em determinados espectros; alguns fragmentos podem sofrer rearranjos internos e subsequente fragmentação; alguns íons podem estar presentes com

estados de carga diferentes do esperado, dificultando sua correta atribuição; alguns fragmentos podem sofrer rearranjo neutro de hidrogênios durante a fragmentação; entre outros. Levando-se em conta a soma desses fatores, muitas vezes a atribuição de uma série de íons de um peptídeo pode ser passível de erros, tornando a interpretação “manual” de espectros uma tarefa um tanto desafiadora¹⁹¹. Neste contexto, a utilização da bioinformática ganha cada vez mais espaço no campo da proteômica pelo desenvolvimento de algoritmos robustos aplicados para interpretação dos espectros de massas de peptídeos.

1.8.6 Anotação funcional de proteínas

Sem dúvidas, a característica mais importante de uma proteína é sua função. Pode-se até mesmo dizer que sua existência é dependente dessa característica. Para se determinar experimentalmente a função de uma proteína, é necessário, na maioria dos casos, isolá-la do organismo em questão, purificá-la e posteriormente testar sua atividade (biológica, molecular ou química) *in vitro*. Alternativamente, métodos biotecnológicos que utilizam ferramentas modernas de biologia molecular, como por exemplo, expressão gênica controlada, também podem ser empregados nesse tipo de investigação. Entretanto, todas essas técnicas necessitam de grandes investimentos laboratoriais, bem como tempo demasiado. Além disso, são realizadas individualmente para cada proteína, ou em um cenário mais otimista, para uma porção mínima de proteínas de um organismo.²⁰⁸

Estudos focados nas técnicas “ômicas” (genômica, transcriptômica, proteômica, peptidômica, entre outras) geram enormes quantidades de dados. Dependendo das abordagens escolhidas, os dados gerados são referentes à sequências de ácidos nucleicos, que podem ser atribuídas, por exemplo, a genes de interesse do estudo, bem como à sequências de aminoácidos (peptídeos) que podem ser utilizadas na identificação de proteínas. Em se tratando de proteômica, milhares de proteínas podem ser identificadas em apenas um organismo. Contudo, fica evidente que descobrir as funções de cada proteína presente em um proteoma, por métodos tradicionais, é uma tarefa altamente inviável, para não dizer impossível.

Em contrapartida, é possível atribuir funções biológicas à grandes conjuntos de sequências a partir de uma abordagem alternativa, a anotação funcional (ou anotação gênica) utilizando bases de dados biológicos. Anotação funcional é o processo de atribuir informações biológicas, em larga escala, a produtos de genes²⁰⁹. As anotações podem ser realizadas por métodos automatizados ou de maneira manual. Os dois métodos apresentam vantagens e desvantagens, dependendo dos resultados desejados. Naturalmente, devido ao massivo volume

de dados, os métodos manuais demandam longos períodos de tempo e exigem um trabalho extremamente árduo e exaustivo para os anotadores. Além disso, podem resultar em interpretações de dados conflitantes. Por outro lado, anotações automatizadas possuem a vantagem de serem rápidas, não requererem treinamentos prévios de anotadores e de processarem grandes quantidades de dados brutos de forma consistente.²¹⁰

O Gene Ontology (GO) é uma ferramenta de bioinformática utilizada para fornecer informações de funções biológicas de produtos de genes. A iniciativa GO surgiu a partir da necessidade de se criar um vocabulário padrão para a comunidade científica, o qual descreve funções para produtos gênicos de todas as espécies. Este consiste em três divisões: função molecular (atividade específica do produto de gene em questão, como atividade enzimática de uma proteína, por exemplo), processos biológicos (processo no qual o produto de gene está inserido, como a mitose) e componentes celulares (estrutura celular na qual as funções ocorrem).²¹¹

Após quase duas décadas de existência, o GO já integra informações funcionais para genes de mais de 460 mil espécies (incluindo linhagens), dentre plantas, animais e microrganismos²¹². Grande parte dessas informações é disponibilizada pela base de dados de sequências proteicas e anotação funcionais UniProt (Universal Protein Resource, <http://www.uniprot.org>) que, até 2015, continha mais de 90 milhões de registros. Esta base é considerada a maior e mais completa do gênero e tem sido citada pelos pesquisadores como “padrão ouro” para esse tipo de conteúdo.^{213,214}

5 CONCLUSÃO

A partir do presente estudo evidenciou-se que a especialização das células de *Maytenus ilicifolia* para biossíntese dos TQs maitenina e 22 β -hidroxi-maitenina foi aumentada pela elicitação com 100 μ M MeJA.

Os estudos proteômicos revelaram que a elicitação das células provocaram uma pronunciada variação em sua composição proteica, no entanto, preservando seu perfil funcional. As vias metabólicas secundárias intrínsecas à espécie, que levam, principalmente, a biossíntese de alcaloides (piridínicos sesquiterpênicos), polifenóis (catequinas, flavonoides e taninos) e terpenoides, permaneceram-se preservadas após a elicitação com MeJA. Além disso, as análises proteômicas de ambas as células, induzidas (e não), para biossíntese dos TQs, foram complementares para detecção de enzimas envolvidas na via dos TQs, incluindo enzimas CYP450s que, potencialmente, catalisam as etapas finais da biossíntese desses compostos alvo: as oxidações de friedelina à TQs.

Não obstante, nas células foram encontradas enzimas relacionadas à síntese de metabólitos primários precursores (diretos) de metabólitos secundários característicos de *M. ilicifolia*, bem como outras categorias de proteínas reportadas ao estresse vegetal e a processos metabólicos essenciais, incluindo síntese de proteínas, ácidos nucleicos e outros.

Tomados em conjunto, os resultados deste estudo mostram que investigações proteômicas oferecem e permitem, além de novas introspecções proteicas/enzimáticas sobre determinados alvos, a identificação de vias atraentes, candidatas para investigações mais aprofundadas. Em resumo, os resultados apresentados neste estudo forneceram valiosas informações do proteoma de células de *M. ilicifolia*, elicitadas para superprodução de TQs, os quais oferecem possibilidades interessantes para futuras pesquisas, tais como no campo da engenharia metabólica para a obtenção de metabólitos secundários alvo.

