

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA

**João Paulo de Oliveira Nora**

**Análise metabolômica de *Saccharomyces cerevisiae* superexpressando a  
enzima friedelina sintase heteróloga para produção de metabólitos de  
interesse biológico e comercial.**

Araraquara  
2018

JOÃO PAULO DE OLIVEIRA NORA

**Análise metabolômica de *Saccharomyces cerevisiae* superexpressando a enzima friedelina sintase heteróloga para produção de metabólitos de interesse biológico e comercial.**

Dissertação de Mestrado apresentada no Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maysa Furlan

Araraquara  
2018

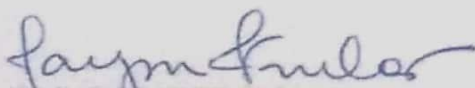
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Análise metabolômica de *Saccharomyces cerevisiae* superexpressando a enzima friedelina sintase heteróloga para produção de metabólitos de interesse biológico e comercial"

AUTOR: JOÃO PAULO DE OLIVEIRA NORA

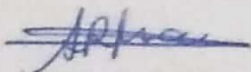
ORIENTADORA: MAYSA FURLAN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



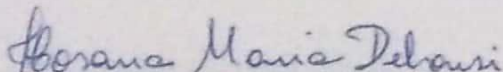
Prof.ª. Dr.ª. MAYSA FURLAN

Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof.ª. Dr.ª. ANGELA REGINA ARAUJO

Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof.ª. Dr.ª. HOSANA MARIA DEBONSI

Departamento de Física e Química / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Ribeirão Preto

Araraquara, 30 de outubro de 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

N822a Nora, João Paulo de Oliveira  
Análise metabolômica de *Saccharomyces cerevisiae*  
superexpressando a enzima friedelina sintase heteróloga para a  
produção de metabólitos de interesse biológico e comercial / João  
Paulo de Oliveira Nora. – Araraquara : [s.n.], 2018  
70 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química  
Orientador: Maysa Furlan

1. Espinheira Santa. 2. *Saccharomyces cerevisiae*.  
3. Transplante heterólogo. 4. Terpenos. 5. Metabolômica. I. Título.

## DADOS CURRICULARES

João Paulo de Oliveira Nora

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

Endereço: Rua Dr. Francisco Degni 55, CEP 14800-060, Araraquara/SP, Brasil.

E-mail: [joao\\_paulo\\_140@hotmail.com](mailto:joao_paulo_140@hotmail.com)

### Formação Acadêmica.....

#### 2018 – 2016 **Mestrado em Química**

- Área de Concentração: Química Orgânica
- Instituto de Química de Araraquara (IQ-UNESP)
- Projeto: Análise metabolômica
- Agência financiadora: CAPES
- Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maysa Furlan ([mayfurlan@gmail.com](mailto:mayfurlan@gmail.com))

#### 2018 **Licenciatura em Química para bacharéis**

- Instituição: Uniplena Educacional – Polo Campinas

#### 2015 – 2014 **Iniciação Científica**

- Instituto de Química de Araraquara (IQ-UNESP)
- Projeto: Contribuição aos estudos biossintéticos do ácido gaudichaudiânico isolado de *Piper gaudichaudianum*: isolamento e epoxidação do ácido mircinóico
- Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maysa Furlan ([mayfurlan@gmail.com](mailto:mayfurlan@gmail.com))

#### 2012 – 2015 **Bacharelado em Química**

- Instituição: Instituto de Química de Araraquara (IQ-UNESP)

### Experiências Didáticas.....

#### 2018 **Estágio supervisionado (300 horas)**

- Disciplina: Química

- Disciplina: Matemática
- Série: 6º ao 9º ano (150 horas); Ensino médio (150 horas)

#### 2017 **Estágio Docência**

- Disciplina: Química Orgânica I
- Aulas ministradas:
- Curso: Farmácia-Bioquímica
- Supervisora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Isabele Rodrigues Nascimento  
([isabnasc@iq.unesp.br](mailto:isabnasc@iq.unesp.br))

#### **Participação em Eventos Científicos**.....

2017 Pôster. 6<sup>th</sup> Brazilian Conference on Natural Products – BCNP and XXXIII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology – RESEM. Vitória/ES, Brasil

#### **Idiomas**.....

- Inglês (avançado)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por minha vida e por estar sempre ao meu lado, dando-me forças para superar as dificuldades.

Agradeço aos meus pais, Antonio Paulo Nora e Odete Maria de Oliveira Nora pelo apoio, carinho, compreensão e amor incondicional ao longo de toda minha vida. Vocês fizeram o homem que sou hoje, sempre me educando e aconselhando.

À toda minha família, pelo alicerce em minha vida.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maysa Furlan, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela valiosa orientação, por todos os conselhos e ensinamentos, mas em especial pela amizade e paciência.

À minha namorada e melhor amiga, Jéssica Ospedal, a quem muito admiro, por todo o amor, carinho e paciência. Por ser um pouco da luz que melhora minha vida, me ajudando e incentivando sempre em todos os momentos.

Ao Instituto de Química da UNESP Araraquara, as experiências, conhecimentos e, principalmente, amizades e memórias ganhas ao longo de minha caminhada aqui, são parte importante da pessoa que sou hoje.

À CAPES pela bolsa concedida e ao CNPq e FAPESP pelo suporte.

A meus amigos que fiz durante a vida, estejam onde estiverem, vocês sempre estarão em meu coração independente de quanto tempo se passe e da situação.

Aos amigos do NuBBE e do laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela amizade e parceria, em especial, Melissa Remlinger, Bianca Rodrigues e Bruna Mazzeo pela ajuda e apoio durante a execução do trabalho.

Aos técnicos João Bronzel e Juliana Rodrigues pela amizade, conselhos e colaboração durante os experimentos.

Aos meus queridos professores, os quais me auxiliaram a construir a pessoa que sou, em especial, meus professores de química do ensino médio, os quais admiro e me inspiro.

A todos que contribuíram para minha educação formal e informal e que de algum modo, contribuíram para tornar esse momento possível.

“A man is a success if he gets up in the morning and gets to bed at night, and in between he does what he wants to do”

-Bob Dylan



## RESUMO

As espécies das famílias Celastraceae mostram o acúmulo de substâncias de interesse biológico, com destaque para a friedelina, com potentes efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e gastroprotetores, e os triterpenos quinonametídeos, promissores agentes antitumorais. Entretanto, para que sejam utilizados como fármacos, novas metodologias e/ou técnicas para obtenção dos mesmos em larga escala se fazem necessárias. Nesse contexto, um sistema heterólogo composto pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foi modificado geneticamente com a inserção de plasmídeos (vetores) contendo genes oriundos de *Maytenus ilicifolia* que codificam a enzima friedelina sintase, a qual leva a produção de friedelina. A introdução dos genes heterólogos pode perturbar as vias metabólicas do sistema heterólogo e, além do metabólito alvo, outras classes e/ou substâncias de interesse biológico e/ou comercial podem ser produzidas. Para tanto, as leveduras foram cultivadas em meio sintético completo (0,67% de base para levedura nitrogenada sem adição de aminoácidos e 2% de glicose), suplementado com aminoácidos, bases e ácido *p*-aminobenzóico, sem adição de uracila. Para os estudos de variabilidade metabólica, análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas foram realizadas utilizando os extratos etanólicos, clorofórmicos e hexânicos obtidos do sistema heterólogo com e sem modificação genética. Com o auxílio de técnicas metabolômicas foi possível a identificação de uma variedade de substâncias incluindo diversos ácidos graxos e derivados de **1** a **5**, além de amidas, como a (Z)-9-ocatadecenamida (**7**), precursores de terpenóides, como o esqualeno (**8**) e 2,3-oxidoesqualeno (**10**), os triterpenos; friedelina (**21**) e lupeol (**15**), e também os esteróides ergosterol (**14**) e lanosterol (**19**). Devido às perturbações na via metabólica do mevalonato, diferentes substâncias também foram observadas, tanto nas leveduras com o vetor vazio, plasmídeo considerado como branco, quanto naquelas com o vetor codificador de friedelina sintase. Dentre esses, estão o geranilgeraniol (**6**), licopeno (**9**), (3 $\beta$ ,22E)-ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol (**11**), ergosta-4,7,22-trien-3 $\alpha$ -ol (**12**), 3 $\beta$ -26,27-dinorergost-5-ene-3,24-diol (**13**), 3 $\beta$ -ergosta-5,8-dien-3-ol (**16**), 3 $\beta$ -33-norgorgosta-5,24(28)-dien-3-ol (**17**),  $\gamma$ -clionasterol (**18**) e 3 $\beta$ -4,4-dimetilcolest-5-en-3-ol (**20**).

**Palavras-chave:** *Maytenus ilicifolia*, *Saccharomyces cerevisiae*, sistema heterólogo, friedelina sintase, metabolômica.

## ABSTRACT

The species of the Celastraceae family shows the accumulation some compounds of biological interest, with emphasis on friedelin, with potent anti-inflammatory, analgesic and gastroprotective effects, as well as quinonemethide triterpenes, promising antitumor agents. However, in order to be used as drugs, new methodologies and / or techniques for obtaining them in large scale are necessary. In this way, a heterologous system of *Saccharomyces cerevisiae* yeast was genetically modified with the insertion of plasmids (vectors) containing genes from *Maytenus ilicifolia* that encode the enzyme friedelin synthase, looking for the production of friedelin by metabolic engineering. The introduction of the heterologous genes may disrupt the metabolic pathways of the heterologous system and, in addition to the target metabolite, other classes and / or compounds of biological and / or commercial interest may be produced. For this, yeasts were grown in complete synthetic medium (0.67% yeast nitrogen base without addition of amino acids and 2% glucose), supplemented with amino acids, bases and *p*-aminobenzoic acid, without addition of uracil. For metabolic variability studies, gas chromatographic analysis coupled with mass spectrometry were performed using ethanolic, chloroform and hexane extracts, obtained from the heterologous system with and without genetic modification. With the aid of metabolomic techniques it was possible to identify a variety of substances including various fatty acids and derivatives from **1** to **5**, as well as amides, such as (*Z*)-9-ocatadecenamide (**7**), terpenoid precursors such as squalene (**8**) and 2,3-oxidosesqualene (**10**), the triterpenes; friedelin (**21**) and lupeol (**15**), and also steroids ergosterol (**14**) and lanosterol (**19**). Due to perturbations in metabolic pathway of mevalonate, different substances were also observed, both in yeasts with the empty vector, plasmid considered as control, and in those with the vector coding for friedelin synthase. Among these, geranylgeraniol (**6**), lycopene (**9**), (3 $\beta$ ,22E)-ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol (**11**), ergost-4,7,22-trien-3 $\alpha$ -ol (**12**), 3 $\beta$ -26,27-dinorergost-5-ene-3,24-diol (**13**), 3 $\beta$ -ergostat-5,8-dien-3-ol (**16**), 3 $\beta$ -33-norgorgosta-5,24(28)-dien-3-ol (**17**),  $\gamma$ -clionasterol (**18**) and 3 $\beta$ -4,4-dimethylcholest-5-en-3-ol (**20**).

**Key words:** *Maytenus ilicifolia*, *Saccharomyces cerevisiae*, heterologous system, friedelin synthase, metabolomics.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais blocos construtores envolvidos na biossíntese dos metabólitos secundários.....	17
Figura 2 – Rotas biossintéticas para a produção de terpenóides.....	18
Figura 3 – Produção de esteroides e triterpenos esteroidais em plantas, leveduras e mamíferos a partir da ciclização do 2,3-oxidoesqualeno.....	20
Figura 4 – Triterpenos, tetra- e pentacíclicos, biossintetizados em espécies vegetais a partir da ciclização do 2,3-oxidoesqualeno.....	21
Figura 5 - Estruturas químicas da friedelina e triterpenos quinonametídeos.....	23
Figura 6 – Correlações entre os objetos de estudo das ciências ômicas.....	25
Figura 7 – Modificações genéticas da via de produção de ergosterol em levedura favorecendo a produção de friedelina. ....	28
Figura 8 – Estruturas químicas das substâncias identificadas nos extratos clorofórmicos, etanólicos e hexânicos das leveduras pela análise por CG-EM.....	37
Figura 9 - Cromatograma (CG-EM) do extrato clorofórmico da levedura com plasmídeo vazio. *(Condições de análise: Tinjeção: 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.); Ttrap: 270 °C por 4 min.; Vinjeção: 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.) .....	38
Figura 10 – Espectro de massas de 8.....	39
Figura 11 – Proposta de fragmentação de 8.....	39
Figura 12 – Espectro de massas de 14.....	40
Figura 13 - Proposta de fragmentação de 14.....	40
Figura 14 – Espectro de massas de 18.....	41
Figura 15 - Proposta de fragmentação de 18.....	41
Figura 16 - Cromatograma (CG-EM) do extrato clorofórmico da levedura com plasmídeo com genes de friedelina sintase. *(Condições de análise: Tinjeção: 270,0 °C; R rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.); Ttrap: 270 °C por 4 min.; Vinjeção: 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.) .....	42
Figura 17 – Cromatograma ampliado (CG-EM) do extrato clorofórmico da levedura com plasmídeo com genes de friedelina sintase. *(Condições de análise: Tinjeção: 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.); Ttrap: 270 °C por 4 min.; Vinjeção: 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.) .....	42

Figura 18 – Espectro de massas de 9.....	43
Figura 19 - Proposta de fragmentação de 9.....	43
Figura 20 – Espectro de massas de 10.....	44
Figura 21 – Proposta de fragmentação de 10.....	44
Figura 22 – Espectro de massas de 15.....	45
Figura 23 – Proposta de fragmentação de 15.....	45
Figura 24 – Espectro de massas de 19.....	46
Figura 25 - Proposta de fragmentação de 19.....	46
Figura 26 – Espectro de massas de 20.....	47
Figura 27 - Proposta de fragmentação de 20.....	47
Figura 28 – Espectro de massas de 21.....	48
Figura 29 - Proposta de fragmentação de 21.....	48
Figura 30 – Comparação dos perfis cromatográficos dos extratos clorofórmicos da levedura contendo os plasmídeos vazios e com os genes de friedelina sintase. *(Condições de análise: $T_{injeção}$ : 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.); $T_{trap}$ : 270 °C por 4 min.; $V_{injeção}$ : 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.) .....	49
Figura 31 - Cromatograma (CG-EM) do extrato etanólico da levedura com plasmídeo vazios. *(Condições de análise: $T_{injeção}$ : 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.); $T_{trap}$ : 270 °C por 4 min.; $V_{injeção}$ : 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.) .....	50
Figura 32 - Cromatograma (CG-EM) do extrato etanólico da levedura com plasmídeo com genes de friedelina sintase. *(Condições de análise: $T_{injeção}$ : 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.); $T_{trap}$ : 270 °C por 4 min.; $V_{injeção}$ : 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.) .....	51
Figura 33 – Cromatograma ampliado (CG-EM) do extrato etanólico da levedura com plasmídeo com genes de friedelina sintase. *(Condições de análise: $T_{injeção}$ : 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.); $T_{trap}$ : 270 °C por 4 min.; $V_{injeção}$ : 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.) .....	51
Figura 34 – Espectro de massas de 6.....	52
Figura 35 - Proposta de fragmentação de 6.....	52
Figura 36 - Comparação dos perfis cromatográficos dos extratos etanólicos da levedura contendo os plasmídeos vazios e com os genes de friedelina sintase. *(Condições de análise: $T_{injeção}$ : 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3	

°C/min.); T <sub>trap</sub> : 270 °C por 4 min.; V <sub>injeção</sub> : 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.)	53
.....	53
Figura 37 – Comparação dos perfis cromatográficos (CG-EM) dos extratos da levedura contendo os plasmídeos vazios e com os genes de friedelina sintase nos diferentes solventes. *(Condições de análise: T <sub>injeção</sub> : 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.); T <sub>trap</sub> : 270 °C por 4 min.; V <sub>injeção</sub> : 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.)	53
.....	53
Figura 38 - Comparação entre os tempos de retenção do padrão de friedelina e dos extratos da levedura produtora de friedelina nos diferentes solventes. *(Condições de análise: T <sub>injeção</sub> : 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.); T <sub>trap</sub> : 270 °C por 4 min.; V <sub>injeção</sub> : 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.)	54
.....	54
Figura 39 – Ampliação do cromatograma (CG-EM) comparando os tempos de retenção da friedelina no padrão e nos extratos nos diferentes solventes da levedura transformada. *(Condições de análise: T <sub>injeção</sub> : 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.); T <sub>trap</sub> : 270 °C por 4 min.; V <sub>injeção</sub> : 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.)	54
.....	54
Figura 40 - PCA dos cromatogramas (CG-EM) a partir dos extratos <i>S. cerevisiae</i> produtora de friedelina.	56
.....	56
Figura 41 - Cromatograma (CG-EM) do extrato hexânico da levedura com plasmídeo com genes de friedelina sintase. *(Condições de análise: T <sub>injeção</sub> : 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.); T <sub>trap</sub> : 270 °C por 4 min.; V <sub>injeção</sub> : 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.)	56
.....	56
Figura 42 – Espectro de massas de 13.	57
.....	57
Figura 43 - Proposta de fragmentação de 13.	57
.....	57
Figura 44 – Espectro de massas de 16.	58
.....	58
Figura 45 - Proposta de fragmentação de 16.	58
.....	58
Figura 46 – Espectro de massas de 17.	59
.....	59
Figura 47 - Proposta de fragmentação de 17.	59
.....	59
Figura 48 - Superfície de resposta gerada a partir dos dados obtidos nos experimentos de otimização das condições de extração.	60
.....	60
Figura 49 - Comparação dos perfis cromatográficos (CG-EM) dos extratos da levedura contendo os plasmídeos vazios e com os genes de friedelina sintase nos diferentes solventes. *(Condições de análise: T <sub>injeção</sub> : 270,0 °C; Rampa de	

aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.); T <sub>trap</sub> : 270 °C por 4 min.; V <sub>injeção</sub> : 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.) .....	61
Figura 50 - Mapa metabólico de produção de triterpenos e esteróides na levedura transformada. ....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Etapas e parâmetros usados durante o procedimento de seleção automática de picos pelo MzMine 2.28. ....	35
Tabela 2 – Experimentos realizados no planejamento fatorial completo.....	36
Tabela 3 – Substâncias majoritárias (Figura 8) identificadas no extrato clorofórmico da levedura vazia. ....	39
Tabela 4 – Substâncias identificadas (Figura 8) no extrato clorofórmico da levedura com plasmídeo com genes de friedelina sintase.....	43
Tabela 5 - Substâncias identificadas (Figura 8) no extrato etanólico da levedura vazia.....	50
Tabela 6 – Substâncias identificadas (Figura 8) no extrato etanólico da levedura produtora de friedelina. ....	52
Tabela 7 - Substâncias exclusivamente identificadas (Figura 8) no extrato hexânico da levedura produtora de friedelina.....	56
Tabela 8 - Área dos picos de ergosterol nos experimentos do planejamento fatorial para o solvente hexano. ....	60

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Metodologia utilizada para a transformação das leveduras. ....	32
Esquema 2 – Metodologia utilizada para a expressão heteróloga dos mutantes em <i>S. cerevisiae</i> . ....	33
Esquema 3 – Metodologias utilizadas para a extração dos produtos gerados.....	34

## LISTA DE ABREVIÇÕES

- (%) – porcentagem de similaridade fornecida pelo software
- (Cálc.) – Valores calculados
- (Lit.) – Valores obtidos na literatura
- AcOEt – acetato de atila
- BHT – 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol
- CG – cromatografia gasosa
- CG-EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
- DMAPP – pirofosfato de dimetilalila
- DMC – 2',6'-diidroxí-4'-metoxichalcona
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- EM – espectrometria de massas
- EtOH - etanol
- Erro (%) – erro entre os índices de retenção calculados e da literatura
- FDA – *Food and Drug Administration*
- FFPP – pirofosfato de farnesil farnesila
- FGPP – pirofosfato de farnesil geranila
- FPP – pirofosfato de farnesila
- GGPP – pirofosfato de geranilgeranila
- GPP – pirofosfato de geranila
- Hex – hexano
- HL-60 – Linhagem celular de leucemia humana
- HMG-CoA – enzima 3-hidroxí-3-metilglutaril-coenzima A redutase
- HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência
- HT93A – Linhagem celular promielocítica aguda de leucemia
- IPP – pirofosfato de isopentenila
- IR – índice de retenção
- LM3 – Linhagem de adenocarcinoma de mama murino
- LP07 – Linhagem de adenocarcinoma de pulmão murino
- m/z* – Razão massa/carga
- MEP – via biossintética do metileritriol
- MiFRS – genes codificadores de friedelina sintase obtidos a partir de *Maytenus ilicifolia*
- min – minutos
- MVA – via biossintética do mevalonato
- n.e. – não encontrado
- NB4 – Linhagem celular promielocítica aguda de leucemia
- NIST – *National Institute of Standards and Technology*
- Ø – plasmídeo sem os genes codificadores de friedelina sintase
- OP – Fosfato

**OSCs** – enzimas oxidoesqualeno ciclases

**PCA** – Análise de Componentes Principais

**PEG** – polietilenoglicol

**ppm** – partes por milhão

**RNA** – ácido ribonucleico

**rpm** – rotações por minuto

**SC- URA** – meio de cultura seletivo sólido, sem a adição de uracila

**STZ** – estreptozotocina

**t<sub>R</sub>** – tempo de retenção

**W/O** – *without*

**YNB** – *Yeast Nitrogen Base*, meio de cultura completo composto por 0,67% de base para levedura nitrogenada sem adição de aminoácidos e 2% de glicose

**YNB- URA** – meio de cultura seletivo líquido, sem a adição de uracila

**YPD** – *Yeast Peptone Dextrose*, meio de cultura completo composto por 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1	Metabolismos primário e secundário.....	16
1.2	Triterpenóides: biossíntese e atividade biológica .....	17
1.3	Friedelina e os triterpenos quinonametídeos .....	22
1.4	Biologia sintética .....	24
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
3.1	Microrganismos e plasmídeos.....	30
3.2	Cromatografia .....	30
3.3	Solventes .....	30
3.4	Reagentes.....	30
3.5	Outro Equipamentos .....	30
<b>4</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>32</b>
4.1	Transformação dos mutantes em levedura .....	32
4.2	Expressão heteróloga dos mutantes em <i>S. cerevisiae</i> .....	33
4.3	Extração dos produtos gerados .....	33
4.4	Análise dos produtos gerados.....	36
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Civilizações antigas como chinesas, egípcias, hindus e gregas utilizavam espécies vegetais na cura de doenças desde o século 30 a.C. Foram encontrados documentos datados e registrados que relataram que desde essa época plantas eram utilizadas com finalidade farmacológica (BARTON; NAKANISHI, 1999; BARREIRO; BOLZANI, 2009; BOLZANI et al., 2012; BERLINCK et al., 2017). Dentre as aplicações destaca-se o uso como condimentos, flavorizantes, fragrâncias, inseticidas, herbicidas e fármacos (CROTEAU; KUTCAHN; LEWIS, 2000). Apesar do avanço do tempo e do conhecimento científico, estima-se que, aproximadamente, oito por cento da população atual do planeta depende de terapias alternativas, a base de plantas, e, na atualidade, cerca de 70000 espécies de plantas são utilizadas como medicamentos. Além disso, com a evolução das técnicas de síntese orgânica, diversas substâncias bioativas isoladas de plantas puderam ser sintetizadas, de forma que de todas os novos fármacos aprovados no período de 1981 a 2014, cerca de dois terços desses são originários ou derivados de fontes naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016). Assim, cada uma dessas espécies contém componentes ativos que as conferem propriedades medicinais. (DANIEL, 2006; BARREIRO; BOLZANI, 2009; BOLZANI et al., 2012).