REFERÊNCIAS

- 1 SIMMONS, M. P. et al. Phylogeny of the Celastraceae inferred from 26S nuclear ribosomal DNA, phytochrome B, rbcL, atpB, and morphology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 19, n. 3, p. 353-366, June 2001.
- 2 SIMMONS, M. et al. Phylogeny of Celastraceae subfamilies Cassinoideae and Tripterygioideae inferred from morphological characters and nuclear and plastid loci. **Systematic Botany**, v. 37, n. 2, p. 456-467, Apr. 2012.
- 3 SIMMONS, M. P. Celastraceae. In: KUBITZKI, K. (Ed.). **Flowering plants dicotyledons: Celastrales, Oxalidales, Rosales, Cornales, Ericales**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004. v. 6, chap. 6, p. 29-64
- 4 SIMMONS, M. P. et al. Phylogeny of the Celastraceae inferred from phytochrome B gene sequence and morphology. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 2, p. 313-325, Feb. 2001.
- 5 SANTOS, L. B. dos. **Sistemática e filogenia de *Maytenus Molina* (Celastraceae) na região neotropical**. 2016. 350 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2016.
- 6 MELCHIOR, H. **A Engler's Syllabus der pflanzenfamilien**. 12th ed. Berlin: Gebrüder Bornträger, 1964. 666 p.
- 7 CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2nd ed. New York: New York Botanical Garden, 1988. 555 p.
- 8 THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 2, p. 105-121, Oct. 2009.
- 9 BIRAL, L. et al. A new species of *Maytenus* (Celastraceae) from the Brazilian Atlantic Forest, with evidence of molecular phylogeny, and two new synonyms for *Maytenus floribunda*. **Phytotaxa**, v. 231, n. 1, p. 53-62, Oct. 2015.
- 10 LOESENER, T. Celastraceae. In: ENGLER, A.; HARMS, H.; MATTFELD, J. (Ed.). **Die natürlichen pflanzenfamilien**. Berlin: Duncker & Humblot, 1942. v. 20b, p. 87-197.
- 11 THE BRAZIL FLORA GROUP. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguesia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, Oct. 2015.
- 12 NIERO, R.; FALONI, de A. S.; CECHINEL FILHO, V. A review of the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of plants of the *Maytenus* genus. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 18, p. 1851-1871, June 2011.
- 13 PERESTELO, N. R. et al. Sesquiterpenes from *Maytenus jelskii* as potential cancer chemopreventive agents. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 2, p. 127-132, Feb. 2010.
- 14 TORRES-ROMERO, D. et al. Sesquiterpenes from *Celastrus vulcanicola* as photosynthetic inhibitors. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 8, p. 1331-1335, Aug. 2008.

- 15 NÚÑEZ, M. J. et al. Ent-rosane and abietane diterpenoids as cancer chemopreventive agents. **Phytochemistry**, v. 72, n. 4/5, p. 385-390, Mar. 2011.
- 16 ANKLI, A. et al. Cytotoxic cardenolides and antibacterial terpenoids from *Crossopetalum gaumeri*. **Phytochemistry**, v. 54, n. 5, p. 531-537, June 2000.
- 17 MARTÍN, J. D. New diterpenoids extractives of *Maytenus dispermus*. **Tetrahedron**, v. 29, n. 17, p. 2553-2559, Jan. 1973.
- 18 KOYAMA, Y. et al. Microtropiosides A-F: *ent*-labdane diterpenoid glucosides from the leaves of *Microtropis japonica* (Celastraceae). **Phytochemistry**, v. 71, n. 5/6, p. 675-681, Mar. 2010.
- 19 TANAKA, N. et al. Kaurane and abietane diterpenoids from *Tripterygium doianum* (Celastraceae). **Phytochemistry**, v. 65, n. 14, p. 2071-2076, July 2004.
- 20 GONZÁLEZ, A. G. et al. Minor constituents from *Orthosphenia mexicana*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 6, p. 1338-1341, Nov. 1989.
- 21 CHEN, B.; DUAN, H.; TAKAISHI, Y. Triterpene caffeoyl esters and diterpenes from *Celastrus stephanotifolius*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 5, p. 683-687, June 1999.
- 22 CORSINO, J. et al. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 741-748, Dec. 2000.
- 23 DU, Y.-C. et al. New cytotoxic lupane triterpenes from *Perrottetia arisanensis*. **Planta Medica**, v. 75, n. 8, p. 848-855, June 2009.
- 24 CÁCERES-CASTILLO, D. et al. 21 β -hydroxy-oleanane-type triterpenes from *Hippocratea excelsa*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 4, p. 1057-1064, Feb. 2008.
- 25 NAKANO, K. et al. A diterpenoid and triterpenes from tissue cultures of *Tripterygium wilfordii*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 2, p. 293-296, May 1997.
- 26 LI, K. et al. Terpenoids from *Tripterygium wilfordii*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 4, p. 791-796, June 1997.
- 27 SHIROTA, O. et al. Two cangorosin a type triterpene dimers from *Maytenus chuchuhuasca*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 9, p. 1148-1150, Sept. 2004.
- 28 GONZÁLEZ, A. G. et al. Triterpene trimers from *Maytenus scutioides*: cycloaddition compounds? **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 8, p. 1185-1187, Aug. 1999.
- 29 PAZ, T. A. et al. Production of the quinone-methide triterpene maytenin by in vitro adventitious roots of *Peritassa campestris* (Cambess.) A.C.Sm. (Celastraceae) and rapid detection and identification by APCI-IT-MS/MS. **BioMed Research International**, v. 2013, Jan. 2013. doi:10.1155/2013/485837.
- 30 CARVALHO, P. R. F. et al. Antioxidant quinonemethide triterpenes from *Salacia campestris*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, n. 3, p. 367-372, Mar. 2005.

- 31 CORSINO, J. et al. Quantitative determination of maitenin and 22 β -hydroxymaitenin in callus of *Maytenus aquifolium* (Celastraceae) by reverse phase high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 9, n. 5, p. 245-247, Aug. 1998.
- 32 JELLER, A. H. et al. Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 13, p. 1977-1982, July 2004.
- 33 LORENZI, H. **Arvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 1998. 352 p.
- 34 CARVALHO-OKANO, R. M. de; LEITÃO FILHO, H. de F. O gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol. (Celastraceae) no Brasil extra-amazônico. In: REIS, M. S.; SILVA, S. R. (Ed.). **Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: *Maytenus spp.***, espinheira-santa. Brasília: IBAMA, 2004. p. 11-51.
- 35 MARIOT, M. P.; BARBIERI, R. L. O conhecimento popular associado ao uso da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* e *M. aquifolium*). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 666-668, July 2007. Supl. 1.
- 36 CARVALHO, A. C. B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, May 2008.
- 37 ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina**: bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires: Isis Ediciones, 1998. 1039 p.
- 38 LEITE, J. P. V. et al. Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 3796-3801, Aug. 2001.
- 39 SOARES, L. A. L. et al. Development and validation of a LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 4, p. 787-790, Nov. 2004.
- 40 BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Série C: projetos, programas e relatórios. Brasília, DF, 2009. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/05/programa-nacional-plantas-medicinais-fitoter--picos-pnpmf.pdf>>. Acesso em: 22 Jan. 2015.
- 41 SOUZA, L. M. de. et al. Analysis of flavonol glycoside isomers from leaves of *Maytenus ilicifolia* by offline and online high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1207, n. 1/2, p. 101-109, Oct. 2008.
- 42 MOSSI, A J. et al. Chemical variation of tannins and triterpenes in Brazilian populations of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 69, n. 2, p. 339-345, Maio 2009.
- 43 SANTOS, V. F. F. M. dos et al. Antiprotozoal sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 991-995, May 2012.
- 44 BUFFA FILHO, W. et al. In vitro propagation of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) as potential source for antitumoral and antioxidant quinomethide triterpenes production. A rapid quantitative method for their analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatograp. **Arkivoc**, v. 2004, n. 6, p. 137-146, Sept. 2004.

- 45 COPPEDE, J. da S. et al. Cell cultures of *Maytenus ilicifolia* Mart. are richer sources of quinone-methide triterpenoids than plant roots in natura. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 33-43, Mar. 2014.
- 46 GUTIÉRREZ, F. et al. Terpenoids from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 6, p. 1049-1052, June 2007.
- 47 PESSUTO, M. B. et al. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 412-416, Jan. 2009.
- 48 ZHU, N.; NIKOLAI, S.; ZHANG, J. Three glucosides from *Maytenus ilicifolia*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p. 265-268, Jan. 1998.
- 49 SOUZA, L. M. de et al. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 1, p. 59-67, May 2008.
- 50 TIBERTI, L. A. et al. Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 846, n. 1, p. 378-384, Feb. 2007.
- 51 DIAGONE, C. a. et al. CZE/PAD and HPLC-UV/PAD orofile of flavonoids from *Maytenus aquifolium* and *Maytenus ilicifolia* “espinheira santa” leaves extracts. **Chromatography Research International**, v. 2012, Jan. 2012. doi:10.1155/2012/691509
- 52 LEME, T. dos S. V. et al. Role of prostaglandin/cAMP pathway in the diuretic and hypotensive effects of purified fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek (Celastraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 154-161, Oct. 2013.
- 53 GAO, J.-M. et al. The dihydro- β -agarofuran sesquiterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 24, n. 5, p. 1153-1189, May 2007.
- 54 GONZALEZ, A. G. et al. Antifeedant activity of sesquiterpenes from Celastraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, n. 6, p. 513-519, Sept. 1997.
- 55 GONZÁLEZ, A. G. et al. Minor constituents from *Orthosphenia mexicana*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 6, p. 1338-1341, Nov. 1989.
- 56 ZHENG, Y. L.; XU, Y.; LIN, J. F. Immunosuppressive effects of wilfortrine and euonine (Chemical Abstract). **Yao xue xue bao = Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 24, n. 8, p. 568-572, 1989.
- 57 DUAN, H. et al. Novel sesquiterpene esters with alkaloid and monoterpene and related compounds from *Tripterygium hypoglaucum*: a new class of potent anti-HIV agents). **Tetrahedron Letters**, v. 40, n. 15, p. 2969-2972, Apr. 1999.
- 58 KUO, Y. H. et al. Two new macrolide sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus emarginata*: emarginatine G and the cytotoxic emarginatine F. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 2, p. 263-269, Feb. 1994.
- 59 UJITA, K. et al. Inhibitory effects of triptogelin A-1 on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced skin tumor promotion. **Cancer Letters**, v. 68, n. 2/3, p. 129-133, Feb. 1993.

- 60 ITOKAWA, H. et al. Oligo-nicotinated sesquiterpene polyesters from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 9, p. 1479-1485, Sept. 1993.
- 61 ITOKAWA, H. et al. Five additional oligo-nicotinated sesquiterpene polyesters from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 4, p. 460-470, Apr. 1994.
- 62 SHIROTA, O. et al. Sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus ilicifolia*. **Heterocycles**, v. 38, n. 2, p. 383-389, Jan. 1994.
- 63 LIÃO, L. M. Sesquiterpene pyridine alkaloids. In: CORDELL, G. A. (Ed.). **Alkaloids: chemistry and biology**. San Diego: Academic Press, 2003. v. 60, chap. 5, p. 287-343.
- 64 AHMED, M. S. et al. High-performance liquid chromatographic separation and quantitation of maytansinoids in *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Chromatography A**, v. 213, n. 2, p. 340-344, Aug. 1981.
- 65 ISSELL, B. F.; CROOKE, S. T. Maytansine. **Cancer Treatment Reviews**, v. 5, n. 4, p. 199-207, Dec. 1978.
- 66 WOLPERT-DEFILIPPES, M. K. et al. Initial studies on the cytotoxic action of maytansine, a novel ansa macrolide. **Biochemical Pharmacology**, v. 24, n. 6, p. 751-754, Mar. 1975.
- 67 NAKAO, H. et al. Cytotoxic activity of maytanprine isolated from *Maytenus diversifolia* in human leukemia K562 cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 8, p. 1236-1240, Aug. 2004.
- 68 WIDDISON, W. et al. Metabolites of antibody–maytansinoid conjugates: characteristics and in vitro potencies. **Molecular Pharmaceutics**, v. 12, n. 6, p. 1762-1773, June 2015.
- 69 ECKELMANN, D.; KUSARI, S.; SPITELLER, M. Occurrence and spatial distribution of maytansinoids in *Putterlickia pyracantha*, an unexplored resource of anticancer compounds. **Fitoterapia**, 2016. doi: 10.1016/j.fitote.2016.08.006
- 70 MANDELBAUM-SHAVIT, F.; WOLPERT-DEFILIPPES, M. K.; JOHNS, D. G. Binding of maytansine to rat brain tubulin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 72, n. 1, p. 47-54, Sept. 1976.
- 71 PEREZ, H. L. et al. Antibody-drug conjugates: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 7, p. 869-881, Dec. 2014.
- 72 NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, Feb. 2016.
- 73 OHSAKI, A. et al. Four new triterpenoids from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 3, p. 469-471, Mar. 2004.
- 74 CHANDLER, R. F.; HOOPER, S. N. Friedelin and associated triterpenoids. **Phytochemistry**, v. 18, n. 5, p. 711-724, Jan. 1979.
- 75 SHAN, W.-G. et al. Natural friedelanes. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 8, p. 1392-1434, Aug. 2013.

76 ALVARENGA, N.; FERRO, E. A. Bioactive triterpenes and related compounds from celastraceae. In: ATTA-ur-RAHMAN (Ed.). **Studies in natural products chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2006. v. 33, pt. M, p. 239-307.

77 QUEIROGA, C. L. et al. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3 β -ol and friedelin *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 3, p. 465-468, Sept. 2000.

78 ITOKAWA, H. et al. Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 11, p. 3713-3716, Jan. 1991.

79 BRÜNING, R.; WAGNER, H. Übersicht über die celastraceen-inhaltsstoffe: chemie, chemotaxonomie, biosynthese, pharmakologie. **Phytochemistry**, v. 17, n. 11, p. 1821-1858, Jan. 1978.

80 GUNATILAKA, A. A. L. Triterpenoid quinonemethides and related compounds (Celastraceae). In: HERZ, W. et al. (Ed.). **Fortschritte der chemie organischer naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**. Wien: Springer-Verlag, 1996. v. 67, chap. 1, p. 1-123.

81 BUFFA FILHO, W. et al. Quantitative determination of cytotoxic friedo-*nor*-oleanane derivatives from five morphological types of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 2, p. 75-78, Mar. 2002.

82 KIM, D. H. et al. Suppression of inflammatory responses by celastrol, a quinone methide triterpenoid isolated from *Celastrus regelii*. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 39, n. 9, p. 819-827, Sept. 2009.

83 SANTOS, V. A. D. F. F. M. dos et al. Evaluation of antioxidant capacity and synergistic associations of quinonemethide triterpenes and phenolic substances from *Maytenus ilicifolia* (celastraceae). **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 6956-6973, Aug. 2010.