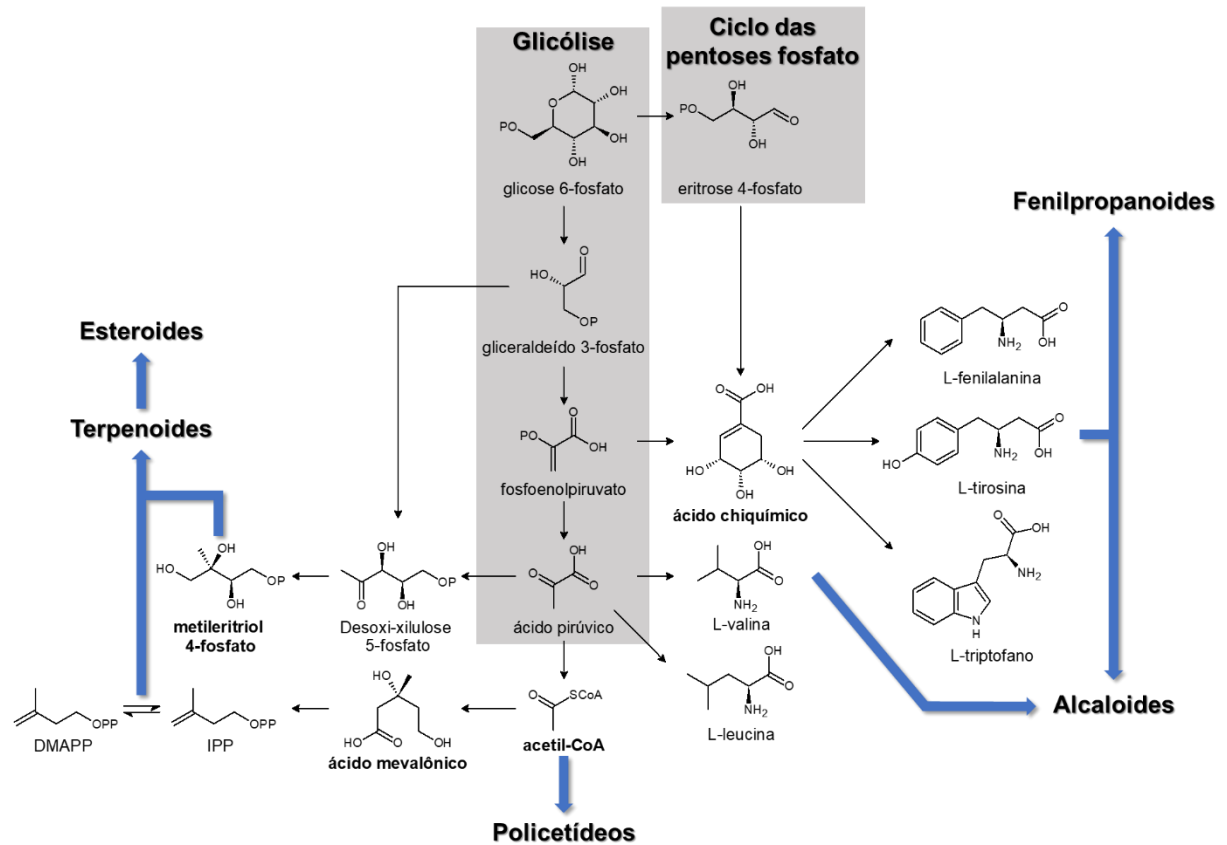
### 1.1 Metabolismos primário e secundário

Todos os seres vivos necessitam sintetizar uma diversidade de substâncias para sobreviver e, apesar das diferenças morfológicas entre eles, fundamentalmente utilizam-se de uma mesma rede de reações químicas, denominada de rotas metabólicas. Algumas dessas substâncias são essenciais para a manutenção da vida e são produzidas a partir do metabolismo primário, processos como a fotossíntese e a respiração celular. Em contrapartida, há também algumas rotas metabólicas que origina substâncias que não possuem esse caráter universal e, recebem o nome de metabolismo secundário. Esses metabólitos secundários desempenham papel importante quanto a interação das plantas e microrganismos com o meio ambiente, como mecanismos de defesa ou para auxiliar na reprodução. Em meio a fabulosa diversidade desses produtos naturais, muitos apresentam atividades farmacológicas (DEWICK, 2009).

Além de fornecer as substâncias para a conservação da vida dos organismos, o metabolismo primário também é responsável por prover os blocos construtores

para a produção dos metabólitos secundários. A partir de alguns precursores, como a acetil coenzima A (acetil-CoA), o ácido chiquímico, ácido mevalônico e a desoxi-xilulose fosfato, podem ser produzidos uma grande variedade de produtos naturais, como observado na Figura 1 (DEWICK, 2009).

**Figura 1** – Principais blocos construtores envolvidos na biossíntese dos metabólitos secundários.



Fonte: adaptado de DEWICK, 2009.

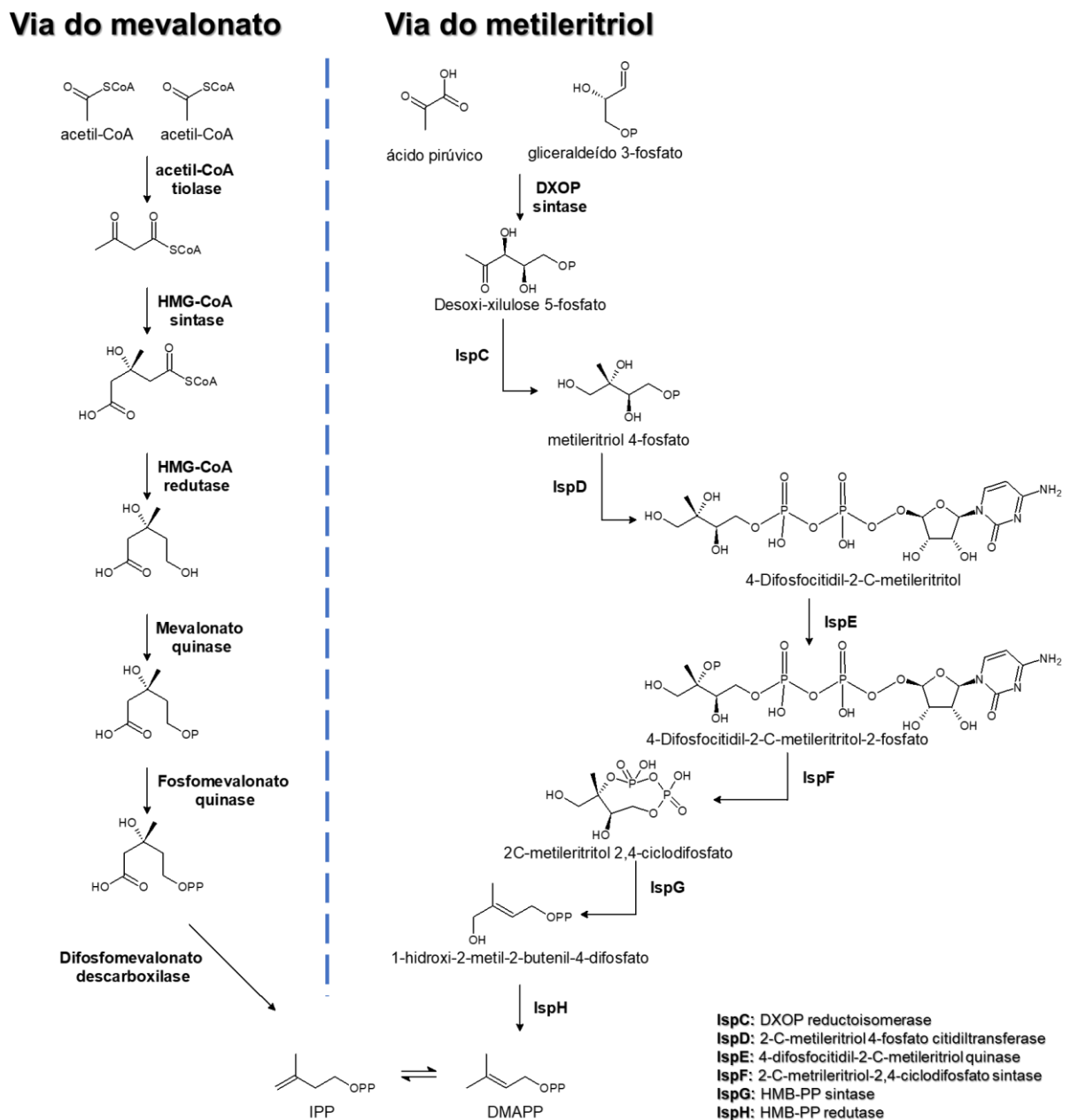
## 1.2 Triterpenóides: biossíntese e atividade biológica

Dentre as várias classes de metabólitos secundários, os terpenóides, ou isoprenóides, se destacam devido a sua grande diversidade estrutural e compõem um universo de cerca de 64.000 substâncias conhecidas, se configurando em uma das mais expressivas classes de substâncias produzidas por plantas (ABDALLAH; QUAX, 2017).

A biossíntese dos terpenóides é rigidamente controlada em plantas e desempenham diversas funções no crescimento e desenvolvimento das mesmas, e muitas vezes a biossíntese é disparada, como resposta a fatores ambientais bióticos e abióticos (THOLL, 2006; VRANOVÁ; COMAN; GRUISSEM; 2012). A partir de apenas dois blocos construtores com cinco carbonos cada, os éteres fosfato derivados do isopreno, pirofosfato de isopentenila (IPP) e o pirofosfato de dimetilalila

(DMAPP), oriundos de duas possíveis rotas metabólicas, a **via do mevalonato (MVA)** ou da **via do metileritriol (MEP)**. A via do mevalonato, presente em todos os organismos eucariotos, é composta basicamente por sete reações enzimáticas que convertem a acetil-CoA em IPP e DMAPP no citosol. Já a via do metileritriol tem como precursor o piruvato e o gliceraldeído 3-fosfato, que através de oito reações enzimáticas fornecem os precursores dos terpenos nos plastídios (Figura 2) (DEWICK, 2009; ABDALLAH; QUAX, 2017).

**Figura 2 –** Rotas biossintéticas para a produção de terpenóides.

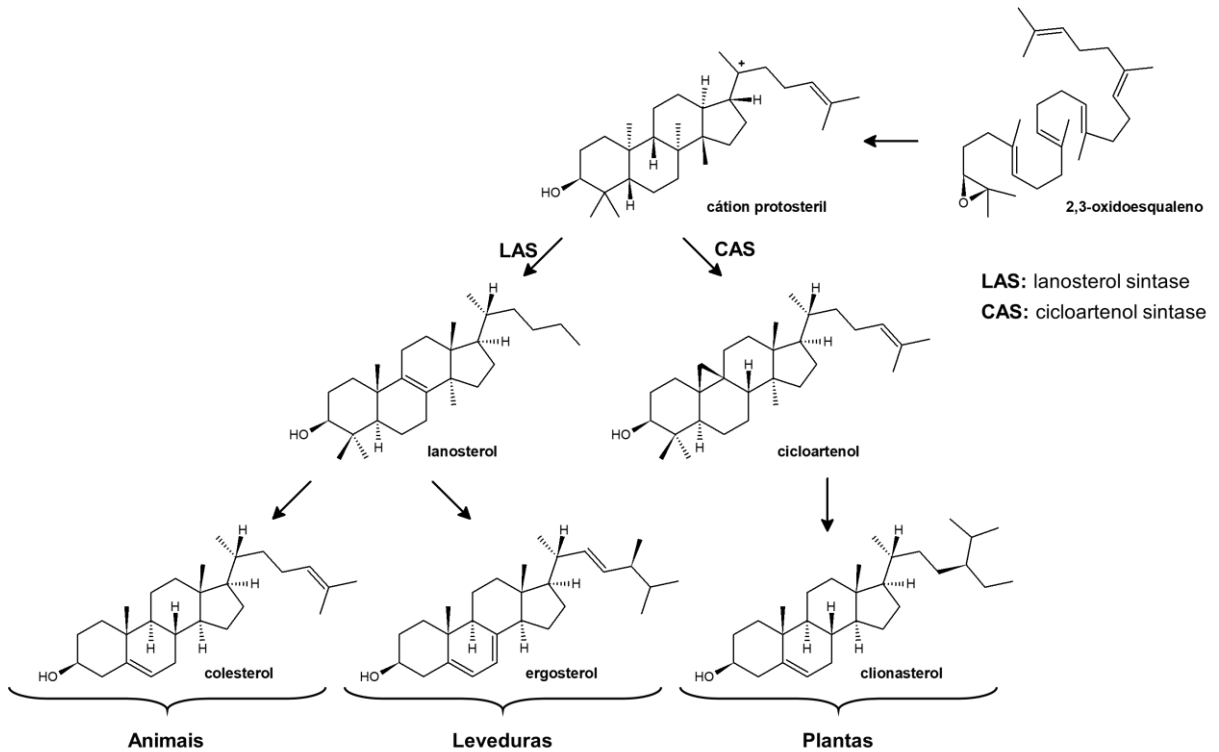


Fonte: adaptado de ABDALLAH; QUAX, 2017

Reações de condensação do tipo cabeça-cauda e rearranjos das unidades de IPP e DMAPP levam a produção de blocos construtores das diferentes classes de terpenóides, como o pirofosfato de geranila (GPP), o pirofosfato de farnesila (FPP), pirofosfato de geranilgeranila (GGPP) (THOLL, 2015) e o pirofosfato de geranilfarnesila (GFPP) (NAGEL et al, 2015). Esses, por sua vez, a partir de ciclizações pela ação das enzimas terpeno sintases, biossintetizam os terpenóides cíclicos, incluindo monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>), sesterterpenos (C<sub>25</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>) e tetraterpenos (C<sub>40</sub>).

Em especial, tanto os triterpenos quanto os esteroides são biossintetizados a partir dos mesmos precursores. Após a produção do pirofosfato de farnesila (FPP) no citosol, há uma nova condensação entre duas dessas unidades produzindo o esqualeno. Contudo, para as subseqüentes ciclizações enzimáticas, o esqualeno é convertido em 2,3-epoxidoesqualeno e, só então, as enzimas oxidoesqualeno ciclases (OSCs) iniciam uma cadeia de ciclizações. Essa classe de enzimas pode ser produto-específicas ou multifuncional, levando à formação de uma grande diversidade de substâncias naturais devido também a possibilidade de gerar diferentes conformações do substrato (YUAN-TING et al., 2012). Aqueles que assumem a conformação cadeira-barco-cadeira culminam na produção do intermediário catiônico protosterila e origina os triterpenos esteroidais (GASPASCUAL et al., 2014), como o lanosterol, ergosterol e cicloartenol, além de produzir também o cucurbitadienol e outros metabólitos (Figura 3). Porém, sendo a conformação cadeira-cadeira-cadeira, há a formação do cátion damarenila originando diversos esqueletos triterpenoídicos, como  $\beta$ -amirina, lupeol e shionona (XUE et al., 2012).

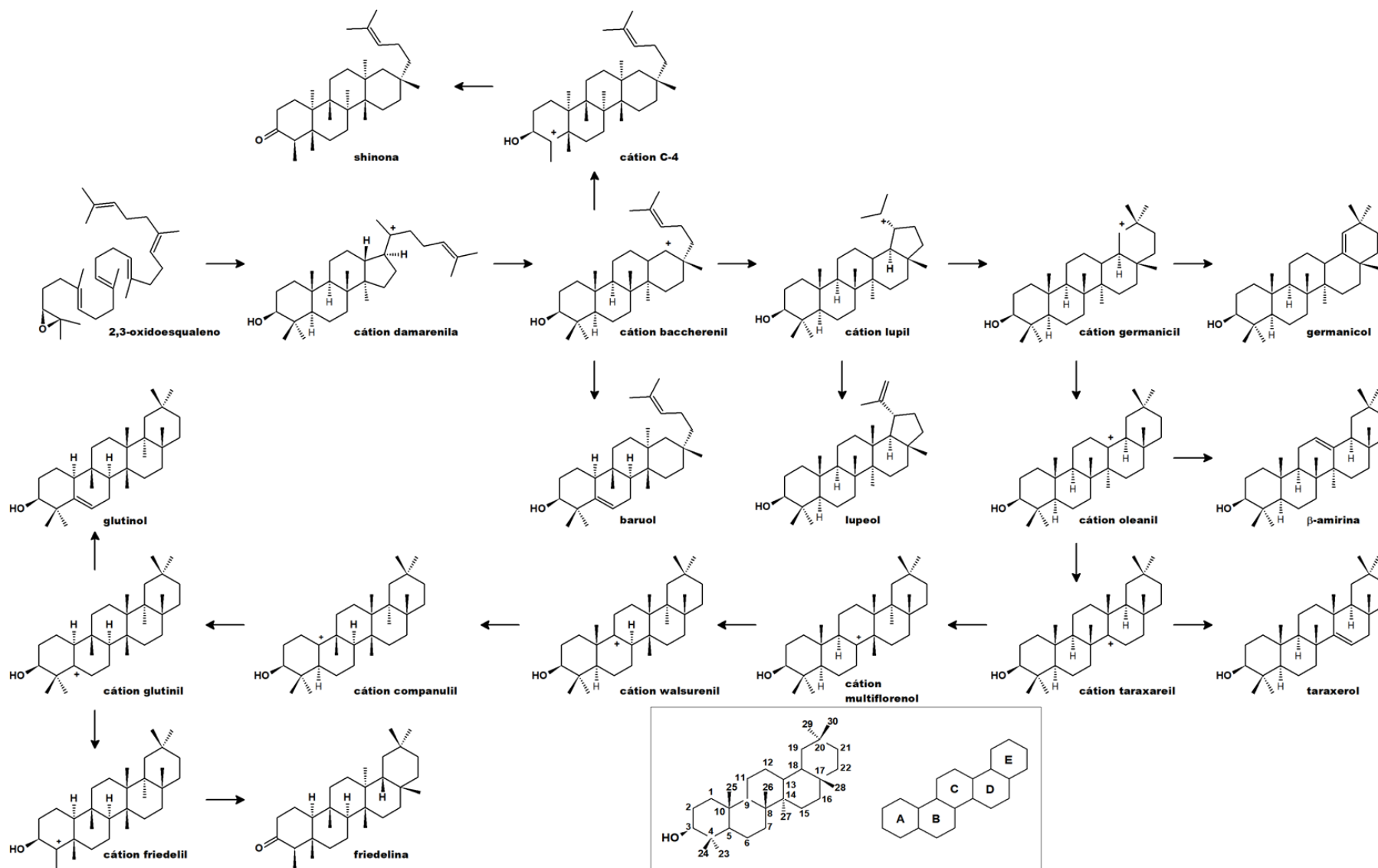
**Figura 3** – Produção de esteroides e triterpenos esteroidais em plantas, leveduras e mamíferos a partir da ciclização do 2,3-oxidoesqualeno.



Fonte: adaptado de BABIYCHUK et al., 2008.

Sendo assim, a ciclização do 2,3-epoxidoesqualeno para produção de triterpenos pentacíclicos é iniciada pela formação de um cátion damarenila, o qual apresenta carga positiva no C-20, seguida de uma série de rearranjos com diferentes intermediários catiônicos (C13→C14→C8→C9→C10→C5→C4) e a expansão do anel E para a produção de uma grande variedade de substâncias, como mostrado na Figura 4. Por fim, ocorre formação de um cátion intermediário hidroxilado, o cátion friedelila, que será convertido na friedelina, molécula com maior quantidade de rearranjos (SOUZA-MOREIRA et al., 2016).

**Figura 4** – Triterpenos, tetra- e pentacíclicos, biossintetizados em espécies vegetais a partir da ciclização do 2,3-oxidoesqualeno.



Fonte: adaptado de SOUZA-MOREIRA et al., 2016.

### 1.3 Friedelina e os triterpenos quinonametídeos

A friedelina (Figura 5) é o único triterpeno pentacíclico contendo um grupo cetona. Foi isolada pela primeira vez em 1892 por Friedel a partir da cortiça e é encontrada em diversas espécies vegetais com uso medicinal, como *Alnus crispa* e *Rhus typhina* L. (CHANDLER; HOOPER, 1984), *Azima tetracantha* (ANTONISAMY et al., 2015) e *Maytenus ilicifolia* (SOUZA-MOREIRA et al., 2016). Desde então, vem sendo amplamente investigada devido a suas diversas atividades biológicas comprovadas. Algumas das propriedades mais importantes da friedelina são seus potentes efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, antipiréticos, reduzindo uma inflamação induzida por carragenina em ratos com efeito persistindo por 6 horas (ANTONISAMY et al., 2011). Além disso, a friedelina mostrou em estudos recentes um alto poder redutor *in vivo* e *in vitro* comparável com antioxidantes comerciais como o BHT e o ascorbato e uma excelente atividade hepatoprotetora, conservando as membranas celulares hepáticas de danos oxidativos (SUNIL et al., 2013). Há também relatos sobre a atividade gastroprotetora contra úlceras induzidas por etanol em ratos de modo que o nível de proteção é similar ao de drogas padrões, como o omeprazol (ANTONISAMY et al., 2015).

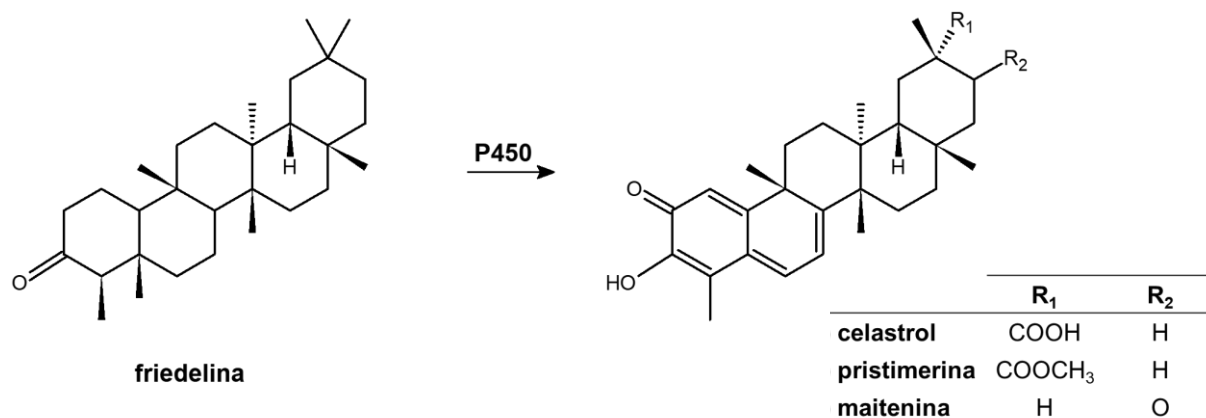
Esse triterpeno pentacíclico mostra interessante atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, como a *Streptococcus faecalis*, e Gram-negativas, como a *Pseudomonas aeruginosa* e a *Shigella dysenteriae* (KUETE et al., 2007), além de exibir significativa atividade contra *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* (MANN et al., 2011), *Mycobacterium madagascariense* e *Mycobacterium indicus pranii* (CHRISTOPHER et al., 2014). Além das atividades antibacterianas, a friedelina também é capaz de inibir o crescimento de fungos patogênicos como a *Candida* ssp (KUETE et al., 2007). Por fim, trabalhos recentes demonstram inibição de algumas células cancerígenas, como a HT93A e NB4 (SANGSUWON et al., 2013).

A friedelina é precursora chave de alguns triterpenos com maior nível de oxidação, os quinonametídeos (Figura 5) (CORSINO et al., 2000; PINA et al., 2016). Essas substâncias são acumuladas em diversas espécies da família Celastraceae (GUNATILAKA et al., 1996; CORSINO et al., 1998; CORSINO et al., 2000; PINA et al., 2016; PAZ et al., 2017). A biossíntese dos quinonametídeos foi proposta e envolve diversas oxidações sequenciais, possivelmente catalisadas pelas



oxidoreduções do tipo citocromo P450 (CORSINO et al., 2000). Essa família de enzimas contém um grupo heme que catalisa milhares de diferentes substratos. Como as OSCs, são também encontradas em diversos seres vivos e desempenham um papel crucial em diversas etapas oxidativas de substâncias endógenas e xenobióticas, além de possivelmente contribuir para a evolução de algumas doenças (HRYCAY; BANDIERA, 2008).

**Figura 5** - Estruturas químicas da friedelina e triterpenos quinonametídeos.



**Fonte:** elaborado pelo autor.

Como a friedelina, os triterpenos quinonametídeos, ou celastroides, exibem uma variedade de atividades biológicas. O celastrol, primeiro quinonametídeo a ser isolado, é uma substância com potente atividade antitumoral contra células de câncer de próstata (YANG et al., 2006), antioxidante, além de mostrar potencial no tratamento para doenças graves, como o Alzheimer (ALLISON et al., 2001) e a obesidade (LIU et al., 2015). Dentre os quinonametídeos, a pristimerina demonstra potente atividade anti-inflamatória inibindo a produção de óxido nítrico e prostaglandina E<sub>2</sub>, além de inibir citocinas pró-inflamatórias induzidas por lipopolisacarídeos (KIM; PARK; KIM; 2013). Da mesma forma, a maitenina também exibe atividade anti-inflamatória e um grande potencial analgésico, devido a seu efeito antinociceptivo periférico (VELOSO et al., 2017). Além disso, ambas substâncias exibem excelente atividade antifúngica contra diversos patógenos. A maitenina demonstra potente atividade, mas ambas não são tóxicas às células examinadas (GULLO et al., 2012). Em especial, tanto a pristimerina quanto maitenina, são promissores agentes antitumorais contra dois adenocarcinomas de mama (LM3) e pulmão (LP07), sendo inclusive mais ativos do que controles comerciais como o paclitaxel (GOMES et al., 2011). Além disso, diversos estudos

demonstram os efeitos antineoplásicos dessas substâncias contra variadas células cancerígenas (COSTA et al., 2008; KAUR; VERMA, 2015; HUANG et al., 2015).

Com mais de 100 gêneros e, aproximadamente, 1.300 espécies, as espécies pertencentes a família Celastraceae estão distribuídas em regiões subtropicais e tropicais, incluindo o norte da África, América do Sul e leste asiático, principalmente a China, e são muito conhecidas na medicina tradicional devido a seus diversos usos como medicamentos (NIERO; ANDRADE; CECHINEL FILHO, 2011; NÚÑEZ et al., 2016). Em especial, em algumas plantas da família Celastraceae, foi demonstrado que a biossíntese da friedelina e dos triterpenos quinonametídeos é compartimentalizada, de modo que o triterpeno pentacíclico é sintetizado nas folhas e transportado para suas raízes onde é convertida nos triterpenos quinonametídeos pelas oxidoreduases do tipo citocromo P450 (CORSINO et al., 2000; PINA et al., 2016; ALVES et al., 2018). Contudo, esses metabólitos ocorrem em baixa concentração nas espécies vegetais e o uso dos mesmos como medicamento se torna inviável. Dessa forma, é de suma importância a produção, tanto do precursor friedelina quanto dos triterpenos quinonametídeos, em larga escala.

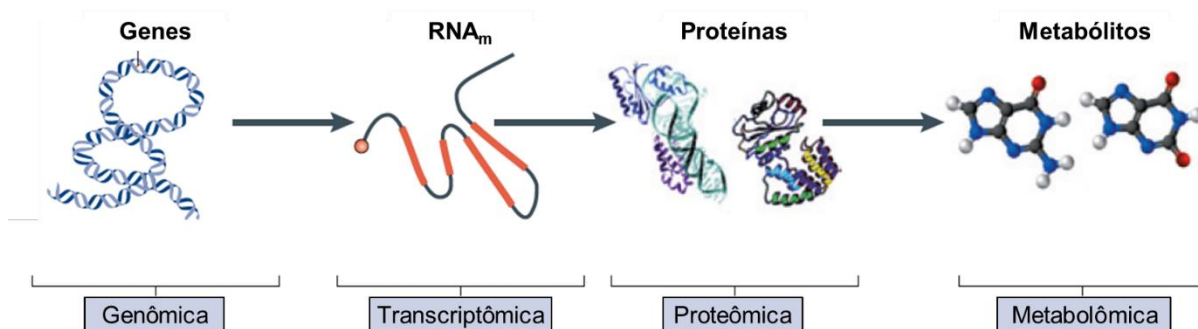
#### **1.4 Biologia sintética**

A partir da descoberta das substâncias que conferem as atividades farmacológicas das diversas plantas medicinais, variados estudos e procedimentos para a síntese desses produtos naturais foram desenvolvidos ao longo dos anos (NEWMAN; CRAGG, 2016). O paclitaxel, isolado pela primeira vez em 1971 (WANI et al., 1971) e comercialmente conhecido como Taxol®, é um importante quimioterápico extraído de *Taxus brevifolia* e são necessárias aproximadamente, 3000 árvores para obtenção de 1 kg de substância. Contudo, o mesmo foi sintetizado pela primeira vez apenas em 1994 por Holton e colaboradores a partir de uma síntese linear de 46 etapas e um baixo rendimento total (HOLTON et al., 1994a; HOLTON et al., 1994b). Dessa forma, a extração e síntese desses metabólitos se tornou impraticável devido à complexidade estrutural exigindo muitas etapas de reação, baixo rendimento nas etapas de extração, além de ser menos ecológica. Sendo assim, novas formas para a produção desse e outros produtos naturais de interesse foram sendo desenvolvidas, como os procedimentos semissintéticos, que

envolvem a obtenção de um intermediário biossintético de fonte natural, o qual pode ser convertido no produto final utilizando menos etapas reacionais (SOUZA, 2004).

Paralelamente aos avanços da química sintética e a partir da descoberta do DNA, os cientistas procuram entender como tais moléculas determinam o fenótipo e a função de todos os organismos. Desde então, a busca pela compreensão do genoma e suas relações inaugurou um novo ramo da ciência denominado de “ciências ômicas”. Inicialmente, a genômica utiliza métodos de sequenciamento de DNA aliados a bioinformática para sequenciar e analisar a função e estrutura dos genes. Essas sequências de ácidos nucleicos são transcritos em RNA, que determinam a produção das proteínas. Assim, a transcriptômica se encarrega de estudar como e quais nucleotídeos transcrevem o RNA, enquanto a proteômica é responsável por avaliar quais proteínas e enzimas são produzidas e determinar suas funções. Por fim, a metabolômica se encarrega de estudar de maneira quantitativa e qualitativa a completa coleção dos metabólitos de uma amostra biológica (Figura 6). Assim, como cada célula, tecido e organismo tem uma composição metabólica característica, estudar e quantificar o metaboloma dessas amostras fornece uma “impressão digital” do metabolismo primário e/ou secundário daquele organismo nas condições a que foi submetido (KOSMIDES et al., 2013).

**Figura 6** – Correlações entre os objetos de estudo das ciências ômicas.



**Fonte:** adaptado de PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012.

Diversas são as técnicas utilizadas para a análise metabolômica. Dentre essas, destaca-se a separação cromatográfica acoplada à espectrometria de massas (EM), a qual possibilita avaliar rapidamente centenas de metabólitos de forma simultânea, a partir de quantidades mínimas de amostra e com grande reprodutibilidade. Em especial, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), apesar de limitada a análises de substâncias voláteis ou submetidas a derivatização química (ROESSNER; NAHID, 2011), permite a utilização de diversas bases de dados espectrais bem estabelecidas para a identificação de substâncias orgânicas.

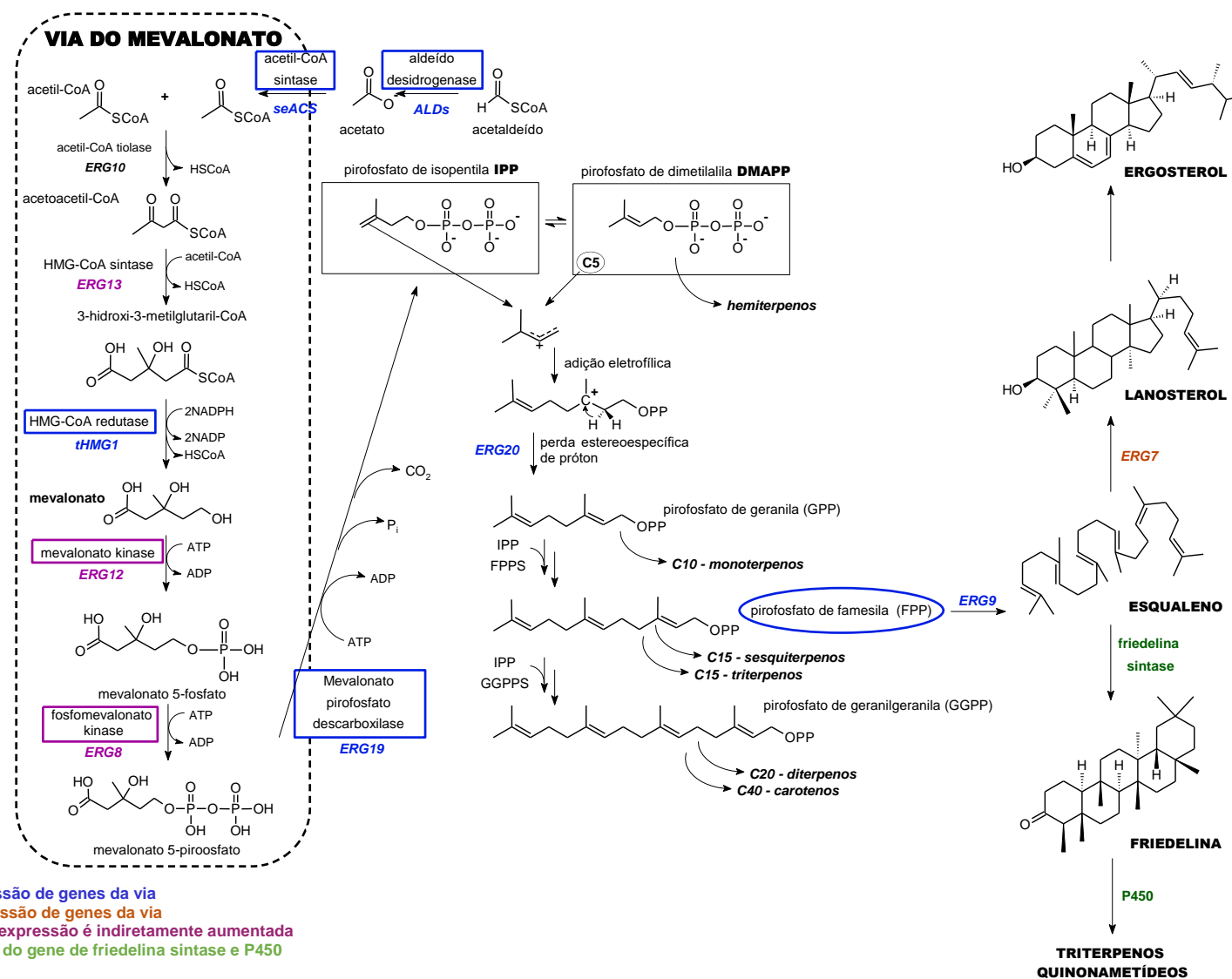
Assim, nos últimos anos, houve um esforço para combinar os princípios da engenharia genética, métodos de síntese e biossíntese, bioinformática e as tecnologias ômicas para projetar ou redesenhar novas rotas metabólicas e organismos artificiais de modo a executarem novas funções e sintetizarem substâncias específicas. Essa nova abordagem foi denominada Biologia Sintética, a qual permite realizar a inserção de vias metabólicas de plantas em organismos hospedeiros possibilitando a biossíntese de diversos produtos naturais no sistema heterólogo (MARIENHAGEN; BOTT, 2013).

Para tanto, tem se utilizado organismos microbianos, especialmente bactérias e/ou leveduras, como hospedeiro, uma vez que apresentam genomas conhecidos. Com isso, é possível utilizá-los para balancear, modificar e otimizar vias biossintéticas com vistas a incrementar a eficiência de obtenção desses metabólitos. Sendo assim, a produção microbiana de moléculas naturais é uma alternativa promissora quando comparada às técnicas de síntese e semissíntese, por apresentar maior sustentabilidade, por utilizar meios de cultura renováveis, com custos mais acessíveis e possibilitando a produção de compostos de alto valor biológico e/ou comercial em grande escala. Importantes substâncias e precursores são produzidos atualmente em sistemas heterólogos, como aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas, biocombustíveis e uma grande variedade de fármacos (BECKER; WITTMANN, 2011). A artemisinina é um potente fármaco utilizado contra a malária obtida comercialmente a partir da semissíntese, partindo do precursor ácido artemisinico, em *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* (LUO et al., 2015).

Entre os organismos utilizados comumente como sistemas heterólogos, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem despertado atenção especial devido ao fato do seu código genético já ser conhecido e facilmente modificável, além de ser um eucarioto unicelular de rápido crescimento, com capacidade de processar proteínas de modo análogo às plantas, necessitar de meios de cultura simples, de baixo custo e não apresentar risco biológico à vida humana (HUANG et al., 2008). A análise das vias biossintéticas dessa levedura, indicou que a mesma também se utiliza da via do mevalonato para a produção de seu esteroide essencial, o ergosterol. Dessa forma, com o intuito de obtermos a produção sistêmica dos triterpenos pentacíclicos e triterpenos mais oxidados, as células de *S. cerevisiae* foram transformadas pela inserção de genes que codificam a friedelina sintase obtidos de *Maytenus ilicifolia*,

com o intuito de utilizar a via do mevalonato existente no sistema heterólogo para obtenção da friedelina. Assim, foram também superexpressos genes que codificam a produção de precursores importantes dessa rota metabólica, especialmente o esqualeno. Além disso, os genes que levam a produção do ergosterol, sofreram *knockout* com o intuito de aumentar o aporte de 2,3-oxidoesqualeno para a produção de triterpenos (Figura 7). Entretanto, as modificações genéticas nos organismos hospedeiros podem alterar as vias biossintéticas e levar a produção de novos metabólitos devido ao estresse causado nas células pelas alterações realizadas (RING et al., 2012).

Figura 7 – Modificações genéticas da via de produção de ergosterol em levedura favorecendo a produção de friedelina.



Fonte: adaptado de SOUZA-MOREIRA et al., 2016.

## 2 OBJETIVO

Esse trabalho tem por objetivo:

- Analisar o perfil metabólico das leveduras transformadas para a produção de friedelina;
- Avaliar a possível produção heteróloga de outras substâncias de interesse comercial e biológico e caracterizá-las por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas;
- Analisar as modificações nas vias metabólicas da levedura.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Microrganismos e plasmídeos**

Os plasmídeos vazios e contendo os genes codificadores de friedelina sintase, também chamados de vetores, além da levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem VZL 1239 (*background CEN.PK2, MAT $\alpha$ ,  $\Delta his3, \Delta leu2, \Delta ura3\Delta, \Delta trp1$* ) utilizados nesse trabalho foram obtidos em nosso laboratório pela Dr<sup>a</sup>. Tatiana Maria de Souza Moreira.

#### **3.2 Cromatografia**

Para a cromatografia gasosa foi utilizado um cromatógrafo SHIMADZU, QP2020C W/O RP230V, equipado com injetor automático e acoplado a um espectrômetro de massas com fonte de ionização por elétrons e analisador Ion Trap. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Agilent Technologies HP-5, 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m.

#### **3.3 Solventes**

Os solventes utilizados na obtenção e fracionamento dos extratos foram grau HPLC (Merk e Honeywell). A água utilizada na preparação e transformação das células foi purificada antes do uso por destilação, já quando utilizada nas extrações a purificação ocorreu em sistema Milli-Q, Millipore.

#### **3.4 Reagentes**

Os reagentes utilizados para a produção dos meios de cultura, nos procedimentos de transformação, crescimento e expressão heteróloga foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich e Thermo Fisher Scientific.

#### **3.5 Outro Equipamentos**

A centrifuga refrigerada utilizada durante os processos de cultura, crescimento e expressão heteróloga é da marca Eppendorf® 5810 R, enquanto nos processos de extração a centrífuga utilizada foi da marca SORVALL® RC PLUS.



O Freezer -80° C utilizado para o armazenamento das células é da marca FORMA Scientific.

A pesagem das amostras foi executada em balança analítica Mettler Toledo® modelo AG245, com capacidade máxima de 210 g.

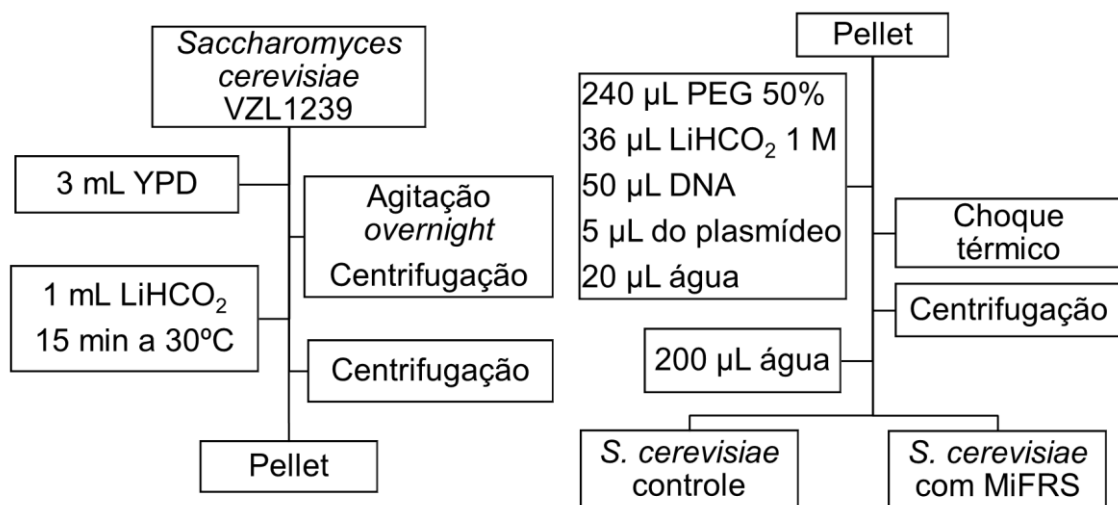
A extração foi auxiliada por equipamento de ultrassom ELMA®, modelo TANSSONIC 700, de frequência de 35 kHz.