84 MONTANARI, T.; BEVILACQUA, E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. **Contraception**, v. 65, n. 2, p. 171-175, Feb. 2002.

85 GULLO, F. P. et al. Antifungal activity of maytenin and pristimerin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, Mar. 2012. doi:10.1155/2012/340787

86 SANTOS, V. A. F. F. M. dos et al. Antiprotozoal activity of quinonemethide triterpenes from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 1053-1062, Jan. 2013.

87 SETZER, W. N. et al. Isolation and frontier molecular orbital investigation of bioactive quinone-methide triterpenoids from the bark of *Salacia petenensis*. **Planta Medica**, v. 67, n. 1, p. 65-69, Feb. 2001.

88 SOTANAPHUN, U. et al. Antimicrobial activity and stability of tingenone derivatives. **Planta Medica**, v. 65, n. 5, p. 450-452, June 1999.

89 GAO, X. et al. Anticancer activity of pristimerin in ovarian carcinoma cells is mediated through the inhibition of prosurvival Akt/NF- κ B/mTOR signaling. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**, v. 10, n. 4, p. 275-283, Dec. 2014.

- 90 DEEB, D. et al. Pristimerin, a quinonemethide triterpenoid, induces apoptosis in pancreatic cancer cells through the inhibition of pro-survival Akt/NF- κ B/mTOR signaling proteins and anti-apoptotic Bcl-2. **International Journal of Oncology**, v. 44, n. 5, p. 1707-1715, Mar. 2014.
- 91 ESSIEN, E. et al. Chemotaxonomic characterization and in-vitro antimicrobial and cytotoxic activities of the leaf essential oil of *Curcuma longa* grown in Southern Nigeria. **Medicines**, v. 2, n. 4, p. 340-349, Dec. 2015.
- 92 AQIL, F. et al. Exosomal formulation enhances therapeutic response of celastrol against lung cancer. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 101, n. 1, p. 12-21, Aug. 2016.
- 93 GUO, J. et al. Downregulation of miR-17-92a cluster promotes autophagy induction in response to celastrol treatment in prostate cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 478, n. 2, p. 804-810, Sept. 2016.
- 94 CHOI, J. Y. et al. PEGylated lipid bilayer-supported mesoporous silica nanoparticle composite for synergistic co-delivery of axitinib and celastrol in multi-targeted cancer therapy. **Acta Biomaterialia**, v. 39, p. 94-105, July 2016.
- 95 CHANG, F.-R. et al. Antitumor agents. 228. Five new agarofurans, reissantins A-E, and cytotoxic principles from *Reissantia buchananii*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 11, p. 1416-1420, Nov. 2003.
- 96 LEE, B. W. et al. Quinone methide triterpenes from *Tripterygium regelii*. **Agricultural Chemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 77-80, June 2004.
- 97 YELANI, T.; HUSSEIN, A. A.; MEYER, J. J. M. Isolation and identification of poisonous triterpenoids from *Elaeodendron croceum*. **Natural Product Research**, v. 24, n. 15, p. 1418-1425, Sept. 2010.
- 98 SUNG, B. et al. Celastrol, a triterpene, enhances TRAIL-induced apoptosis through the down-regulation of cell survival proteins and up-regulation of death receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 32, p. 16920, Aug. 2016.
- 99 NGASSAPA, O. et al. Quinone-methide triterpenes and salaspermic acid from *Kokoona ochracea*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 1, p. 1-8, Jan. 1994.
- 100 IDRIS, A. I. A. et al. Pharmacologic inhibitors of IkappaB kinase suppress growth and migration of mammary carcinosarcoma cells in vitro and prevent osteolytic bone metastasis in vivo. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, n. 8, p. 2339-2347, Aug. 2009.
- 101 ORAMAS-ROYO, S. M. et al. Cytotoxic triterpenoids from *Maytenus retusa*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 12, p. 2029-2034, Dec. 2010.
- 102 SEO, H. R. et al. Radiosensitization by celastrol is mediated by modification of antioxidant thiol molecules. **Chemico-Biological Interactions**, v. 193, n. 1, p. 34-42, Aug. 2011.
- 103 MORITA, H. et al. Antimitotic quinoid triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 3, p. 1050-1052, Feb. 2008.

- 104 ALMEIDA, M. T. R. de et al. Antiproliferative terpenoids and alkaloids from the roots of *Maytenus vitis-idaea* and *Maytenus spinosa*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 14, p. 1741-1748, Oct. 2010.
- 105 SHIROTA, O. et al. Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhuasca*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 12, p. 1675-1681, Dec. 1994.
- 106 ITOKAWA, H. et al. New triterpene dimers from *Maytenus ilicifolia*. **Tetrahedron Letters**, v. 31, n. 47, p. 6881-6882, 1990.
- 107 SHIROTA, O. et al. Revised structures of cangorosins, triterpene dimers from *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 2, p. 111-115, Feb. 1997.
- 108 KARUPPUSAMY, S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 13, p. 1222-1239, Dec. 2009.
- 109 LI, Z.; LIU, Z. Effect of NaCl on growth, morphology, and camptothecin accumulation in *Camptotheca acuminata* seedlings. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 83, n. 4, p. 931-938, Oct. 2003.
- 110 RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 2, p. 101-153, May 2002.
- 111 CAI, Z. et al. Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. **Plant Cell Reports**, v. 31, n. 3, p. 461-477, Apr. 2012.
- 112 CHAVAN, S. P. et al. Influence of growth regulators and elicitors on cell growth and α -tocopherol and pigment productions in cell cultures of *Carthamus tinctorius* L. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 6, p. 1701-1707, Mar. 2011.
- 113 ABREU, I. N. de et al. Production of pilocarpine in callus of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* stapf). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 41, n. 6, p. 806-811, Nov. 2005.
- 114 HUANG, C.; QIAN, Z. G.; ZHONG, J. J. Enhancement of ginsenoside biosynthesis in cell cultures of *Panax ginseng* by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide elicitation. **Journal of Biotechnology**, v. 165, n. 1, p. 30-36, May 2013.
- 115 MENDHULKAR, V. D.; VAKIL, M. M. A. Elicitation of flavonoids by salicylic acid and *Penicillium expansum* in *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees. cell culture. **Research in Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 1-9, Mar. 2013.
- 116 KOLEWE, M. E.; GAURAV, V.; ROBERTS, S. C. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 243-256, Mar. 2008.
- 117 PERASSOLO, M. et al. Role of reactive oxygen species and proline cycle in anthraquinone accumulation in *Rubia tinctorum* cell suspension cultures subjected to methyl jasmonate elicitation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 7, p. 758-763, 2011.