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Transformação dos mutantes em levedura

Os vetores foram adicionados na linhagem de *S. cerevisiae* VZL 1239 pelo método de acetato de lítio/polietilenoglicol (ITO et al., 1983). A transformação foi realizada a partir de um inóculo *overnight* da levedura em 3 mL de YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% glicose). As células foram recuperadas por centrifugação na velocidade máxima (10000 rpm) por 1 min., ressuspendidas em 1 mL de acetato de lítio 100 mM e incubados por 15 min. a 30°C. Após essa etapa, foram novamente centrifugadas por 10 s na velocidade máxima e o sobrenadante foi descartado. Ao *pellet* formado foram adicionados, respectivamente, 240 µL de PEG a 50%, 36 µL de acetato de lítio 1 M, 50 µL de solução de fita simples de DNA de esperma de salmão (2 mg/mL), 5 µL do plasmídeo contendo os genes de friedelina sintase (*MIFRS*) e 20 µL de água esterilizada. As suspensões foram incubadas por 30 min., sob agitação a 30°C. Realizou-se então um choque térmico por 10 min. a 42°C. Ao término desse processo, a mistura foi centrifugada, o sobrenadante removido e o *pellet* ressuspendido em 200 µL de água esterilizada. As células obtidas foram plaqueadas em meio sintético completo (0,67% de base para levedura nitrogenada sem adição de aminoácidos – YNB e 2% de glicose), suplementado com aminoácidos, bases e ácido *p*-aminobenzóico, sem adição de uracila (SC-URA) e colocado na estufa de crescimento a 30 °C por 2 a 4 dias. O mesmo processo foi feito com adição do plasmídeo que não contém os genes para síntese do triterpeno.

**Esquema 1** – Metodologia utilizada para a transformação das leveduras.

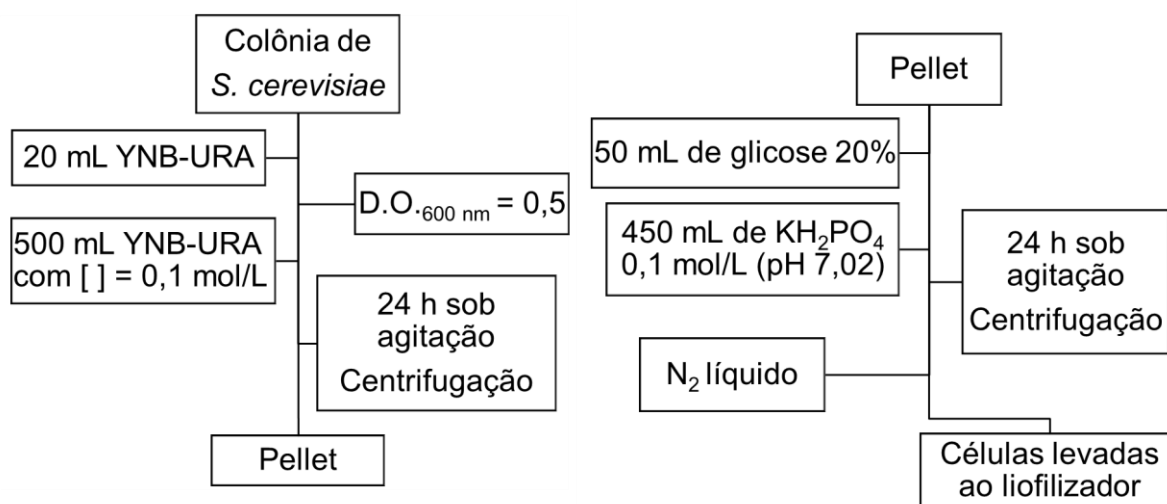


Fonte: elaborado pelo autor.

## 4.2 Expressão heteróloga dos mutantes em *S. cerevisiae*

Para avaliar a possível produção de friedelina pelos mutantes formados, inicialmente, foram realizados pré-inóculos, separadamente, de uma colônia de cada levedura contendo o vetor vazio como controle negativo e com a sequência de *MiFRS* em 20 mL de YNB-URA, sob agitação constante a 30°C, *overnight*. Posteriormente, os inóculos foram diluídos para obter uma densidade óptica inicial a 600 nm de aproximadamente 0,5. Foram produzidos 500 mL de uma solução contendo o meio de cultura (YNB-URA), com concentração de leveduras de 0,1 mol/L, que foram incubados por 24 horas sob agitação constante a 30°C. As células foram recuperadas por centrifugação a 4000 rpm por 5 min. e o sobrenadante descartado. Em seguida, as células foram ressuspensas em 50 mL de solução de glicose 20% e adicionadas a 450 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 mol/L e pH 7,02. As suspensões foram incubadas sob agitação constante a 30°C, por 24 h. Novamente, as células foram centrifugadas e imediatamente colocadas em nitrogênio líquido para inibição de seu metabolismo e levadas ao liofilizador para secagem.

**Esquema 2** – Metodologia utilizada para a expressão heteróloga dos mutantes em *S. cerevisiae*.



**Fonte:** elaborado pelo autor.

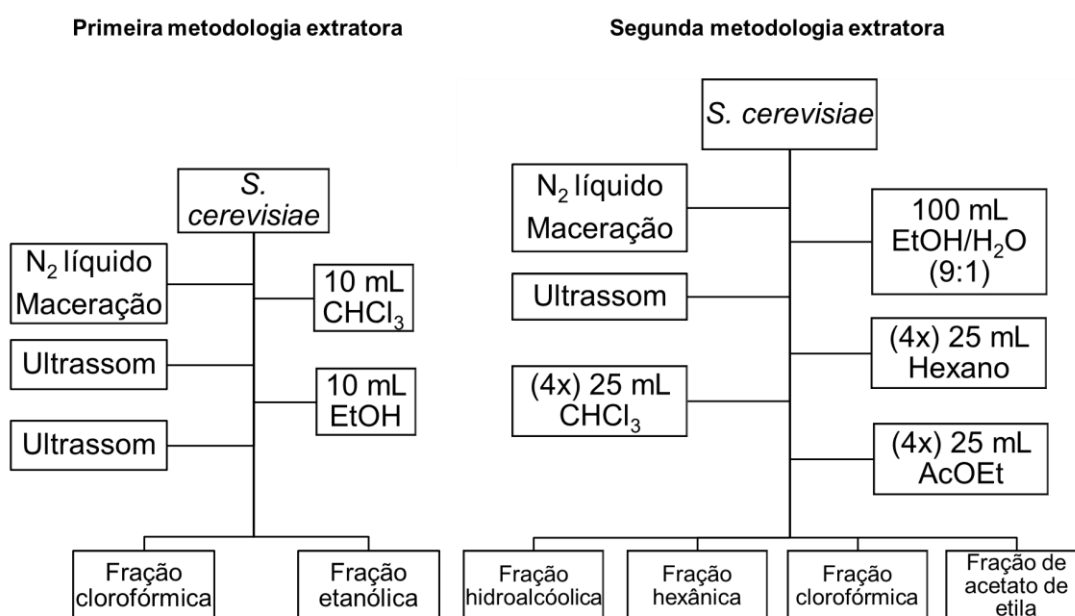
## 4.3 Extração dos produtos gerados

Inicialmente, foram avaliadas duas metodologias para a extração dos metabólitos secundários de interesse. Na primeira, aproximadamente 5 mL de células foram congeladas com nitrogênio líquido e maceradas em gral de porcelana. Então, adicionou-se 10 mL de clorofórmio grau HPLC para ressuspender as células, sendo posteriormente levadas ao ultrassom em temperatura ambiente por 20 min. A

mistura foi filtrada e a solução clorofórmica foi armazenada. Às células foram adicionados 10 mL de etanol anidro para extração dos metabólitos com maior polaridade. A suspensão foi levada novamente ao ultrassom e filtrada. Após secas, as amostras foram pesadas e as massas dos extratos clorofórmicos e etanólicos foram, respectivamente, 19,4 mg e 8,3 mg para a levedura produtora de friedelina e 11,8 mg e 9,0 mg para a levedura com o vetor vazio.

Uma segunda metodologia extratora foi realizada com o intuito de avaliar o poder de extração de diferentes solventes e a possibilidade de obtenção de diferentes perfis cromatográficos. Consistiu em macerar aproximadamente 5 mL de células em gral de porcelana, após congeladas com nitrogênio líquido, e ressuspê-las em 100 mL de solução hidroalcóolica (9:1). A mistura foi levada ao ultrassom, por 30 min., e filtrada. Foram realizadas partições líquido-líquido com 4 adições de 25 mL em cada etapa utilizando hexano, clorofórmio e acetato de etila. Todas as amostras foram secas e armazenadas na geladeira até a análise por cromatografia gasosa, resultando 10,6 mg, 17,1 mg e 20,5 mg das frações hexânicas; 8,2 mg, 13,5 mg e 15,3 mg das frações clorofórmicas; 45,6 mg, 55,1 mg e 60,7 mg das frações hidroalcóolica e 22,4 mg, 27,9 mg e 28,6 mg de acetato de etila. Com foi utilizado um maior volume de solventes foi possível realizar uma Análise de Componentes Principal (PCA). Os dados inicialmente foram tratados e alinhados com o auxílio do software MzMine 2.28 com os seguintes parâmetros:

**Esquema 3** – Metodologias utilizadas para a extração dos produtos gerados.



**Fonte:** elaborado pelo autor.

**Tabela 1** - Etapas e parâmetros usados durante o procedimento de seleção automática de picos pelo MzMine 2.28.

<b>Etapa</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>	
1)	<b>Métodos de dados brutos -&gt; detecção de picos -&gt; detecção de massas</b>		
	Detector de massas	Centroide	
		Nível de ruído	8,0E1
	Nível de MS	1	
2)	<b>Métodos de dados brutos -&gt; detecção de picos -&gt; construtor de cromatograma</b>		
	Intervalo de tempo mínimo (min.)		0,03
	Altura mínima		8,0E1
	Tolerância de $m/z$ (ppm)		3,0
3)	<b>Métodos de lista de pico -&gt; Detecção de Pico -&gt; Deconvolução do cromatograma</b>		
	Altura mínima do pico		8,0E1
	Faixa de duração máxima (min.)		0,03 - 10
	Nível da linha de base		1,5E1
4)	<b>Métodos de lista de pico -&gt; Alinhamento -&gt; Junção de alinhamento</b>		
	Tolerância de $m/z$ (ppm)		15
	Peso para $m/z$		10
	Tolerância do tempo de retenção (min.)		3,0
	Peso para TR		10
5)	<b>Métodos de lista de pico -&gt; Gapfilling -&gt; localizador de pico</b>		
	Tolerância de intensidade (%)		75
	Tolerância de $m/z$ (ppm)		15
	Tolerância do tempo de retenção (min.)		3,0

Então, os dados alinhados foram centrados na média com o auxílio do programa MatLAB R2017a e, após este pré-tratamento, foi construída uma PCA com os valores de altura de cada pico das  $m/z$  obtidas para cada tempo de retenção.

Definidos quais os melhores solventes extratores, foi então realizado um planejamento fatorial completo para avaliar quais as melhores condições de extração para obtermos o cromatograma com as maiores concentrações e diversidade dos metabólitos, utilizando o menor número de procedimentos possíveis menor volume de solvente e tempo. Essa metodologia consistiu em realizar extrações com hexano, clorofórmio e etanol variando o tempo, nº de extrações e volume de solvente, sendo então necessários 2<sup>3</sup> experimentos, segundo a tabela abaixo:

**Tabela 2** – Experimentos realizados no planejamento fatorial completo.

Experimento	Volume de solvente (mL)	Nº de extrações	Tempo de extração (min.)
1	10	1	20
2	20	1	20
3	10	3	20
4	20	3	20
5	10	1	30
6	20	1	30
7	10	3	30
8	20	3	30

#### 4.4 Análise dos produtos gerados

As frações extraídas das células de *S. cerevisiae* modificado e com vetor vazio, foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). As amostras secas foram totalmente ressuspensas em 1 mL de clorofórmio. A análise cromatográfica foi realizada em um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (SHIMADZU, QP2020C W/O RP230V) com coluna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; Agilent Technologies). Temperatura do injetor: 270,0 °C; rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3°C/min.); temperatura do trap: 270°C por 4 min.; temperatura da interface: 280°C; volume de injeção: 1 µL, com modo de injeção do tipo Split: 1:10; fluxo de gás de arraste 1,0 mL/min.; tempo total de análise de 73 min., relação massa/carga  $m/z$  de 35 a 700. Além disso, um padrão de hidrocarbonetos foi analisado nas mesmas condições descritas acima para que seja possível calcular os índices de retenção (IR) das substâncias analisadas segundo a seguinte formula:

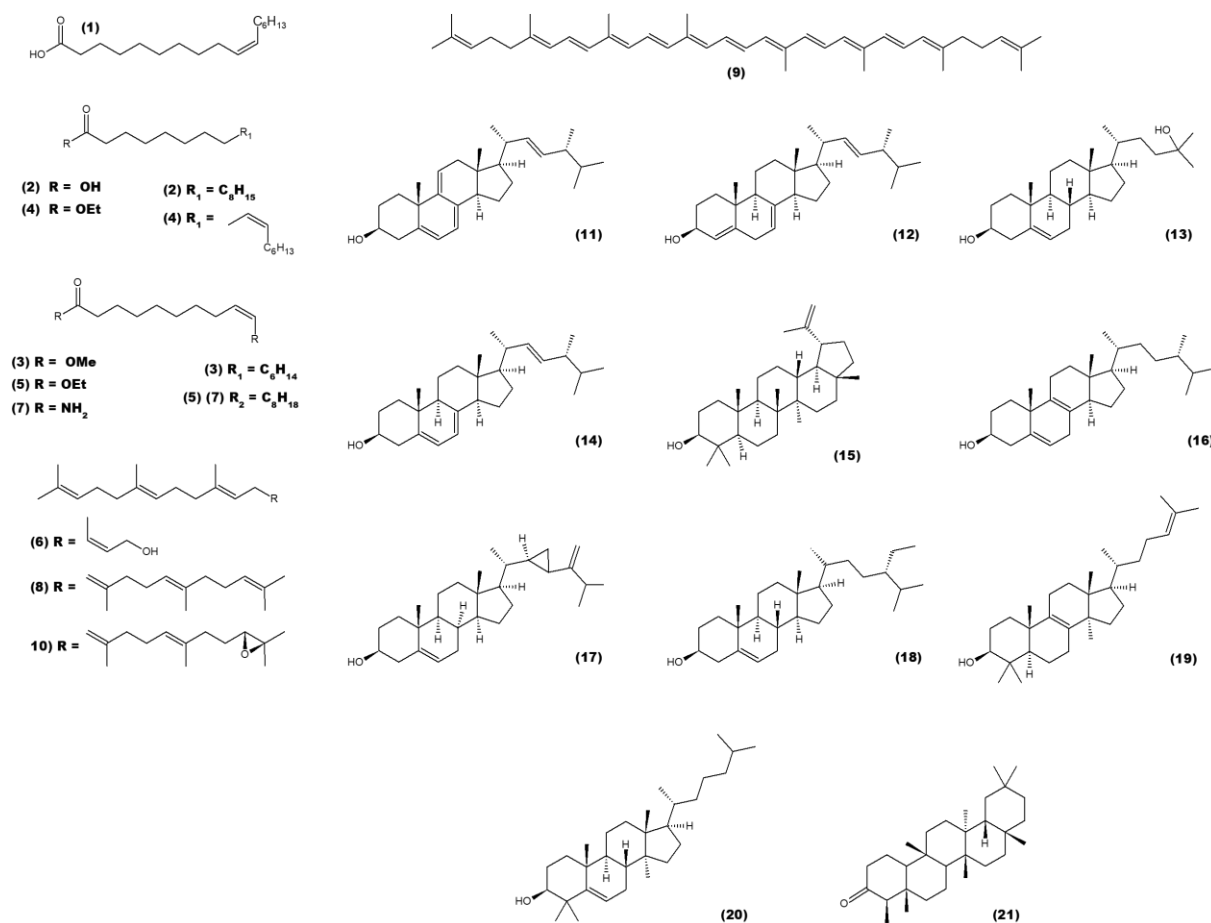
$$IR = 100n + 100 \left( \frac{t_{rx} - t_{rn}}{t_{rn+1} - t_{rn}} \right)$$

-  $t_{rx}$  representa o tempo de retenção da substância analisada,  $n$  indica o número de carbonos no hidrocarboneto com tempo de retenção anterior à substância e  $n+1$  o número de carbonos no hidrocarboneto com tempo de retenção posterior a este.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foram realizadas as análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) das frações clorofórmicas das leveduras transformadas tanto com o vetor vazio (Figura 9, p. 37), quanto com os genes codificadores de friedelina sintase (Figura 16, p. 41). Essas análises permitiram identificar 21 substâncias majoritárias de interesse (Figura 8).

**Figura 8** – Estruturas químicas das substâncias identificadas nos extratos clorofórmicos, etanólicos e hexânicos das leveduras pela análise por CG-EM.

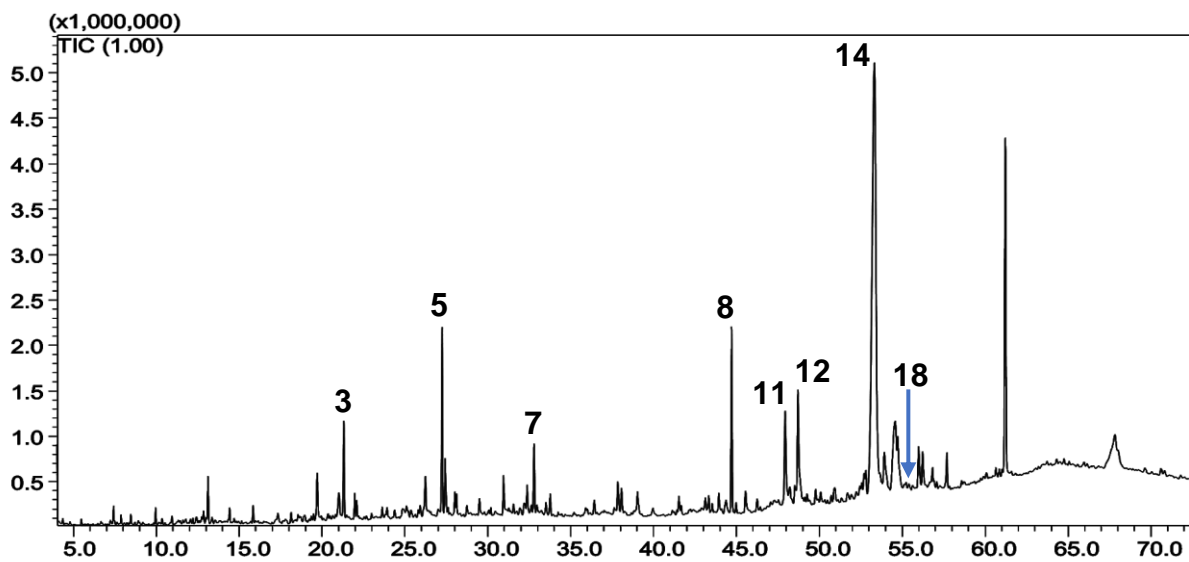


**Fonte:** elaborado pelo autor.

A análise do cromatograma da levedura com plasmídeo vazio (Figura 9) permitiu inferir a presença de três áreas distintas caracterizando diferentes metabólitos. Há uma predominância de hidrocarbonetos de cadeias carbônicas menores, nos tempos de retenção de 5,00 a 20,00 min., como o 2,3,6-trimetildecano ( $\text{C}_{13}\text{H}_{28}$ ) e o heneicosano ( $\text{C}_{21}\text{H}_{44}$ ). A partir de 58,00 min. há predominância de hidrocarbonetos de cadeia longa, como o tetrapentacontano ( $\text{C}_{54}\text{H}_{110}$ ) e hexacontano ( $\text{C}_{60}\text{H}_{122}$ ). Além disso, na região do cromatograma, entre 20,00 min. e 44,00 min., nota-se a presença de ácidos carboxílicos, ésteres e amidas, incluindo o ácido

palmitoléico ( $C_{16}H_{32}O_2$ ), o 9-hexadecenoato de etila ( $C_{18}H_{34}O_2$ ) e a (*Z*)-9-octadecenamida ( $C_{18}H_{35}NO$ ). Na região entre 45,00 a 57,00 min. foram detectados esteroides, como o ergosterol ( $C_{28}H_{44}O$ ), clionasterol ( $C_{29}H_{50}O$ ) e lanosterol ( $C_{30}H_{50}O$ ).

**Figura 9** - Cromatograma (CG-EM) do extrato clorofórmico da levedura com plasmídeo vazio. \*(Condições de análise: Tinjeção: 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.); Ttrap: 270 °C por 4 min.; Vinjeção: 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.)



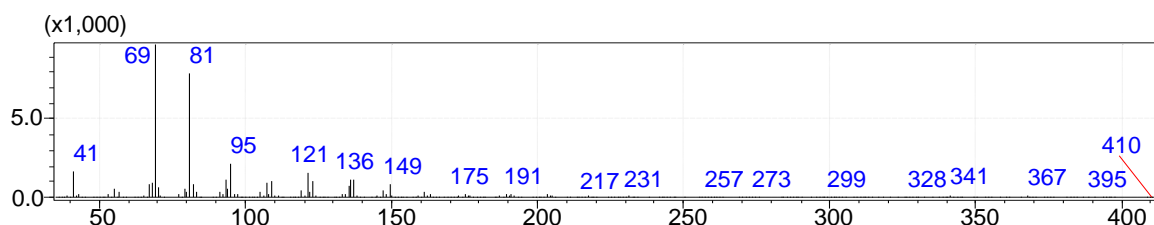
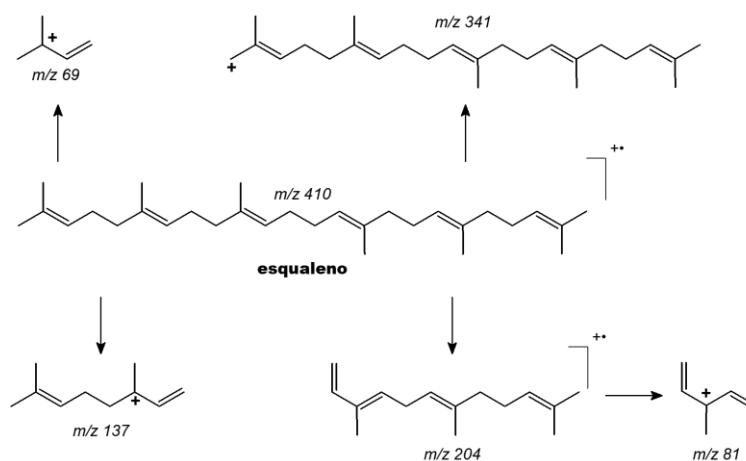
O acúmulo de ésteres e amidas alifáticas é comum na levedura com o vetor vazio (Tabela 3, p.39) e com os genes da friedelina sintase (Tabela 4, p.43). Um dos ésteres encontrados é o 9-hexadecenoato de metila (21,31 min.), ou palmitoleato de metila, que apresenta interessante atividade bactericida contra diversas culturas de *Streptococcus sp.* (HUANG et al., 2010). O oleato de etila (27,24 min.) é um feromônio primário, responsável pela coordenação do desenvolvimento fisiológico e comportamental em abelhas (LEONCINI et al., 2010) e, recentemente, foi aprovado pelo FDA para ser utilizado na indústria alimentícia como aditivo (*EU Food Improvement Agents*, 2017). (*Z*)-9-octadecenamida (32,78 min.), é aditivo plástico que pode ser utilizado como lubrificante industrial (WESTCO, 2017), além de ser produzido por animais para induzir o sono (CRAVATT et al., 1995), sendo considerada uma potencial substância para tratamento de transtornos do sono e de humor (MECHOULAM et al., 1997). Além disso, há o acúmulo de esteroides e triterpenos nas leveduras com o vetor vazio e com genes de friedelina sintase.



**Tabela 3** – Substâncias majoritárias (Figura 8) identificadas no extrato clorofórmico da levedura vazia.

	TR	IR (Cálc.)	IR (Lit.)	Erro (%)	Substância	(%)
3	21,31	1875	1932	3,0	9-hexadecenoato de metila	95
5	27,24	2070	2179	5,0	(Z)-9-octadecenoato de etila	93
7	32,78	2264	2375	4,7	(Z)-9-octadecenamida	94
8	44,71	2732,0	2835,8	3,7	esqualeno	95
11	47,94	2873	3150	8,8	(3 $\beta$ ,22E)-ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol	70
12	48,71	-	-	-	ergosta-4,7,22-trien-3 $\beta$ -ol	78
14	53,32	3124	3080	1,4	ergosterol	91
18	55,64	3238	3290	1,6	$\gamma$ -clionasterol	83

Uma das principais substâncias identificadas nos extratos, em 44,71 min. e 44,98 min. nos extratos das leveduras vazia e produtora de friedelina, respectivamente, é o esqualeno (**8**), precursor de esteroides e triterpenos nos seres vivos. O esqualeno também apresenta diversas atividades biológicas comprovadas, incluindo, antioxidante (KOHNO et al., 1995), efeito preventivo contra câncer de cólon (RAO; NEWMARK; REDDY, 1998) e antitumoral para alguns carcinomas, como o fibrossarcoma (TOMITA, 1983).

**Figura 10** – Espectro de massas de 8.**Figura 11** – Proposta de fragmentação de 8.

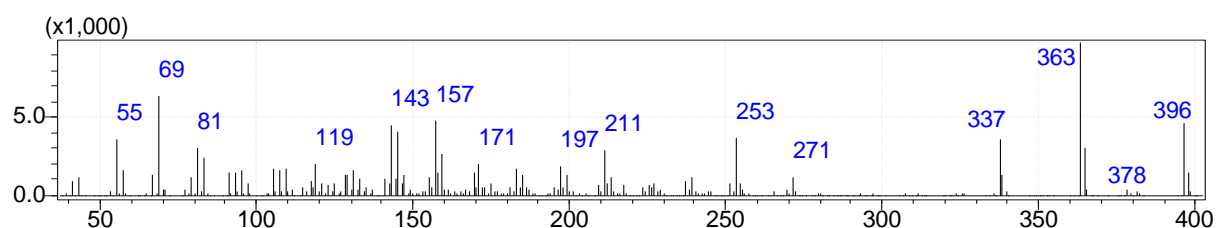
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Outra substância identificada foi o desidroergosterol em 47,94 min. e 47,98 min., respectivamente, na levedura vazia e produtora de friedelina, um importante produto comercial com alto valor agregado. É utilizado como sinalizador celular, visto que este se comporta de forma análoga ao colesterol, ligando-se de forma similar às membranas celulares. (POURMOUSA et al., 2014).

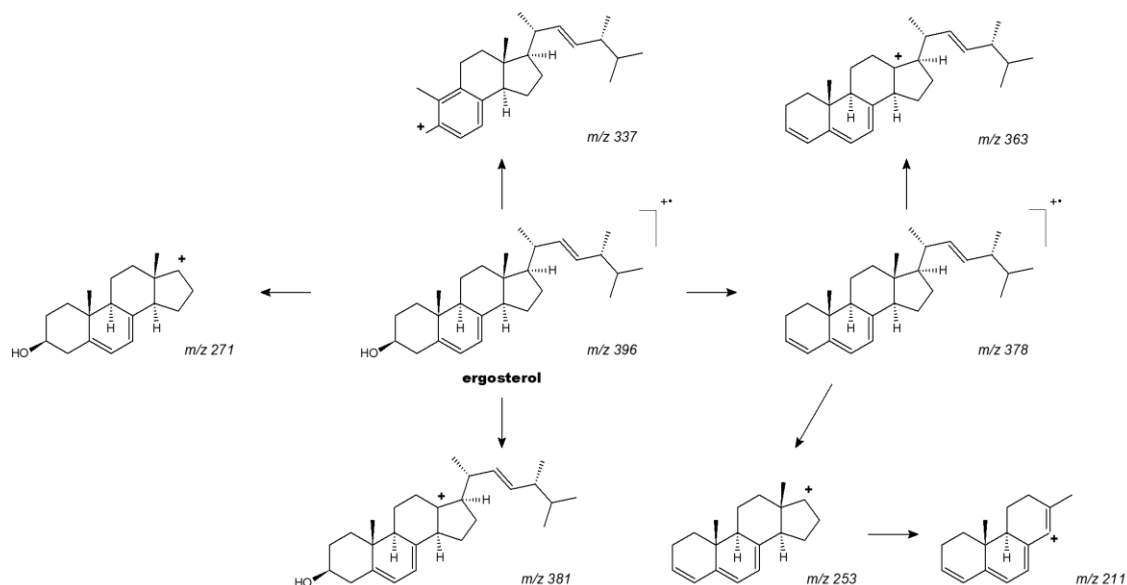
Não há muitas referências sobre o ergosta-4,7,22-trien-3 $\beta$ -ol em 48,71 min. e 48,75 min., respectivamente, na levedura vazia e produtora de friedelina, além da comparação com a base de dados NIST.

O ergosterol (**14**), na levedura com o plasmídeo vazio em 53,32 min. e nas células produtoras de friedelina em 53,31 min., é um importante esteroide, essencial para manutenção da vida da levedura, desempenhando um papel análogo ao colesterol para os animais, sendo encontrado nas membranas das células dos fungos (WEETE; ABRIL; BLACKWELL, 2010). Além disso, desempenha importante função aos seres humanos devido ao fato de ser o precursor da Vitamina D2, após exposição à luz ultravioleta (FELDMAN; PIKE; ADAMS, 2011).

**Figura 12** – Espectro de massas de 14.



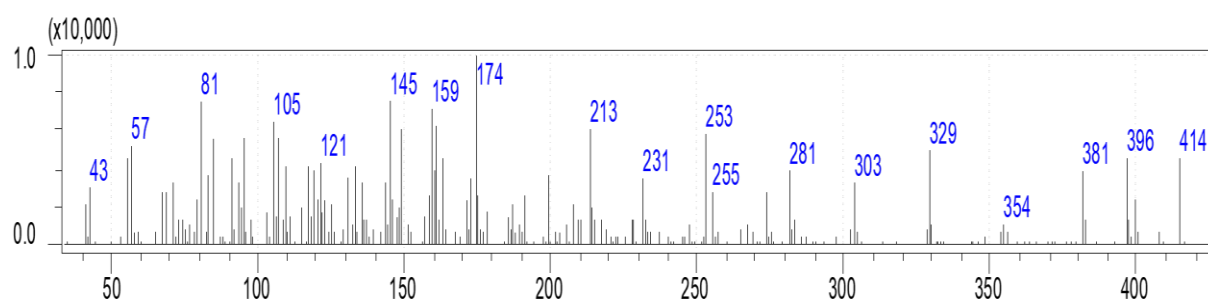
**Figura 13** - Proposta de fragmentação de 14.



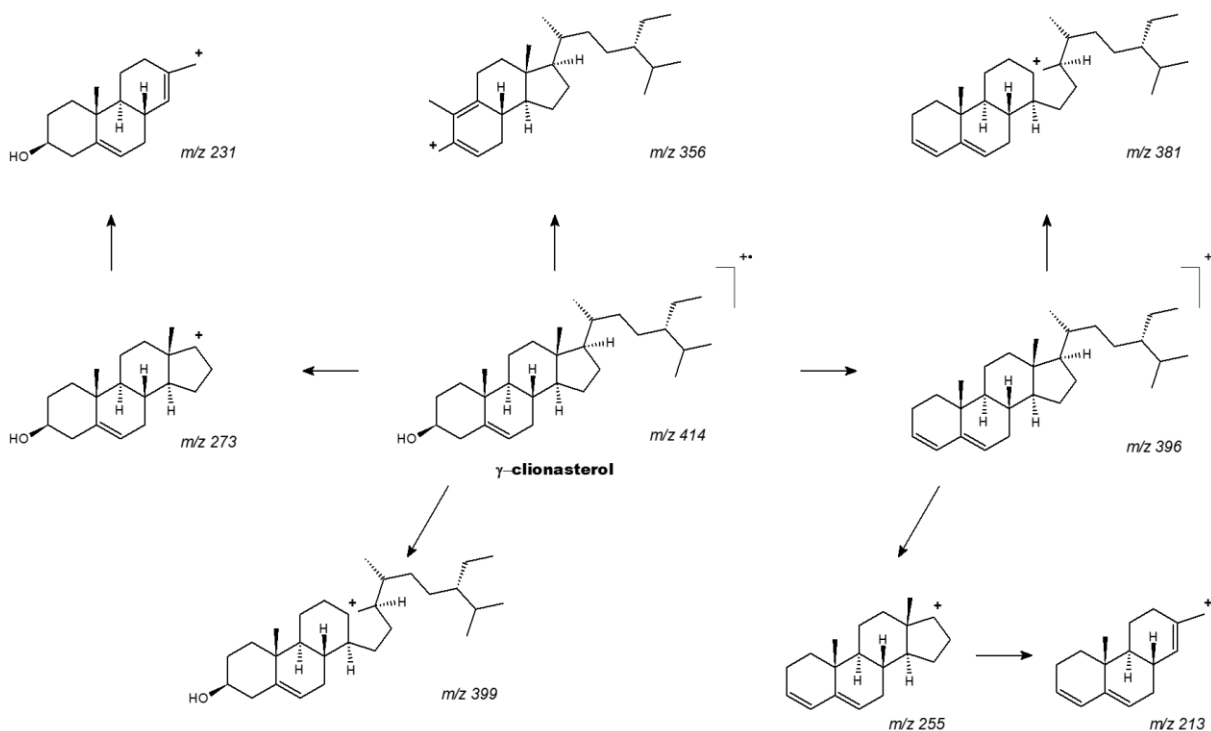
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

O  $\gamma$ -clionasterol, encontrado na levedura vazia em 55,64 min., é um promissor fármaco no tratamento da diabetes tendo comprovada redução do índice glicêmico e aumento significativo da insulina plasmática em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (STZ). Além disso, induz a diminuição do colesterol total, triglicerídeos e níveis de colesterol lipoprotéico de baixíssima densidade e aumenta os níveis de colesterol lipoprotéico de alta densidade nos ratos tratados (BALAMURUGAN; DURAI PANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2011).

**Figura 14** – Espectro de massas de 18.



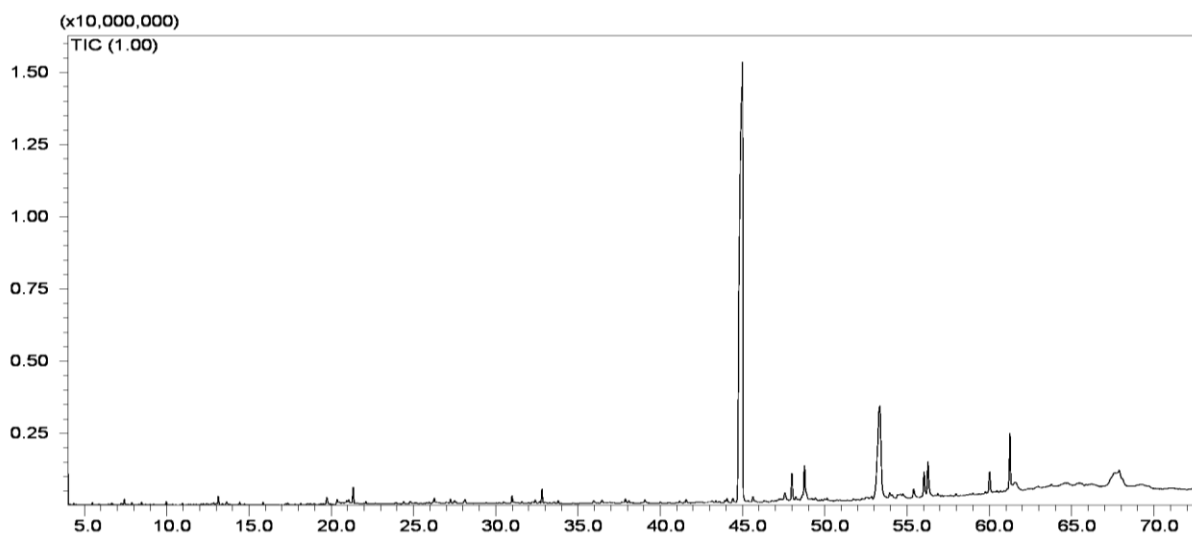
**Figura 15** - Proposta de fragmentação de 18.



**Fonte:** elaborado pelo autor.

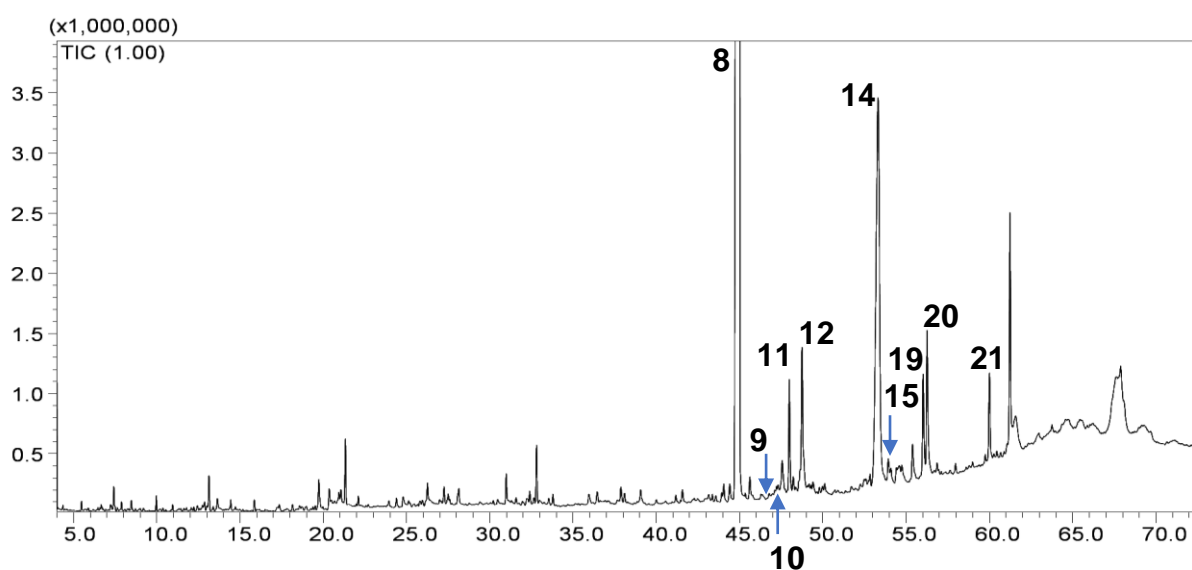
Quando analisamos os cromatogramas das leveduras contendo os genes de friedelina sintase, percebemos diversas similaridades com aqueles obtidos para as leveduras com o plasmídeo em branco, como é possível perceber pela análise da Figura 16 e da Tabela 4, p.43.

**Figura 16** - Cromatograma (CG-EM) do extrato clorofórmico da levedura com plasmídeo com genes de friedelina sintase. \*(Condições de análise:  $T_{\text{injeção}}$ : 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.);  $T_{\text{trap}}$ : 270 °C por 4 min.;  $V_{\text{injeção}}$ : 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.)



Para uma melhor visualização das substâncias encontradas no cromatograma, a escala do mesmo foi ampliada (Figura 17).

**Figura 17** – Cromatograma ampliado (CG-EM) do extrato clorofórmico da levedura com plasmídeo com genes de friedelina sintase. \*(Condições de análise:  $T_{\text{injeção}}$ : 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.);  $T_{\text{trap}}$ : 270 °C por 4 min.;  $V_{\text{injeção}}$ : 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.)

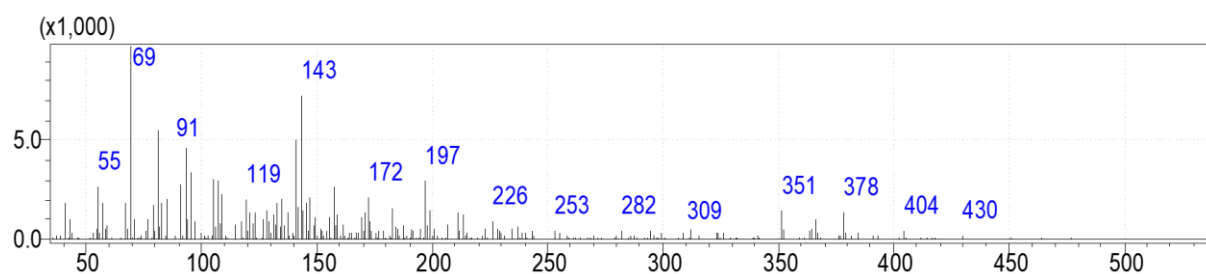


**Tabela 4** – Substâncias identificadas (Figura 8) no extrato clorofórmico da levedura com plasmídeo com genes de friedelina sintase.

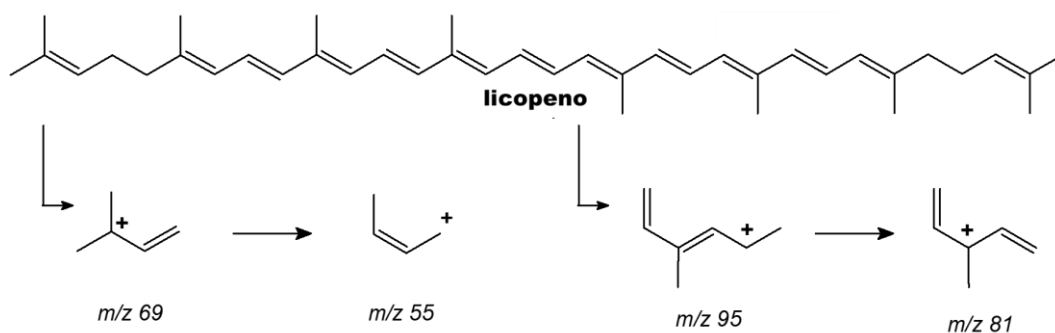
	TR	IR (Cálc.)	IR (Lit.)	Erro (%)	Substância	(%)
8	44,98	2743,6	2835,8	3,3	esqualeno	85
9	46,76	-	-	-	licopeno	76
10	47,21	2840,5	2963,4	4,0	2,3-oxidoesqualeno	89
11	47,98	2875	3150	8,7	(3 $\beta$ ,22E)-ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol	88
12	48,75	2909,2	n.e	n.e	ergosta-4,7,22-trien-3 $\alpha$ -ol	89
14	53,31	3123	3080	1,4	ergosterol	87
15	54,07	3160	3270	3,4	lupeol	73
19	56,01	3257	3300	1,3	lanosterol	76
20	56,25	3269	3260	0,3	(3 $\beta$ )-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ol	78
21	60,00	3463,6	3510,6	1,3	friedelina	90

O licopeno, encontrado na levedura contendo os genes de friedelina sintase no tempo de retenção de 46,76 min., é um carotenoide produzido pela condensação de duas unidades de geranylgeraniol (DEWICK, 2009) que, além de diversas atividades biológicas, quando ingerido previamente a em pequenas doses, exibe proteção genotóxica do DNA contra a radiação ionizante, como os raios-X, em linfócitos humanos (GAJOWIK; DOBRZYNSKA, 2017).