- 118 ZHANG, N. et al. Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation, and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 1, p. 15-23, Jan. 2013.
- 119 ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 4, p. 283-333, June 2005.
- 120 GUNDLACH, H. et al. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 6, p. 2389-2393, Mar. 1992.
- 121 KETCHUM, R. E. B. et al. The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, n. 1, p. 97-105, Jan. 1999.
- 122 MIRJALILI, N.; LINDEN, J. C. Methyl jasmonate induced production of taxol in suspension cultures of *Taxus cuspidata*: ethylene interaction and induction models. **Biotechnology Progress**, v. 12, p. 110-118, Feb. 1996.
- 123 YUKIMUNE, Y. et al. Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. **Nature biotechnology**, v. 14, n. 9, p. 1129-1132, Sept. 1996.
- 124 NORRIZAH, J. S. et al. Ursolic acid and oleanolic acid productions in elicited cell suspension cultures of *Hedyotis corymbosa*. **Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 238-242, 2012.
- 125 WILSON, S. A.; ROBERTS, S. C. Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. **Plant Biotechnology Journal**, v. 10, n. 3, p. 249-268, Apr. 2012.
- 126 WASTERNAACK, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Annals of Botany**, v. 100, n. 4, p. 681-697, Oct. 2007.
- 127 PAUWELS, L.; INZÉ, D.; GOOSSENS, A. Jasmonate-inducible gene: what does it mean? **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 2, p. 87-91, Feb. 2009.
- 128 BROWSE, J. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 183-205, June 2009.
- 129 SPITZER-RIMON, B. et al. EOBII, a gene encoding a flower-specific regulator of phenylpropanoid volatiles' biosynthesis in petunia. **The Plant cell**, v. 22, n. 6, p. 1961-1976, June 2010.
- 130 DE GEYTER, N. et al. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 6, p. 349-359, June 2012.
- 131 MEMELINK, J.; VERPOORTE, R.; KIJNE, J. W. ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 5, p. 212-219, May 2001.
- 132 DUBOS, C. et al. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 10, p. 573-581, Oct. 2010.

133 PETRONI, K.; TONELLI, C. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs. **Plant Science**, v. 181, n. 3, p. 219-229, Sept. 2011.

134 SONG, S. K. et al. Systemic induction of a *Phytolacca insularis* antiviral protein gene by mechanical wounding, jasmonic acid, and abscisic acid. **Plant Molecular Biology**, v. 43, n. 4, p. 439-450, July 2000.

135 SEO, H. S. et al. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 8, p. 4788-4793, Apr. 2001.

136 WASTERNAACK, C.; HAUSE, B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. **Annals of Botany**, v. 111, n. 6, p. 1021-1058, June 2013.

137 WASTERNAACK, C. Action of jasmonates in plant stress responses and development - applied aspects. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 1, p. 31-39, Feb. 2014.

138 WU, J.; WANG, L.; BALDWIN, I. T. Methyl jasmonate-elicited herbivore resistance: does MeJA function as a signal without being hydrolyzed to JA? **Planta**, v. 227, n. 5, p. 1161-1168, Mar. 2008.

139 CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 355-381, June 1997.

140 KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 299-328, June 2002.

141 KOMBRINK, E. Chemical and genetic exploration of jasmonate biosynthesis and signaling paths. **Planta**, v. 236, n. 5, p. 1351-1366, Nov. 2012.

142 XIE, D. X. et al. COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. **Science**, v. 280, n. 5366, p. 1091-1094, May 1998.

143 CHINI, A.; BOTER, M.; SOLANO, R. Plant oxylipins: COI1/JAZs/MYC2 as the core jasmonic acid-signalling module. **FEBS Journal**, v. 276, n. 17, p. 4682-4692, Sept. 2009.

144 SHAN, X.; YAN, J.; XIE, D. Comparison of phytohormone signaling mechanisms. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 84-91, Feb. 2012.

145 VANHOLME, B. et al. The tify family previously known as ZIM. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 6, p. 239-244, June 2007.

146 CHUNG, H. S.; HOWE, G. A. A critical role for the TIFY motif in repression of jasmonate signaling by a stabilized splice variant of the JASMONATE ZIM-domain protein JAZ10 in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 21, n. 1, p. 131-145, Jan. 2009.

147 PAUWELS, L. et al. NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. **Nature**, v. 464, n. 7289, p. 788-791, Mar. 2010.

148 CHINI, A. et al. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. **Nature**, v. 448, n. 7154, p. 666-671, Aug. 2007.

- 149 SUZA, W. P.; STASWICK, P. E. The role of JAR1 in Jasmonoyl-L-isoleucine production during *Arabidopsis* wound response. **Planta**, v. 227, n. 6, p. 1221-1232, May 2008.
- 150 SONG, S. et al. Regulation of stamen development by coordinated actions of jasmonate, auxin, and gibberellin in *Arabidopsis*. **Molecular Plant**, v. 6, n. 4, p. 1065-1073, July 2013.
- 151 KAZAN, K.; MANNERS, J. M. MYC2: the master in action. **Molecular Plant**, v. 6, n. 3, p. 686-703, May 2013.
- 152 DOMBRECHT, B. et al. MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 19, n. 7, p. 2225-2245, July 2007.
- 153 ZHANG, H. et al. The basic helix-loop-helix transcription factor CrMYC2 controls the jasmonate-responsive expression of the ORCA genes that regulate alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. **Plant Journal**, v. 67, n. 1, p. 61-71, July 2011.
- 154 SHOJI, T.; HASHIMOTO, T. Tobacco MYC2 regulates jasmonate-inducible nicotine biosynthesis genes directly and by way of the NIC2-locus ERF genes. **Plant & Cell Physiology**, v. 52, n. 6, p. 1117-1130, June 2011.
- 155 ZHANG, H. B. et al. Tobacco transcription factors NtMYC2a and NtMYC2b form nuclear complexes with the NtJAZ1 repressor and regulate multiple jasmonate-inducible steps in nicotine biosynthesis. **Molecular Plant**, v. 5, n. 1, p. 73-84, Jan. 2012.
- 156 DE BOER, K. et al. APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR and basic helix-loop-helix tobacco transcription factors cooperatively mediate jasmonate-elicited nicotine biosynthesis. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, v. 66, n. 6, p. 1053-1065, June 2011.
- 157 GUPTA, N.; PORTER, T. D. Garlic and garlic-derived compounds inhibit human squalene monooxygenase. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 6, p. 1662-1667, June 2001.
- 158 JORRÍN-NOVO, J. V. et al. Fourteen years of plant proteomics reflected in proteomics: moving from model species and 2DE-based approaches to orphan species and gel-free platforms. **Proteomics**, v. 15, n. 5/6, p. 1089-1112, Mar. 2015.
- 159 WILKINS, M. R. et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 13, p. 19-50, July 1996.
- 160 BINI, L. et al. From genome to proteome: back to the future. Report on the 7th Siena meeting, September 3-7, 2006. **Proteomics**, v. 7, n. 10, p. 332-336, Feb. 2007.
- 161 ZHANG, Y. et al. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 4, p. 2343-2394, Mar. 2013.
- 162 VADIVEL, A. K. A Gel-based proteomics in plants: time to move on from the tradition. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, May 2015. doi:10.3389/fpls.2015.00369.
- 163 KAMO, M. et al. Separation and characterization of *Arabidopsis thaliana* proteins by two-dimensional gel electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 16, n. 3, p. 423-430, Mar. 1995.