**Figura 18** – Espectro de massas de 9.



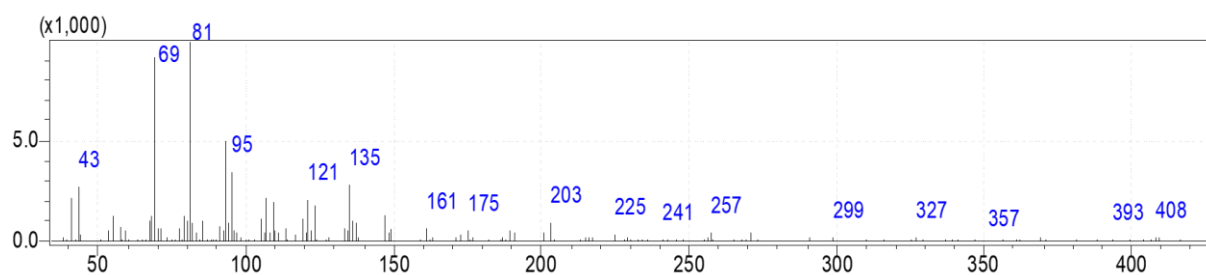
**Figura 19** - Proposta de fragmentação de 9.



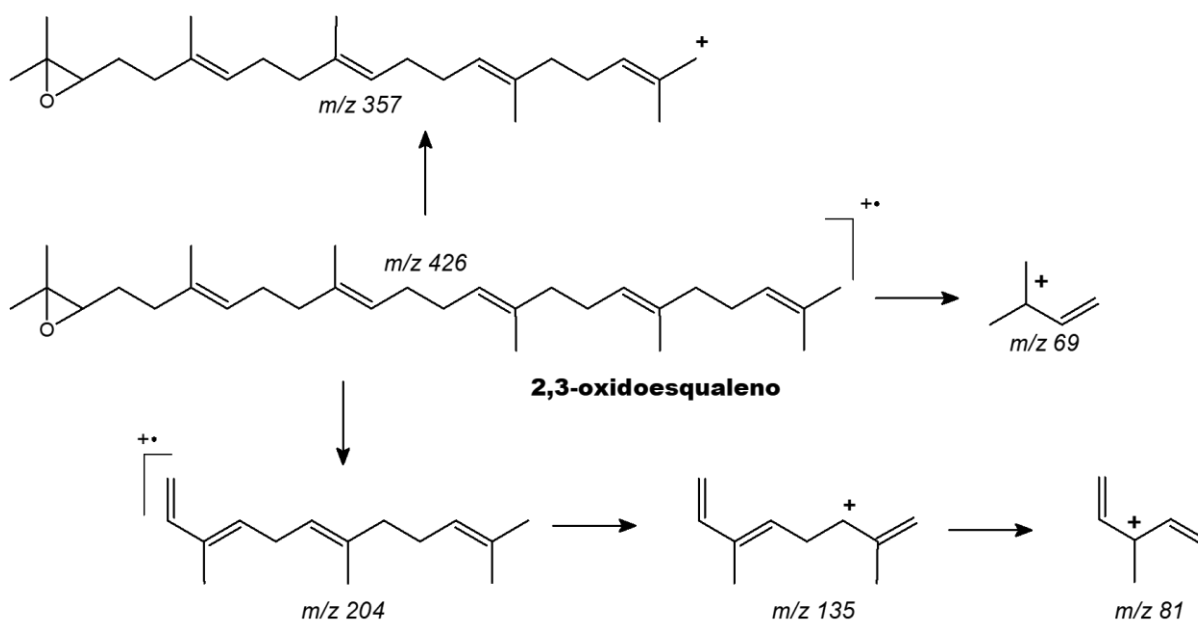
**Fonte:** elaborado pelo autor.

Derivado do esqualeno, o 2,3-oxidoesqualeno (47,21 min.), participa da ciclização enzimática de triterpenos, de forma que nos eucariotos essa reação é catalisada pelas oxidoesqualeno ciclases (OSCs) (SOUZA-MOREIRA et al., 2016). Dessa forma, o acúmulo dessa substância indica que a transformação do *S. cerevisiae* com a inserção do vetor, está de fato desviando a rota biossintética para a produção de triterpenos.

**Figura 20** – Espectro de massas de 10.

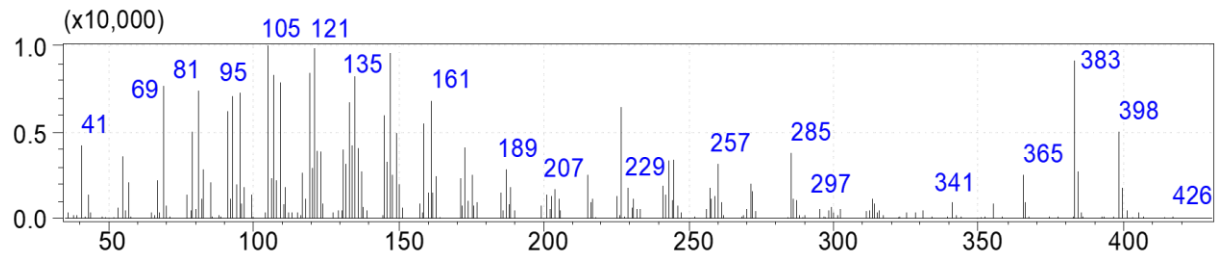
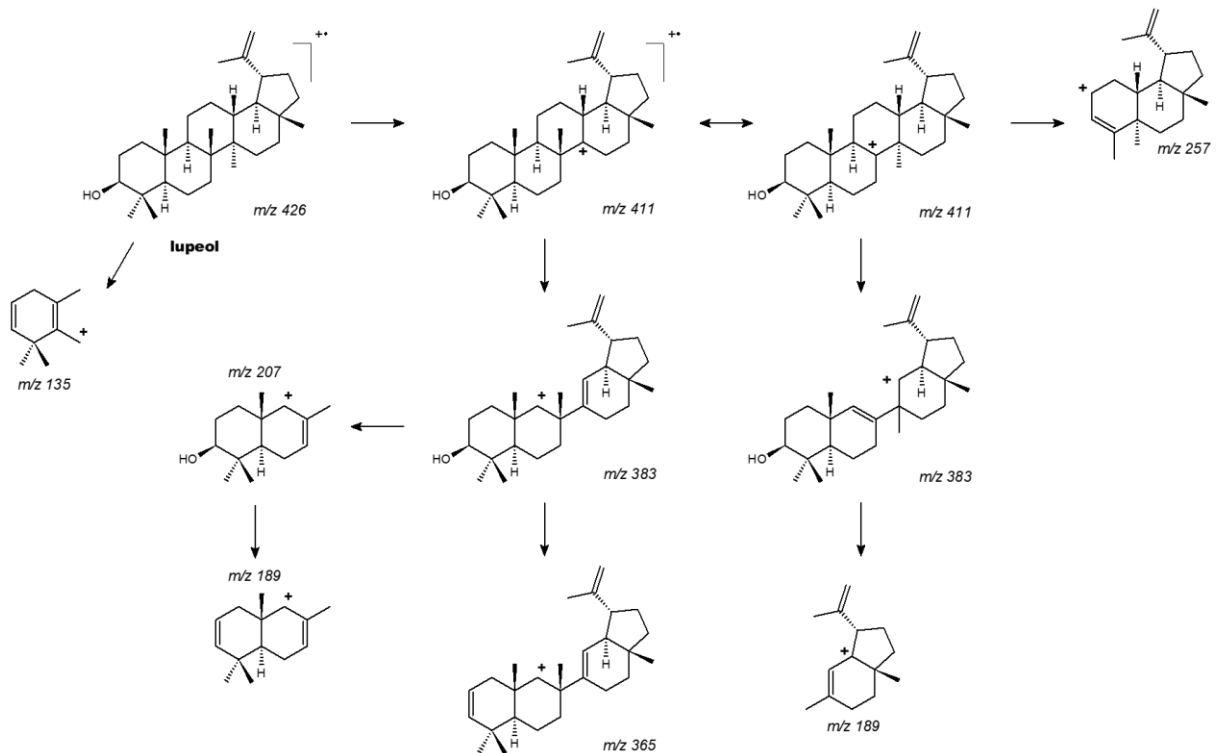


**Figura 21** – Proposta de fragmentação de 10.



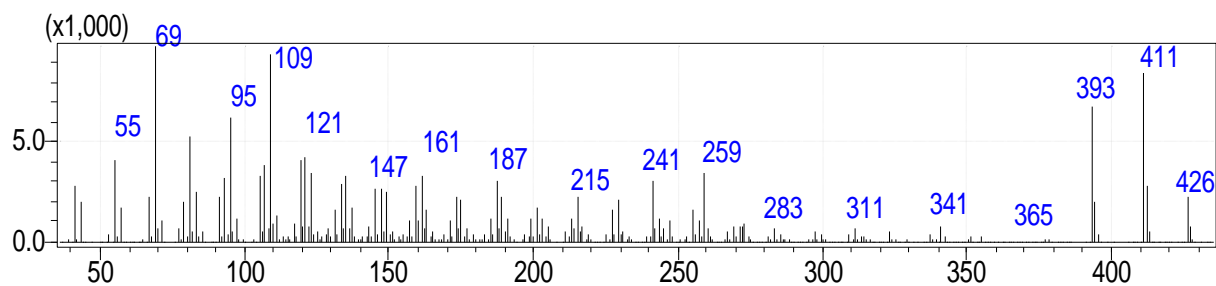
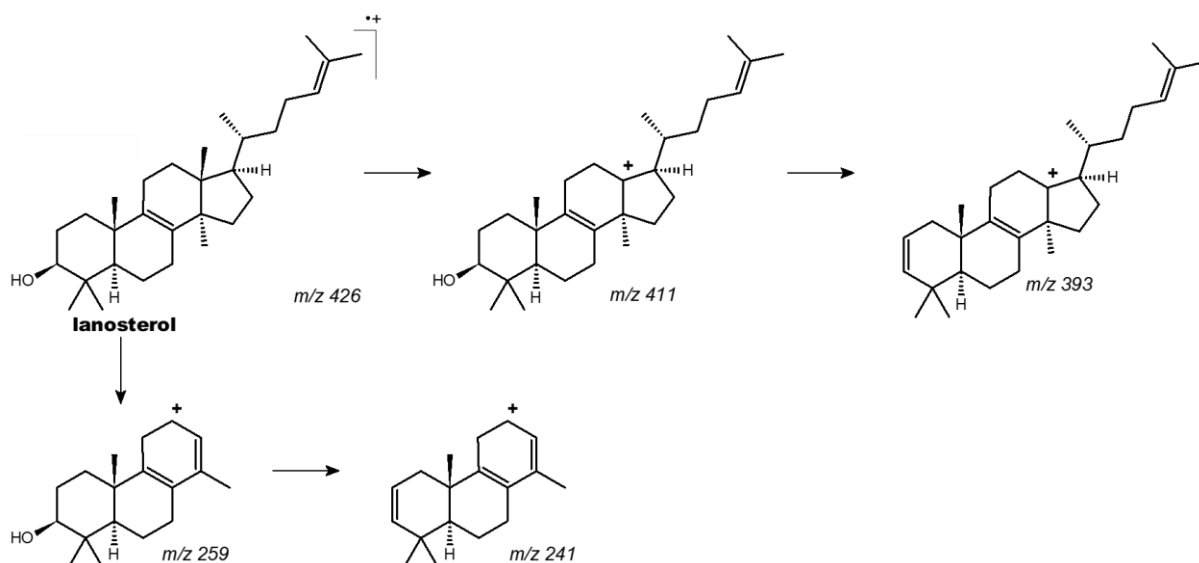
**Fonte:** elaborado pelo autor.

O lupeol (54,07 min.) é um triterpeno produzido durante as sucessivas ciclizações do 2,3-oxidoesqualeno para a obtenção da friedelina, como observamos na Figura 7 (SOUZA-MOREIRA et al., 2016). Exibe também interessantes atividades farmacológicas como anti-inflamatória, antitumoral, contra doenças cardíacas e diabetes, entre outras (SALEEM, 2009). Dessa forma, isso confirma que a introdução dos genes de friedelina sintase realmente foi efetiva, de modo que foram produzidos triterpenos e esteroides que antes não eram observados na levedura.

**Figura 22** – Espectro de massas de 15.**Figura 23** – Proposta de fragmentação de 15.

**Fonte:** elaborado pelo autor.

O lanosterol foi identificado em ambas leveduras, o lanosterol foi encontrado nos tempos de retenção de 56,00 e 56,01 min, respectivamente. Esse triterpeno tetracíclico é um dos principais intermediários na biossíntese de esteroides em animais e fungos (THE HUMAN METABOLOME DATABASE, 2017).

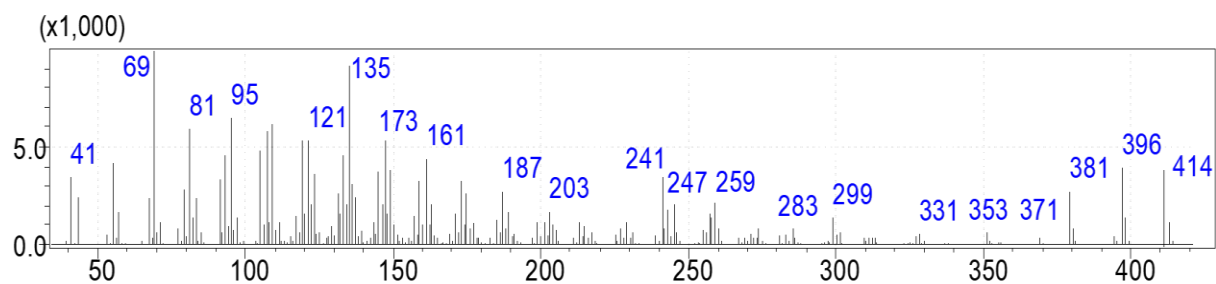
**Figura 24** – Espectro de massas de 19.**Figura 25** - Proposta de fragmentação de 19.

**Fonte:** elaborado pelo autor.

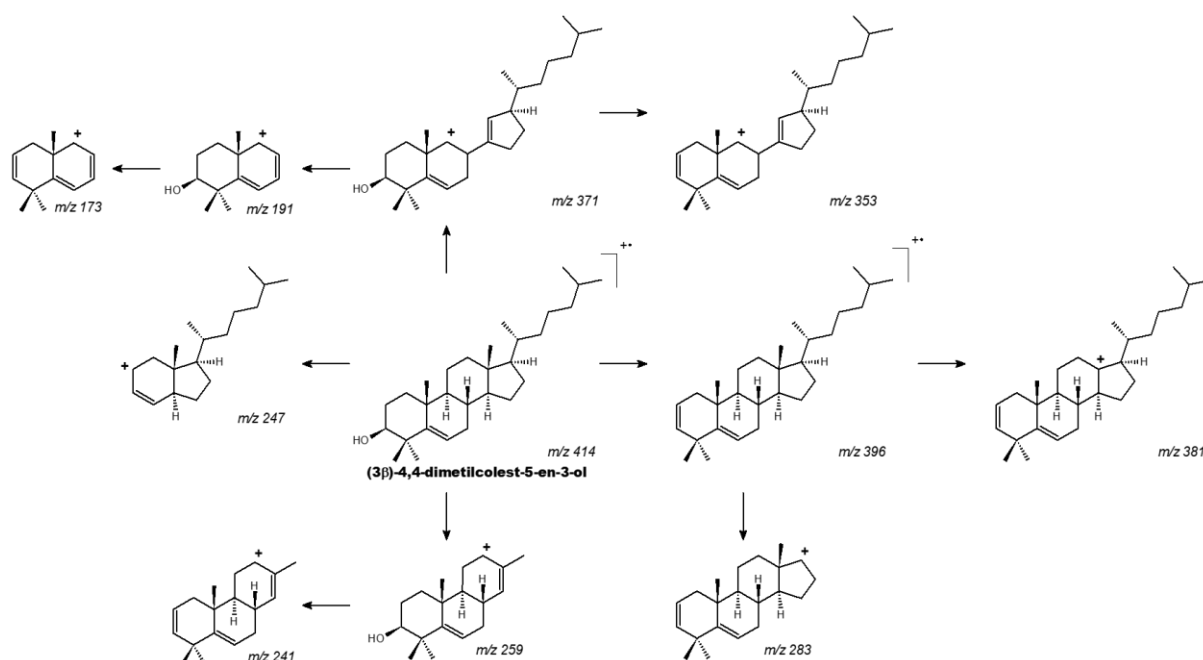
O (3 $\beta$ )-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ol, identificado em 56,24 min. na levedura com o plasmídeo vazio e em 56,25 min. na levedura produtora de friedelina, é um derivado do colesterol que se mostrou um potente agonista na ubiquitinação da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA), presente na via metabólica de produção do colesterol. Esse processo ocorre quando a ubiquitina se liga à enzima alvo com o intuito de inativá-la e sinalizar sua degradação. Assim, futuramente, **20** pode ser utilizada com a função de potencializar o efeito das estatinas, fármacos inibidores da HMG-CoA redutase, que diminuem a produção de esteroides e terpenóides. Assim, o **20** se comporta como agente regulador dessa enzima provocando a diminuição de HMG-CoA redutase ativa, tornando sua inibição facilitada (SONG; JAVITT; DEBOSE-BOYD, 2005).



**Figura 26** – Espectro de massas de 20.

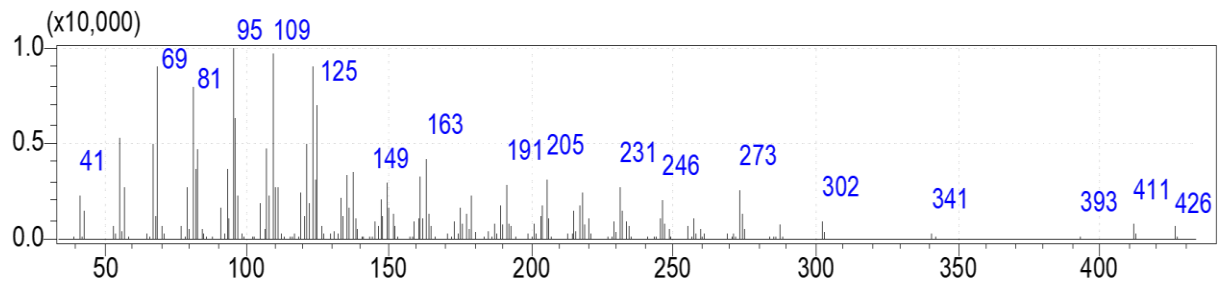
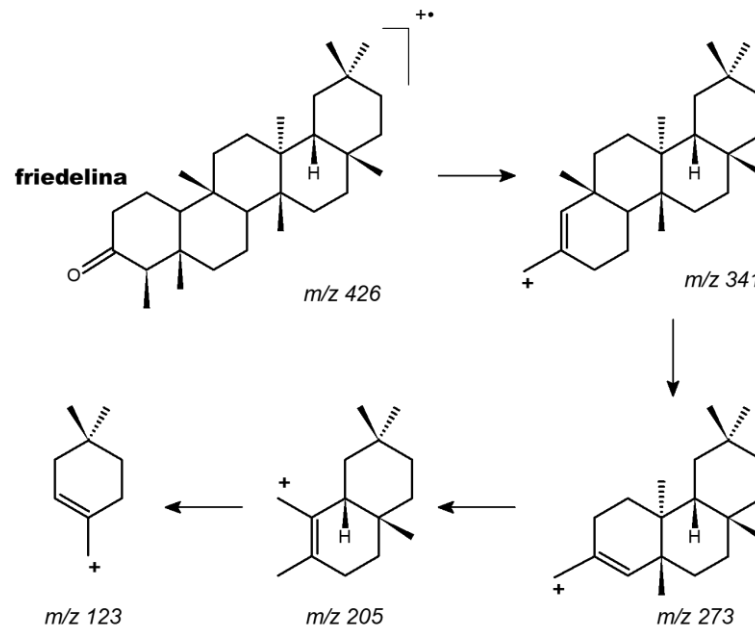


**Figura 27** - Proposta de fragmentação de 20.



Fonte: elaborado pelo autor.

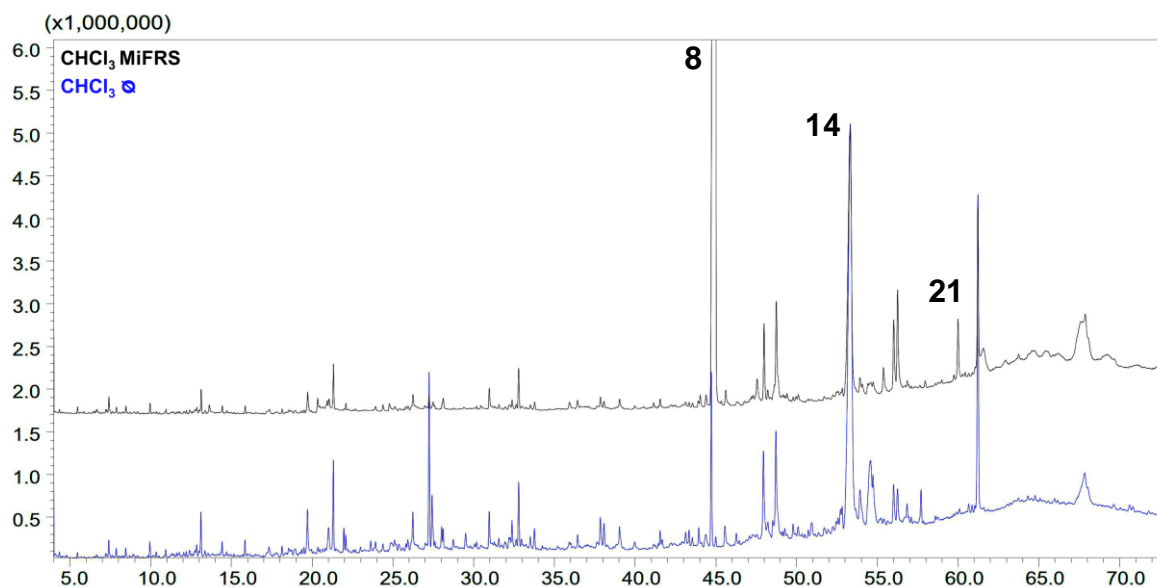
A friedelina (60,00 min.), apresenta grande relevância tanto por suas diversas atividades biológicas, incluindo, anti-inflamatória, analgésica e antipirética (ANTONISAMY et al., 2011), quanto por ser precursora dos triterpenos quinonametídeos, promissores agentes antitumorais (KAUR; VERMA, 2015).

**Figura 28** – Espectro de massas de 21.**Figura 29** - Proposta de fragmentação de 21.

**Fonte:** elaborado pelo autor.

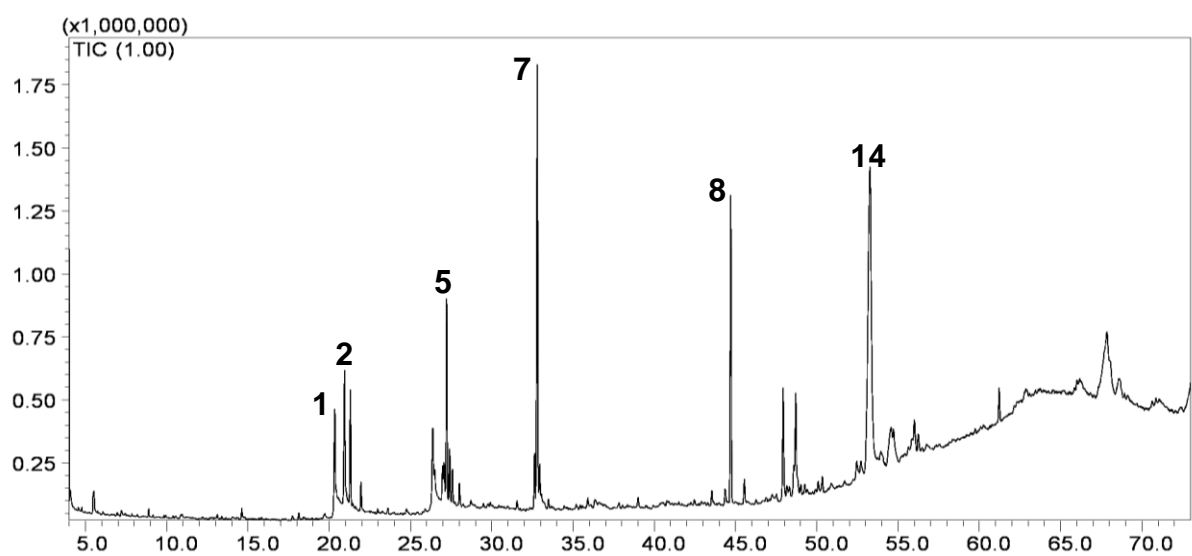
Como pode-se observar na figura 30, os perfis cromatográficos de ambas leveduras são muito similares. Entretanto, notamos algumas diferenças quando analisadas, qualitativamente, o teor presente de esqualeno e ergosterol nos cromatogramas. A levedura com o vetor vazio apresenta maiores concentrações do esteróide quando comparada àquela com o vetor que codifica a friedelina sintase, que por sua vez, tem maiores concentrações de esqualeno. Além disso, foi possível observar também a produção dos triterpenos pentacíclicos friedelina e lupeol, além de encontrarmos o 2,3-oxidoesqualeno, licopeno e maior diversidade de esteróides, devido às alterações não esperadas nas rotas metabólicas.

**Figura 30** – Comparação dos perfis cromatográficos dos extratos clorofórmicos da levedura contendo os plasmídeos vazio e com os genes de friedelina sintase. \*(Condições de análise:  $T_{\text{injeção}}$ : 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.);  $T_{\text{trap}}$ : 270 °C por 4 min.;  $V_{\text{injeção}}$ : 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.)



A análise dos extratos etanólicos de ambas as leveduras, diferentemente dos extratos clorofórmicos, indicou em seus cromatogramas acoplados a espectrometria de massas, a predominância de compostos carbonílicos e nitrogenados, além de álcoois em três faixas diferentes de tempos de retenção (0,00 ~ 10,00 min., 20,00 ~ 40,00 min., 60,00 ~ 70,00 min.). Substâncias como o 1-dodecanol (6,98 min.), o ácido hexadecanoico (20,96 min.) e a (*Z*)-9-octadecenamida (34,81 min.) foram identificadas. Como era de se esperar, devido a diferença de polaridade, a quantidade de hidrocarbonetos observados nos tempos de retenção de 10,00 a 20,00 min., é consideravelmente menor, quando comparado aos extratos clorofórmicos. Os esteroides e triterpenos são encontrados principalmente entre os tempos de retenção de 40 a 60 min., incluindo o (3 $\beta$ )-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ol (56,34 min.), além da própria friedelina (59,99 min.).

**Figura 31** - Cromatograma (CG-EM) do extrato etanólico da levedura com plasmídeo vazio. \*(Condições de análise:  $T_{\text{injeção}}$ : 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.);  $T_{\text{trap}}$ : 270 °C por 4 min.;  $V_{\text{injeção}}$ : 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.)



Foi possível perceber que muitas substâncias identificadas em ambos extratos etanólicos mostram correspondência nos extratos clorofórmicos, como os esteroides e triterpenos já discutidos neste trabalho, ergosterol, ergosta-4,7,22-trien-3 $\alpha$ -ol e a friedelina. Além disso, os hidrocarbonetos encontrados também foram identificados nos extratos clorofórmicos.

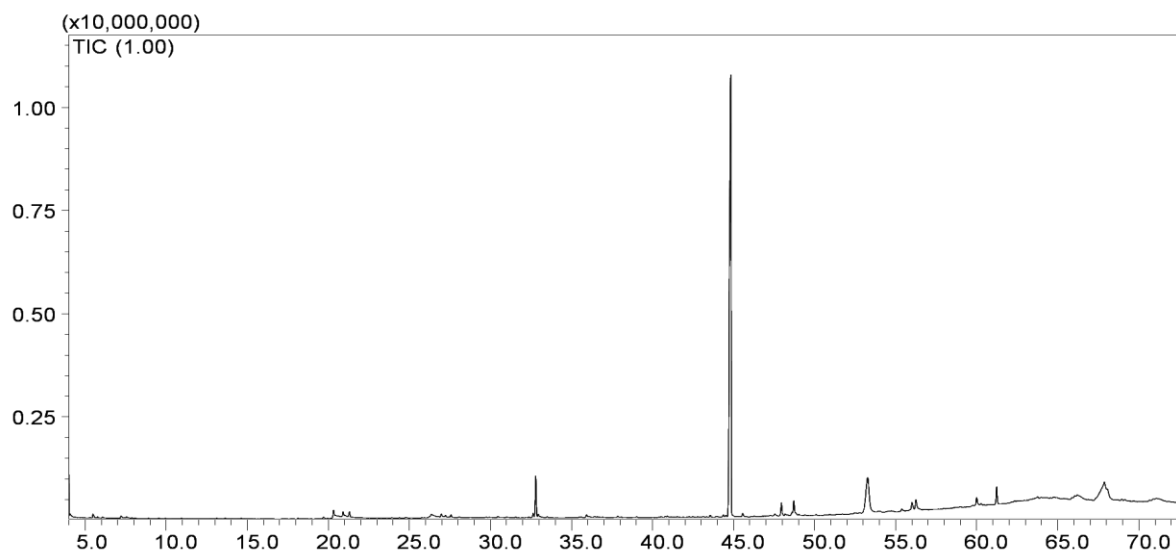
**Tabela 5** - Substâncias identificadas (Figura 8) no extrato etanólico da levedura vazia.

	TR	IR (Cálc.)	IR (Lit.)	Erro (%)	Substância	(%)
1	20,35	1843,8	2073,0	11,1	ácido <i>cis</i> -10-heptadecenóico	95%
2	20,96	1863,4	1977,0	5,7	ácido hexadecanoico	94%
5	27,22	2069,3	2179,0	5,0	(Z)-9-octadecenoato de etila	86%
7	32,81	2264,5	2375,0	4,7	(Z)-9-octadecenamida	94%
8	44,68	2730,8	2835,8	3,7	esqualeno	95%
12	48,67	2905,9	n.e	n.e	ergosta-4,7,22-trien-3 $\alpha$ -ol	73%
14	53,31	3123,4	3080,0	1,4	ergosterol	92%

O ácido *cis*-10-heptadecenóico (20,35 min.) é um ácido graxo monoinsaturado de cadeia longa constituinte minoritário do leite e gordura intramuscular de ruminantes (ALVES et al., 2006), além de estar presente nos esporos de *Ganoderma lucidum*, um fungo utilizado na medicina tradicional chinesa, com atividade antitumoral contra células cancerígenas HL-60 (MASATAKA et al., 2008). Outro ácido graxo identificado foi o ácido hexadecanoico (20,96 min.), também chamado de ácido palmítico, o qual é utilizado como flavorizante (WORLD HEATH

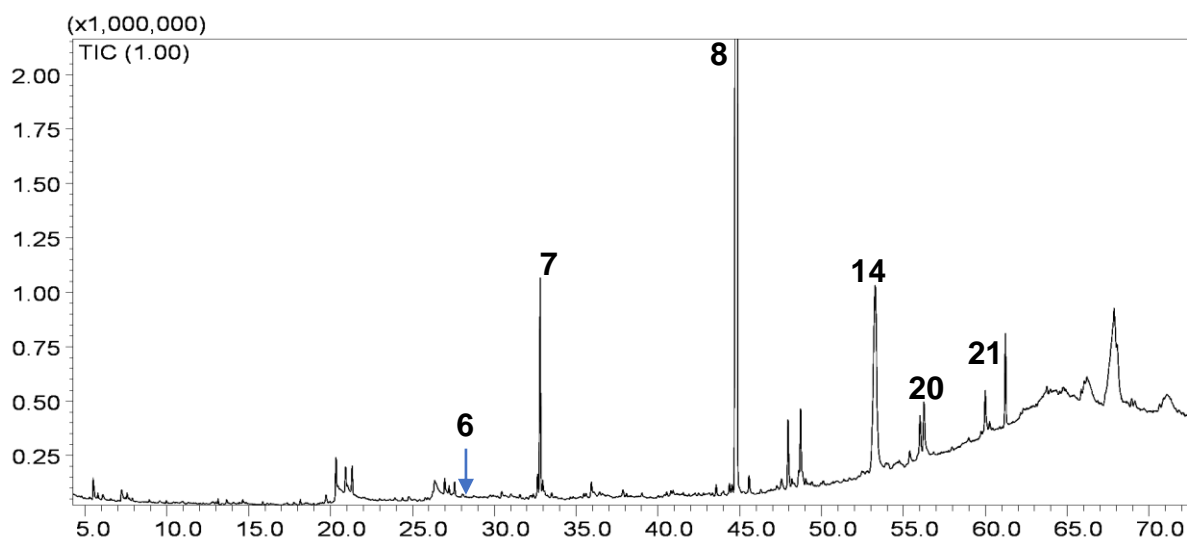
ORGANIZATION, 2017), além de ser o primeiro ácido graxo produzido na lipogênese (DRUGBANK, 2017).

**Figura 32** - Cromatograma (CG-EM) do extrato etanólico da levedura com plasmídeo com genes de friedelina sintase. \*(Condições de análise:  $T_{\text{injeção}}$ : 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.);  $T_{\text{trap}}$ : 270 °C por 4 min.;  $V_{\text{injeção}}$ : 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.)



Da mesma forma que os extratos clorofórmicos, para melhorar a visualização das substâncias encontradas no cromatograma dos extratos etanólicos da levedura produtora de friedelina, a escala do mesmo foi ampliada (Figura 33).

**Figura 33** – Cromatograma ampliado (CG-EM) do extrato etanólico da levedura com plasmídeo com genes de friedelina sintase. \*(Condições de análise:  $T_{\text{injeção}}$ : 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.);  $T_{\text{trap}}$ : 270 °C por 4 min.;  $V_{\text{injeção}}$ : 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.)

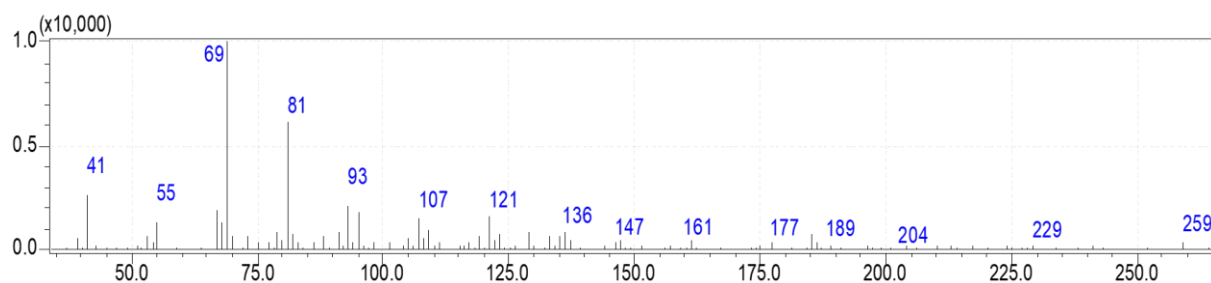


**Tabela 6** – Substâncias identificadas (Figura 8) no extrato etanólico da levedura produtora de friedelina.

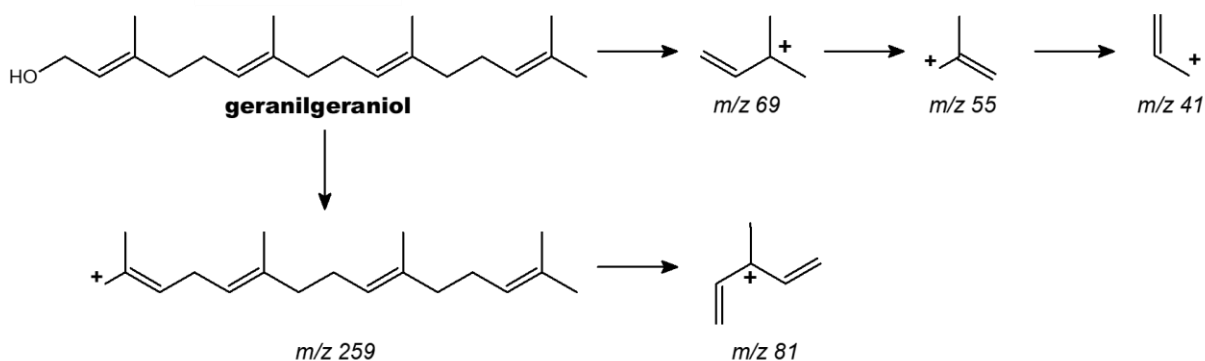
	TR	IR (Cálc.)	IR (Lit.)	Erro (%)	Substância	(%)
<b>6</b>	28,05	2097	2201	4,7	geranilgeraniol	86%
<b>7</b>	32,80	2264,2	2375	4,7	(Z)-9-octadecenamida	94%
<b>8</b>	44,82	2736,7	2835,8	3,5	esqualeno	94%
<b>14</b>	53,27	3121,2	3080	1,3	ergosterol	91%
<b>20</b>	56,24	3268,2	3260	0,3	(3β)-4,4-dimetilcolest-5-en-3-ol	73%
<b>21</b>	59,99	3463,1	3510,6	1,4	friedelina	91%

A substância geranilgeraniol (28,05 min.) é precursora das vias biossintéticas dos diterpenos e carotenoides, como o licopeno (46,76 min.) (DEWICK, 2009), além de atuar como agente regulador para a produção de diversas moléculas, como a testosterona (HO et al., 2018). Exibe importantes atividades biológicas e é considerada um potente indutor de apoptose em células tumorais HL-60 (OHIZUMI et al., 1995).

**Figura 34** – Espectro de massas de 6.



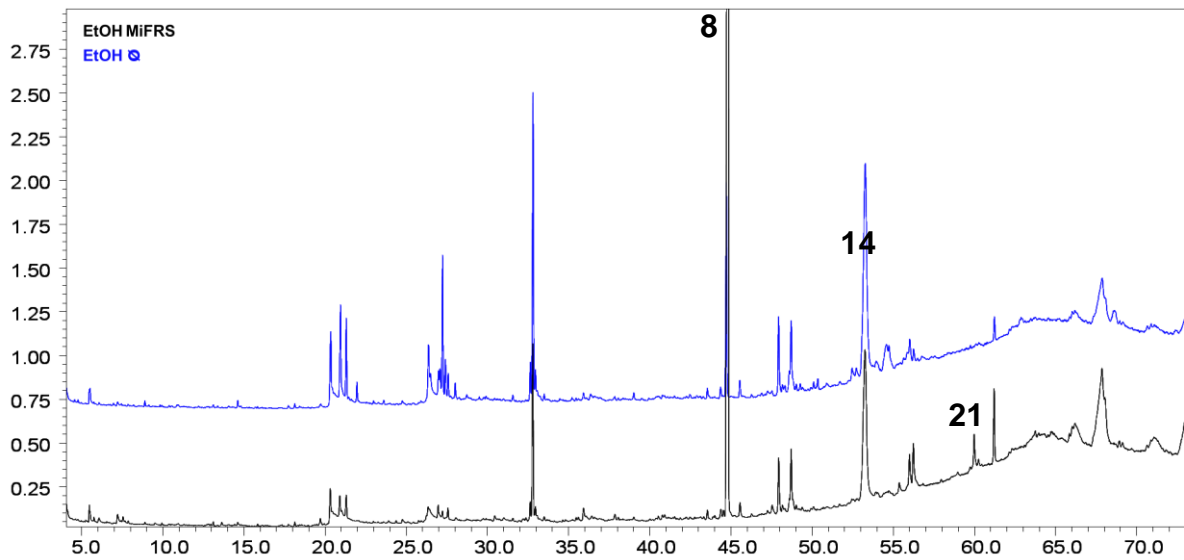
**Figura 35** - Proposta de fragmentação de 6.



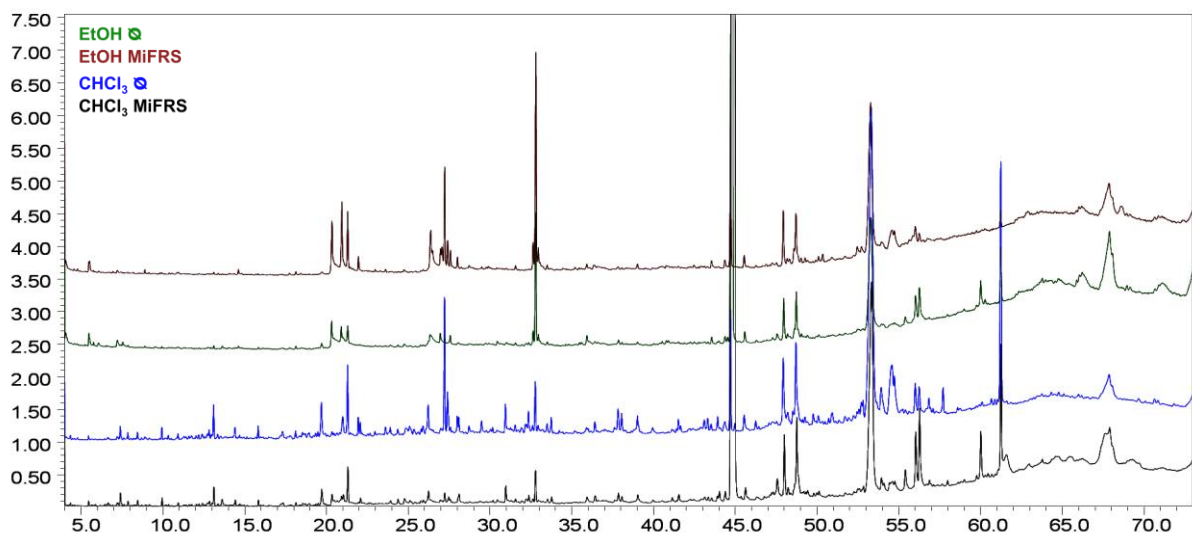
Fonte: elaborado pelo autor.

Da mesma forma que nos extratos clorofórmicos, o perfil cromatográfico dos extratos etanólicos obtidos apresenta similaridade, sendo que diversas moléculas iguais foram encontradas em ambas as análises. A análise qualitativa desses cromatogramas nos permitiu inferir o aumento no teor de esqualeno e a diminuição da do ergosterol, quando comparamos a levedura de friedelina com o vetor vazio (Figura 36). Além disso, também foram identificadas outras substâncias que não eram esperadas, como o geranilgeraniol.

**Figura 36** - Comparação dos perfis cromatográficos dos extratos etanólicos da levedura contendo os plasmídeos vazio e com os genes de friedelina sintase. \*(Condições de análise:  $T_{injeção}$ : 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.);  $T_{trap}$ : 270 °C por 4 min.;  $V_{injeção}$ : 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.)