- 164 JAMES, P. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 30, n. 4, p. 279-331, Nov. 1997.
- 165 WOLTERS, D. A.; WASHBURN, M. P.; YATES, J. R. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 23, p. 5683-5690, Oct. 2001.
- 166 LINK, A. J. et al. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 7, p. 676-682, July 1999.
- 167 LIU, H.; SADYGOV, R. G.; YATES, J. R. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 14, p. 4193-4201, July 2004.
- 168 HAAS, W. et al. Optimization and use of peptide mass measurement accuracy in shotgun proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 7, p. 1326-1337, July 2006.
- 169 NESVIZHSHKII, A. I. Protein identification by tandem mass spectrometry and sequence database searching. In: MATTHIESEN, R. (Ed.). **Mass spectrometry data analysis in proteomics**. Otowa: Humana Press, 2007. Chap. 6, p. 87-119. (Methods in molecular biology, v. 367).
- 170 HAN, X. et al. Extending top-down mass spectrometry to proteins with masses greater than 200 kilodaltons. **Science**, v. 314, n. 5796, p. 109-112, Oct. 2006.
- 171 TRAN, J. C. et al. Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics. **Nature**, v. 480, n. 7376, p. 254-258, Dec. 2011.
- 172 GSTAIGER, M.; AEBERSOLD, R. Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 9, p. 617-627, Sept. 2009.
- 173 YATES, J. R. III. A century of mass spectrometry: from atoms to proteomes. **Nature Methods**, v. 8, n. 8, p. 633-637, July 2011.
- 174 ONG, S.-E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. **Nature Chemical Biology**, v. 1, n. 5, p. 252-262, Oct. 2005.
- 175 RAMAUTAR, R. et al. CE-MS for proteomics: advances in interface development and application. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 13, p. 3814-3828, July 2012.
- 176 DI PALMA, S. et al. Recent advances in peptide separation by multidimensional liquid chromatography for proteome analysis. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 13, p. 3791-3813, July 2012.
- 177 GEORGE, I. S.; FENNELL, A. Y.; HAYNES, P. A. Protein identification and quantification from iverbank grape, *Vitis riparia*: comparing SDS-PAGE and FASP-GPF techniques for shotgun proteomic analysis. **Proteomics**, v. 15, n. 17, p. 3061-3065, Sept. 2015.
- 178 CHICK, J. M. et al. A mass-tolerant database search identifies a large proportion of unassigned spectra in shotgun proteomics as modified peptides. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 743-749, June 2015.

- 179 HILDONEN, S.; HALVORSEN, T. G.; REUBSAET, L. Why less is more when generating tryptic peptides in bottom-up proteomics. **Proteomics**, v. 14, n. 17/18, p. 2031-2041, Sept. 2014.
- 180 FANG, P. et al. Controlling nonspecific trypsin cleavages in LC-MS/MS-based shotgun proteomics using optimized experimental conditions. **The Analyst**, v. 140, n. 22, p. 7613-7621, Nov. 2015.
- 181 OLSEN, J. V.; ONG, S.-E.; MANN, M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 3, n. 6, p. 608-614, June 2004.
- 182 BARBOSA, E. B. et al. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366-375, maio 2012.
- 183 IMIN, N. et al. Characterisation of rice anther proteins expressed at the young microspore stage. **Proteomics**, v. 1, n. 9, p. 1149-1161, Sept. 2001.
- 184 LOPEZ, J. L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 849, n. 1/2, p. 190-202, Apr. 2007.
- 185 MacBEATH, G. Protein microarrays and proteomics. **Nature Genetics**, v. 32, p. 526-532, Dec. 2002.
- 186 CAÑAS, B. et al. Mass spectrometry technologies for proteomics. **Briefings in Functional Genomics & Proteomics**, v. 4, n. 4, p. 295-320, Feb. 2006.
- 187 PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, n. 6788, p. 837-846, June 2000.
- 188 HAN, X.; ASLANIAN, A.; YATES, J. R. Mass spectrometry for proteomics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 5, p. 483-490, Oct. 2008.
- 189 HARDMAN, M.; MAKAROV, A. A. Interfacing the orbitrap mass analyzer to an electrospray ion source. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 7, p. 1699-1705, Apr. 2003.
- 190 YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 11, p. 49-79, Jan. 2009.
- 191 CANTÚ, M. D. et al. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 669-675, Mar. 2008.
- 192 MITULOVIĆ, G. New HPLC techniques for proteomics analysis: a short overview of latest developments. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 38, n. 3, p. 390-403, Oct. 2015.
- 193 MATRIX SCIENCE. **Scoring**. 2014. Disponível em: <http://www.matrixscience.com/help/scoring_help.html>. Acesso em: 8 dez. 2015.
- 194 SHIMADZU. **Liquid chromatograph mass spectrometer LCMS-IT-TOF**. Disponível em: <https://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/Mass_Spec/C146-E093D.pdf>. Acesso em: 4 jul. 2015.

- 195 McMAHON, G. Separation instruments. In: _____. **Analytical instrumentation: a guide to laboratory, portable and miniaturized instruments**. Chichester: John Wiley & Sons, 2007. Chap. 3, Part I, p. 65-124.
- 196 SHEVCHENKO, A.; VALCU, C.-M.; JUNQUEIRA, M. Tools for exploring the proteome. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 137-144, Mar. 2009.
- 197 NAGARAJ, N. et al. System-wide perturbation analysis with nearly complete coverage of the yeast proteome by single-shot ultra HPLC runs on a bench top orbitrap. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 3, p. 013722/1-013722/11, Mar. 2012.
- 198 VALLEDOR, L.; WECKWERTH, W. An improved detergent-compatible gel-fractionation LC-LTQ-Orbitrap-MS workflow for plant and microbial proteomics. In: JORRIN-NOVO, V. J. et al. (Ed.). **Plant proteomics: methods and protocols**. Totowa: Humana Press, 2014. p. 347-358.
- 199 PERKINS, D. N. et al. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v. 20, n. 18, p. 3551-3567, Dec. 1999.
- 200 TABB, D. L. et al. Statistical characterization of ion trap tandem mass spectra from doubly charged tryptic peptides. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 1155-1163, Mar. 2003.
- 201 ROEPSTORFF, P.; FOHLMAN, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. **Biomedical Mass Spectrometry**, v. 11, n. 11, p. 601, Nov. 1984.
- 202 JOHNSON, R. S. et al. Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 21, p. 2621-2625, Nov. 1987.
- 203 STEEN, H.; MANN, M. The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 9, p. 699-711, Sept. 2004.
- 204 SCHLOSSER, A.; LEHMANN, W. D. Five-membered ring formation in unimolecular reactions of peptides: a key structural element controlling low-energy collision-induced dissociation of peptides. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 35, n. 12, p. 1382-1390, Dec. 2000.
- 205 STEEN, H. et al. Detection of tyrosine phosphorylated peptides by precursor ion scanning quadrupole TOF mass spectrometry in positive ion mode. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1440-1448, Apr. 2001.
- 206 KLAMMER, A. A. et al. Modeling peptide fragmentation with dynamic Bayesian networks for peptide identification. **Bioinformatics**, v. 24, n. 13, p. i348-i356, July 2008.
- 207 WYSOCKI, V. H. et al. Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 35, n. 12, p. 1399-1406, Dec. 2000.
- 208 RIGDEN, D. J.; MELLO, L. V. de. Anotação funcional computacional de proteínas. **Biociência & Desenvolvimento**, v. 4, n. 25, p. 64-70, mar. 2002.

- 209 SÁNCHEZ-CABO, F. et al. insights into global mechanisms and disease by gene expression profiling. In: MAYER, B. (Ed.). **Bioinformatics for omics data: methods and protocols**. Totowa: Humana Press, 2011. p. 269-298.
- 210 PAWEŁKOWICZ, M. et al. The discrepancies in the results of bioinformatics tools for genomic structural annotation. **Proceedings of SPIE**, v. 9290, Nov. 2014. doi:10.1117/12.2074396.
- 211 ASHBURNER, M. et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, n. 1, p. 25-29, May 2000.
- 212 THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. Gene Ontology Consortium: going forward. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. Database issue, p. D1049-D1056, Jan. 2015.
- 213 UNIPROT CONSORTIUM. Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. Database issue, p. D71-D75, Jan. 2012.
- 214 ORCHARD, S.; HERMJAKOB, H. Shared resources, shared costs-leveraging biocuration resources. **Database: The Journal of Biological Databases and Curation**, v. 2015, Mar. 2015. doi:10.1093/database/bav009
- 215 MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, Apr. 1962.
- 216 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, May 1976.
- 217 GÖTZ, S. et al. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 10, p. 3420-3435, June 2008.
- 218 MURTHY, H. N.; LEE, E.-J.; PAEK, K.-Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 1-16, July 2014.
- 219 TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/237120652_Limitaes_ao_processo_de_cultivo_in_vitro_de_espcies_lenhosas>. Acesso em: 13 Dec. 2012.
- 220 FLORES, R. et al. Regeneração in vitro de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Current Agricultural Science and Technology**, v. 4, n. 3, p. 201-205, July 1998.
- 221 BASSAN, J. S. et al. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento in vitro de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, p. 381-390, dez. 2006.
- 222 SOUZA, F. V. D. et al. Micropropagação. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. (Ed.). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. Cap. 2, p. 38-50.
- 223 PEREIRA, A. M. S. et al. Pharmacologically active compounds in plant tissue culture of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Acta Horticulturae**, n. 333, p. 205-210, Nov. 1993.

224 PAZ, T. A. **Aplicação da biotecnologia na obtenção de triterpenos quinonametídeos bioativos utilizando *Salacia campestris* (Cambess.) Walp. (Celastraceae) como modelo.** 2011. 109 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

225 PATIL, R. A.; ROBERTS, S. C. Implications of cellular heterogeneity on plant cell culture performance. In: CHANDRA, S.; LATA, H.; VARMA, A. (Ed.). **Biotechnology for Medicinal Plants.** Berlin: Springer, 2013. Chap. 9, p. 207-239.

226 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **DOQ-CGCRE-008:** orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, revisão 03. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 5 maio 2010.

227 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº. 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 3 ago. 2014

228 CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 374-380, jun. 2001.

229 CUSTODIO, R.; ANDRADE, J. C. de; AUGUSTO, F. O ajuste de funções matemáticas a dados experimentais. **Química Nova**, v. 20, n. 2, p. 219-225, abr. 1997.

230 RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, out. 2004.

231 COPPEDE, J. da S. **Produção de triterpenos por processos biotecnológicos:** fonte potencial de medicamento anticâncer. 2013. 104 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2013.

232 KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; PRÁŠIL, I. T. Proteomics of stress responses in wheat and barley-search for potential protein markers of stress tolerance. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 711, Dec. 2014. doi:10.3389/fpls.2014.00711.

233 SHEKHAR, S. et al. Comparison of proteomic and metabolomic profiles of two contrasting ecotypes of sweetpotato (*Ipomoea batata* L.). **Journal of Proteomics**, v. 143, p. 306-317, June 2016.

234 SANTOS, A. A. dos. **Exploração de uma biblioteca genômica de *Passiflora edulis* f. flavicarpa por sequenciamento de BAC-ends.** 2013. 141 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

235 CORNISH-BOWDEN, A. Current IUBMB recommendations on enzyme nomenclature and kinetics. **Perspectives in Science**, v. 1, n. 1/6, p. 74-87, May 2014.

236 DAVID, L.; NELSON, M. M. C. **Lehninger principles of biochemistry.** 5th ed. New York: W. H. Freeman, 2008. 1158 p.

237 MOSS, G. P. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology.** 2016. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>>. Acesso em: 7 junho 2016.

- 238 SHI, J. et al. Enzymatic conversion of carbon dioxide. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 17, p. 5981-6000, June 2015.
- 239 MARTÍNEZ CUESTA, S.; RAHMAN, S. A.; THORNTON, J. M. Exploring the chemistry and evolution of the isomerases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 7, p. 1796-1801, Feb. 2016.
- 240 ASANO, Y.; HÖLSCH, K. Isomerizations. In: DRAUZ, K.; GRÖGER, H.; MAY, O. (Ed.). **Enzyme catalysis in organic synthesis**. 3rd ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2012. Chap. 39, p. 1607-1684.
- 241 HILTERHAUS, L.; LIESE, A. Industrial application and processes using isomerases. In: DRAUZ, K.; GRÖGER, H.; MAY, O. (Ed.). **Enzyme catalysis in organic synthesis**. 3rd ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2012. Chap. 10, p. 1685-1691.
- 242 SHAH, V. et al. Molecular analyses of microbial activities involved in bioremediation. In: SATYANARAYANA, T.; JOHRI, N. B. (Ed.). **microorganisms in environmental management: microbes and environment**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. Chap. 11, p. 221-247.
- 243 BANERJEE, S. et al. Bypass of aflatoxin B₁ adducts by the *Sulfolobus solfataricus* DNA polymerase IV. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 32, p. 12556-12568, July 2011.
- 244 DEWICK, P. M. The mevalonate and methylerythritol phosphate pathways: terpenoids and steroids. In: _____. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009. Chap. 5, p. 187-310.
- 245 VAN CUTSEM, E. et al. Gel-based and gel-free proteomic analysis of *Nicotiana tabacum* trichomes identifies proteins involved in secondary metabolism and in the (a)biotic stress response. **Proteomics**, v. 11, n. 3, p. 440-454, Feb. 2011.
- 246 PINA, E. S. et al. Mevalonate-derived quinonemethide triterpenoid from in vitro roots of *Peritassa laevigata* and their localization in root tissue by MALDI imaging. **Scientific Reports**, v. 6, Mar. 2016. doi:10.1038/srep22627
- 247 WENDT, K. U. Enzyme mechanisms for triterpene cyclization: new pieces of the puzzle. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 26, p. 3966-3971, June 2005.
- 248 PHILLIPS, D. R. et al. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 3, p. 305-314, June 2006.
- 249 ABE, I. Enzymatic synthesis of cyclic triterpenes. **Natural Product Reports**, v. 24, n. 6, p. 1311-1331, Aug. 2007.
- 250 WANG, Z. et al. Cloning and characterization of oxidosqualene cyclases from *Kalanchoe daigremontiana*: enzymes catalyzing up to 10 rearrangement steps yielding friedelin and other triterpenoids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 39, p. 29703-29712, Sept. 2010.
- 251 CHAMPAGNE, A. et al. In-depth proteome mining of cultured *Catharanthus roseus* cells identifies candidate proteins involved in the synthesis and transport of secondary metabolites. **Proteomics**, v. 12, n. 23/24, p. 3536-3547, Dec. 2012.

- 252 HERRMANN, K. M.; WEAVER, L. M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, n. 1, p. 473-503, June 1999.
- 253 GUO, J. et al. Molecular characterization of quinate and shikimate metabolism in *Populus trichocarpa*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 34, p. 23846-23858, Aug. 2014.
- 254 WEAVER, L. M.; HERRMANN, K. M. Dynamics of the shikimate pathway in plants. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 9, p. 346-351, Sept. 1997.
- 255 DEWICK, P. M. The biosynthesis of shikimate metabolites. **Natural Product Reports**, v. 12, n. 6, p. 579-607, Dec. 1995.
- 256 WILDERMUTH, M. C. et al. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. **Nature**, v. 414, n. 6863, p. 562-565, Nov. 2001.
- 257 YAMAZAKI, M. et al. Coupling deep transcriptome analysis with untargeted metabolic profiling in *Ophiorrhiza pumila* to further the understanding of the biosynthesis of the anti-cancer alkaloid camptothecin and anthraquinones. **Plant & Cell Physiology**, v. 54, n. 5, p. 686-696, May 2013.
- 258 VOGT, T. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular Plant**, v. 3, n. 1, p. 2-20, Jan. 2010.
- 259 HARAKAVA, R. Genes encoding enzymes of the lignin biosynthesis pathway in *Eucalyptus*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 3, p. 601-607, Mar. 2005. Suppl.
- 260 KUTSUKI, H.; SHIMADA, M.; HIGUCHI, T. Regulatory role of cinnamyl alcohol dehydrogenase in the formation of guaiacyl and syringyl lignins. **Phytochemistry**, v. 21, n. 1, p. 19-23, Dec. 1982.
- 261 DENG, W.-W. et al. Molecular cloning, functional analysis of three cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) genes in the leaves of tea plant, *Camellia sinensis*. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, n. 3, p. 272-282, Feb. 2013.
- 262 RALPH, J. et al. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, n. 1/2, p. 29-60, Jan. 2004.
- 263 KOUTANIEMI, S. et al. Characterization of basic p-coumaryl and coniferyl alcohol oxidizing peroxidases from a lignin-forming *Picea abies* suspension culture. **Plant Molecular Biology**, v. 58, n. 2, p. 141-157, May 2005.
- 264 SASAKI, S. et al. The cationic cell-wall-peroxidase having oxidation ability for polymeric substrate participates in the late stage of lignification of *Populus alba* L. **Plant Molecular Biology**, v. 62, n. 6, p. 797-807, Dec. 2006.
- 265 MESSNER, B.; BOLL, M. Elicitor-mediated induction of enzymes of lignin biosynthesis and formation of lignin-like material in a cell suspension culture of spruce (*Picea abies*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 34, n. 3, p. 261-269, Mar. 1993.
- 266 NEGREL, J.; JAVELLE, F. Induction of phenylpropanoid and tyramine metabolism in pectinase- or pronase-elicited cell suspension cultures of tobacco (*Nicotiana tabacum*). **Physiologia Plantarum**, v. 95, n. 4, p. 569-574, Dec. 1995.

- 267 WENG, J.-K.; CHAPPLE, C. The origin and evolution of lignin biosynthesis. **New Phytologist**, v. 187, n. 2, p. 273-285, July 2010.
- 268 BARROS, J. et al. The cell biology of lignification in higher plants. **Annals of Botany**, v. 115, n. 7, p. 1053-1074, Apr. 2015.
- 269 LIU, M.-H. et al. Transcriptome analysis of leaves, roots and flowers of *Panax notoginseng* identifies genes involved in ginsenoside and alkaloid biosynthesis. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, Apr. 2015. doi:10.1186/s12864-015-1477-5.
- 270 GEORGIEV, V. et al. Plant in vitro systems as sources of tropane alkaloids. In: RAMAWAT, G. K.; MÉRILLON, J.-M. (Ed.). **Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes**. Berlin: Springer Berlin, 2013. p. 173-211.
- 271 DIEBOLD, R. et al. The branched-chain amino acid transaminase gene family in *Arabidopsis* encodes plastid and mitochondrial proteins. **Plant Physiology**, v. 129, n. 2, p. 540-550, June 2002.
- 272 RIZHSKY, L. et al. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. **Plant Physiology**, v. 134, n. 4, p. 1683-1696, Apr. 2004.
- 273 MALATRASI, M. et al. A branched-chain amino acid aminotransferase gene isolated from *Hordeum vulgare* is differentially regulated by drought stress. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 113, n. 6, p. 965-976, Oct. 2006.
- 274 PLAXTON, W. C. The regulation and organization of plant glycolysis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 185-214, June 1996.
- 275 BLAKELEY, S. D. et al. Isolation of a full-length cDNA encoding cytosolic enolase from *Ricinus communis*. **Plant Physiology**, v. 105, n. 1, p. 455-456, May 1994.
- 276 FORSTHOEFEL, N. R.; CUSHMAN, M. A.; CUSHMAN, J. C. Posttranscriptional and posttranslational control of enolase expression in the facultative crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. **Plant Physiology**, v. 108, n. 3, p. 1185-1195, July 1995.
- 277 LAL, S. K.; LEE, C.; SACHS, M. M. Differential regulation of enolase during anaerobiosis in maize. **Plant Physiology**, v. 118, n. 4, p. 1285-1293, Dec. 1998.
- 278 FOX, T. C. et al. Identification and gene expression of anaerobically induced enolase in *Echinochloa phyllopogon* and *Echinochloa crus-gavonis*. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 433-443, Oct. 1995.
- 279 VOLL, L. M. et al. Antisense inhibition of enolase strongly limits the metabolism of aromatic amino acids, but has only minor effects on respiration in leaves of transgenic tobacco plants. **The New Phytologist**, v. 184, n. 3, p. 607-618, Nov. 2009.
- 280 RADAKOVITS, R. et al. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 4, p. 486-501, Apr. 2010.

281 CAHOON, E. B. et al. Redesign of soluble fatty acid desaturases from plants for altered substrate specificity and double bond position. **Proceedings of the National Academy of Sciences in the United States of America**, v. 94, n. 10, p. 4872-4877, May 1997.

282 YANG, Q.-S. et al. Comparative transcriptomics analysis reveals difference of key gene expression between banana and plantain in response to cold stress. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, 2015. doi:10.1186/s12864-015-1551-z.

283 REN, L. et al. A transcriptomic analysis of *Chrysanthemum nankingense* provides insights into the basis of low temperature tolerance. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, Oct. 2014. doi:10.1186/1471-2164-15-844.

284 HUANG, C. et al. CIPK7 is involved in cold response by interacting with CBL1 in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, v. 181, n. 1, p. 57-64, July 2011.

285 DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 212-228, Jan. 2015.