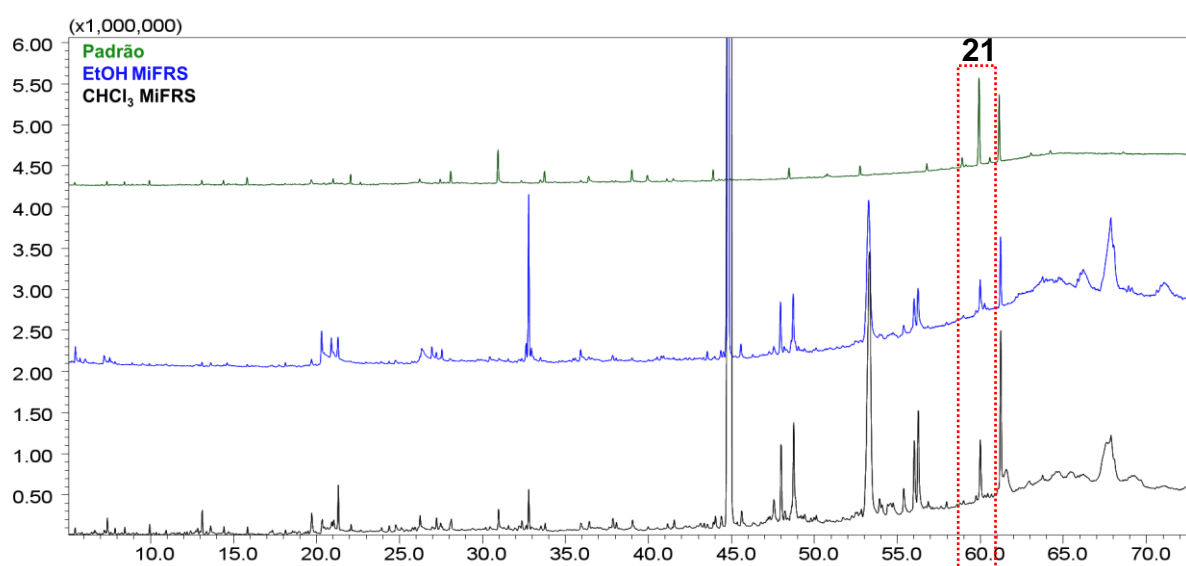


**Figura 37** – Comparação dos perfis cromatográficos (CG-EM) dos extratos da levedura contendo os plasmídeos vazio e com os genes de friedelina sintase nos diferentes solventes. \*(Condições de análise:  $T_{injeção}$ : 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.);  $T_{trap}$ : 270 °C por 4 min.;  $V_{injeção}$ : 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.)

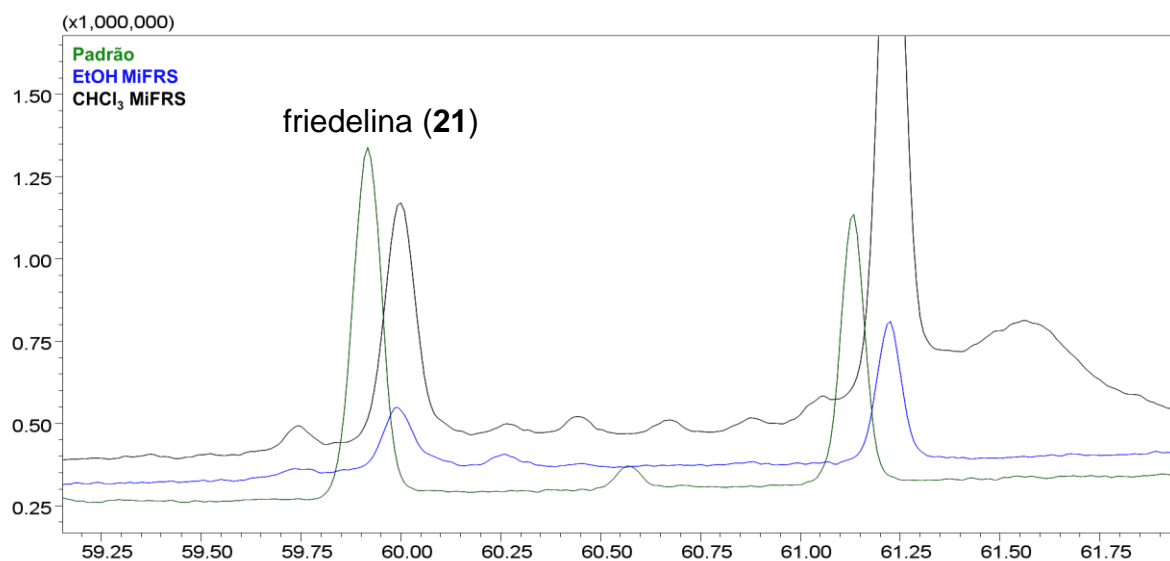


Além da caracterização da friedelina por espectrometria de massas, com o intuito de confirmar sua produção heteróloga, foi analisado um padrão contendo friedelina, nas mesmas condições cromatográficas descritas na pag. 35 e os tempos e índices de retenção comparados (Figura 38 e Figura 39). Observou-se similaridade de 90% e baixo erro quando comparados os índices de retenção calculado e o relatado na literatura (NIST).

**Figura 38** - Comparação entre os tempos de retenção do padrão de friedelina e dos extratos da levedura produtora de friedelina nos diferentes solventes. \*(Condições de análise:  $T_{\text{injeção}}$ : 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.);  $T_{\text{trap}}$ : 270 °C por 4 min.;  $V_{\text{injeção}}$ : 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.)



**Figura 39** – Ampliação do cromatograma (CG-EM) comparando os tempos de retenção da friedelina no padrão e nos extratos nos diferentes solventes da levedura transformada. \*(Condições de análise:  $T_{\text{injeção}}$ : 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.);  $T_{\text{trap}}$ : 270 °C por 4 min.;  $V_{\text{injeção}}$ : 1 µL; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.)



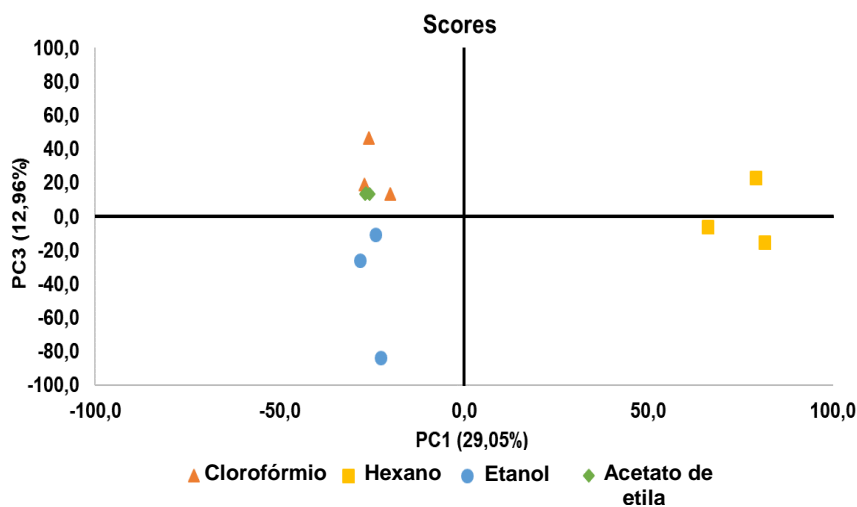


Em uma segunda etapa do trabalho foram realizados novos experimentos utilizando uma metodologia de extração diferente, descrita na pag. 35, com o objetivo de otimizar as condições de separação dos metabólitos. Além disso, como foram produzidos um maior número de amostras, foi realizado a análise dos componentes principais (PCA – Principal Component Analysis). Essa técnica estatística tem por finalidade básica a análise dos dados visando a redução da dimensão dos mesmos e, eliminação de sobreposições, de modo a descrever quais são os extratos mais representativos mantendo as máximas variações do conjunto (BROWN et al., 2009). As componentes principais são obtidas pela transformação das coordenadas originais em novas variáveis linearmente independentes, chamadas de componentes principais.

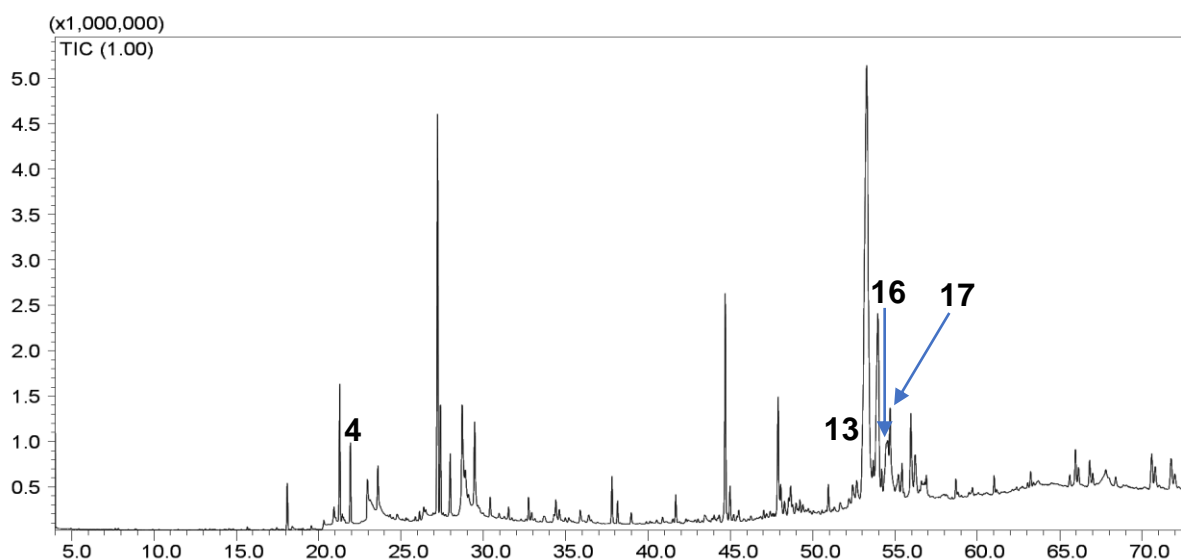
Os dados originais utilizados para a construção da PCA foram as áreas dos picos mais intensos das respectivas  $m/z$  obtidas em cada tempo de retenção para cada extrato. Inicialmente, os dados foram identificados e alinhados utilizando o programa MzMine versão 2.28, segundo o procedimento apresentado na pág. 34. Com isso, após um pré-tratamento no qual os dados foram centrados na média, foi obtida a PCA com o auxílio do programa MatLab R2017a. Os valores dos coeficientes, denominados escores, que representam as projeções das amostras na direção das componentes principais, sendo que esses novos valores se configuram no arranjo que melhor representa a distribuição dos dados.

A análise da PCA dos extratos clorofórmicos, etanólicos, hexânicos e em acetato de etila (Figura 40), demonstrou uma correlação satisfatória entre as triplicadas. Foi possível constatar que os extratos etanólicos, hexânicos e clorofórmicos apresentam diferenças significativas entre si, corroborando os perfis metabólicos obtidos. Entretanto, foi observado também que o extrato em acetato de etila se encontra sobreposto ao clorofórmico, inferindo similaridade. Assim, pode-se reduzir a dimensão desses dados e analisar apenas os padrões representativos encontrados nos diferentes extratos.

**Figura 40** - PCA dos cromatogramas (CG-EM) a partir dos extratos *S. cerevisiae* produtora de friedelina.



**Figura 41** - Cromatograma (CG-EM) do extrato hexânico da levedura com plasmídeo com genes de friedelina sintase. \*(Condições de análise:  $T_{\text{injeção}}$ : 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.);  $T_{\text{trap}}$ : 270 °C por 4 min.;  $V_{\text{injeção}}$ : 1  $\mu\text{L}$ ; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.)



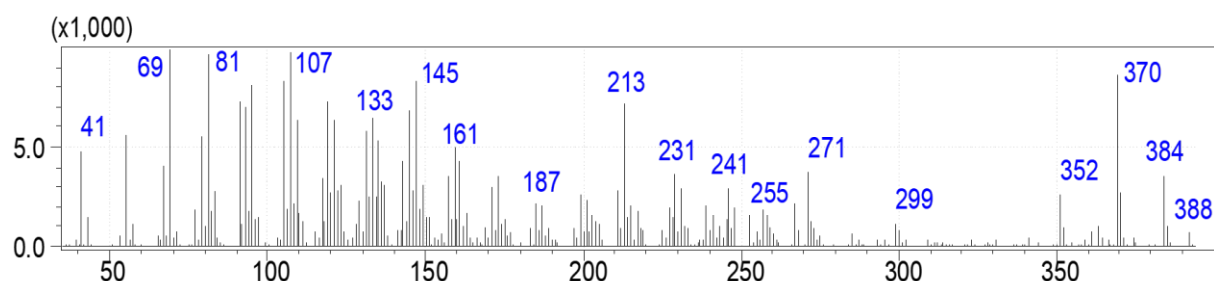
**Tabela 7** - Substâncias exclusivamente identificadas (Figura 8) no extrato hexânico da levedura produtora de friedelina.

	TR	IR (Cálc.)	IR (Lit.)	Erro (%)	Substância	%
<b>4</b>	21,91	1893,8	1975	4,11	palmitato de etila	94
<b>13</b>	52,65	3091,3	-	-	3 $\beta$ -26,27-dinoregost-5-ene-3,24-diol	76
<b>16</b>	54,53	3182,5	-	-	3 $\beta$ -ergosta-5,8-dien-3-ol	71
<b>17</b>	54,67	3189,2	2934	8,69	3 $\beta$ -33-norgorgosta-5,24(28)-dien-3-ol	72

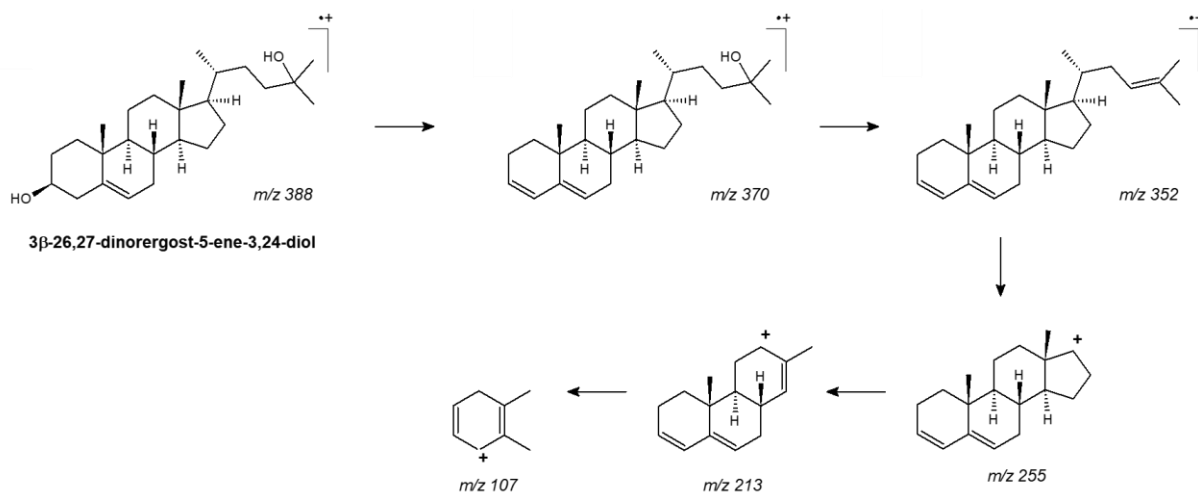
O palmitato de etila (21,91 min.) é utilizado na indústria cosmética (EWG COSMETICS DATABASE, 2017), além de ser utilizado também na produção heteróloga de biodiesel a partir de *Escherichia coli* (KALSCHEUER; STÖLTING; STEINBÜCHEL, 2006).

O  $3\beta$ -26,27-dinorergost-5-ene-3,24-diol (52,65 min.) é um análogo do colesterol com promissora atividade como um modulador alostérico nos receptores cerebrais de N-metil-D-aspartato. Acredita-se que disfunções nesses receptores são responsáveis por sintomas de esquizofrenia e outras doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer (CALIPH; FAASSEN; PORTER, 2017).

**Figura 42** – Espectro de massas de 13.



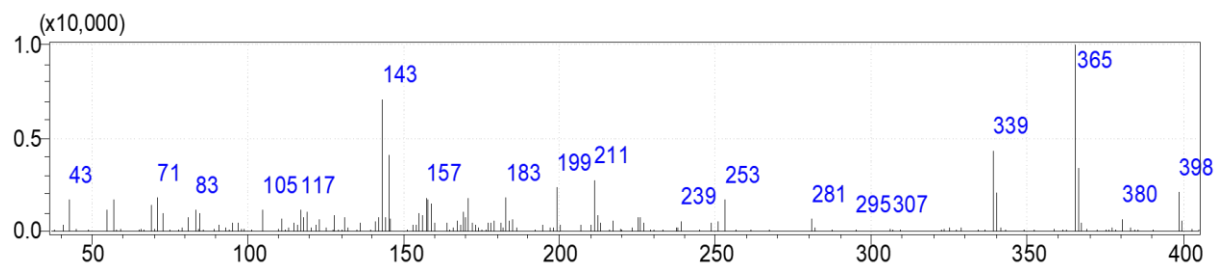
**Figura 43** - Proposta de fragmentação de 13.



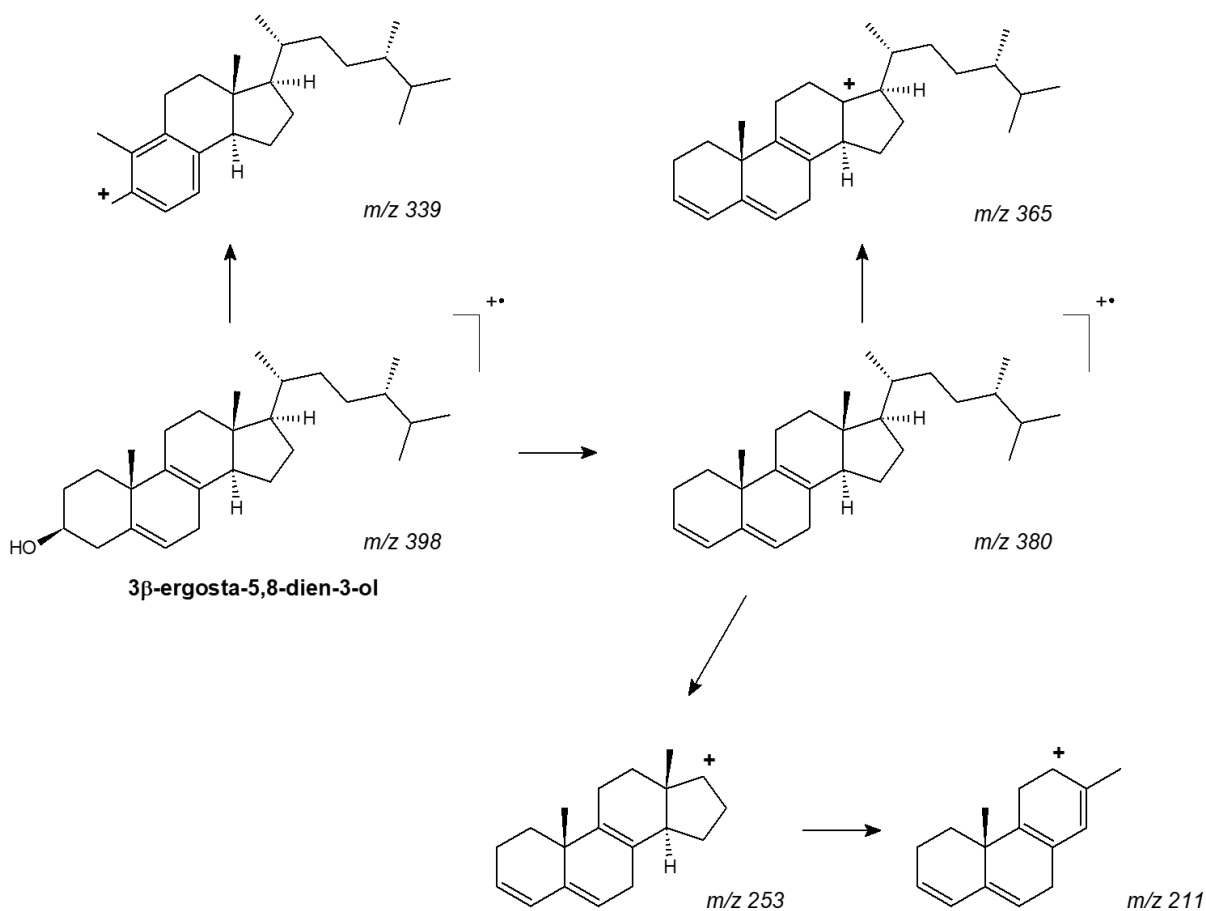
**Fonte:** elaborado pelo autor.

Produzido como produto alternativo no caminho metabólico de produção do 5-desidroepisterol, o  $3\beta$ -ergosta-5,8-dien-3-ol (54,53 min.) demonstra acúmulo em *Leishmania amazonenses* na presença do 2',6'-diidroxí-4'-metoxichalcona (DMC), um agente antileishmania, sugerindo a inibição conjunta de enzimas vitais a este parasita, como a C-14 desmetilase, C-24 metiltransferase e  $\Delta^{7-8}$  isomerase (MURUGAN et al., 2013).

**Figura 44** – Espetro de massas de 16.

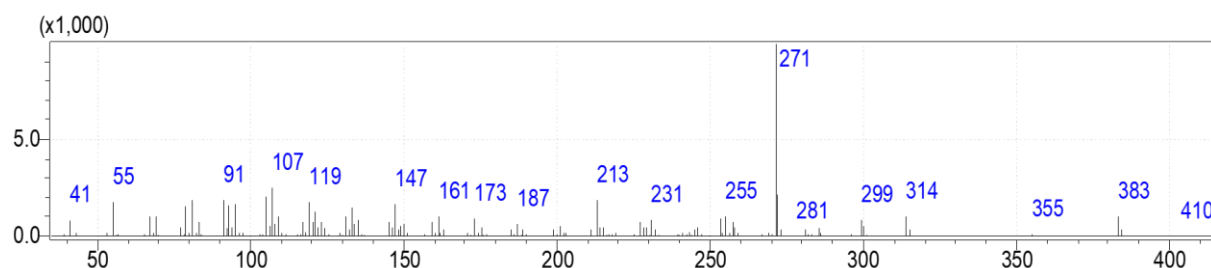
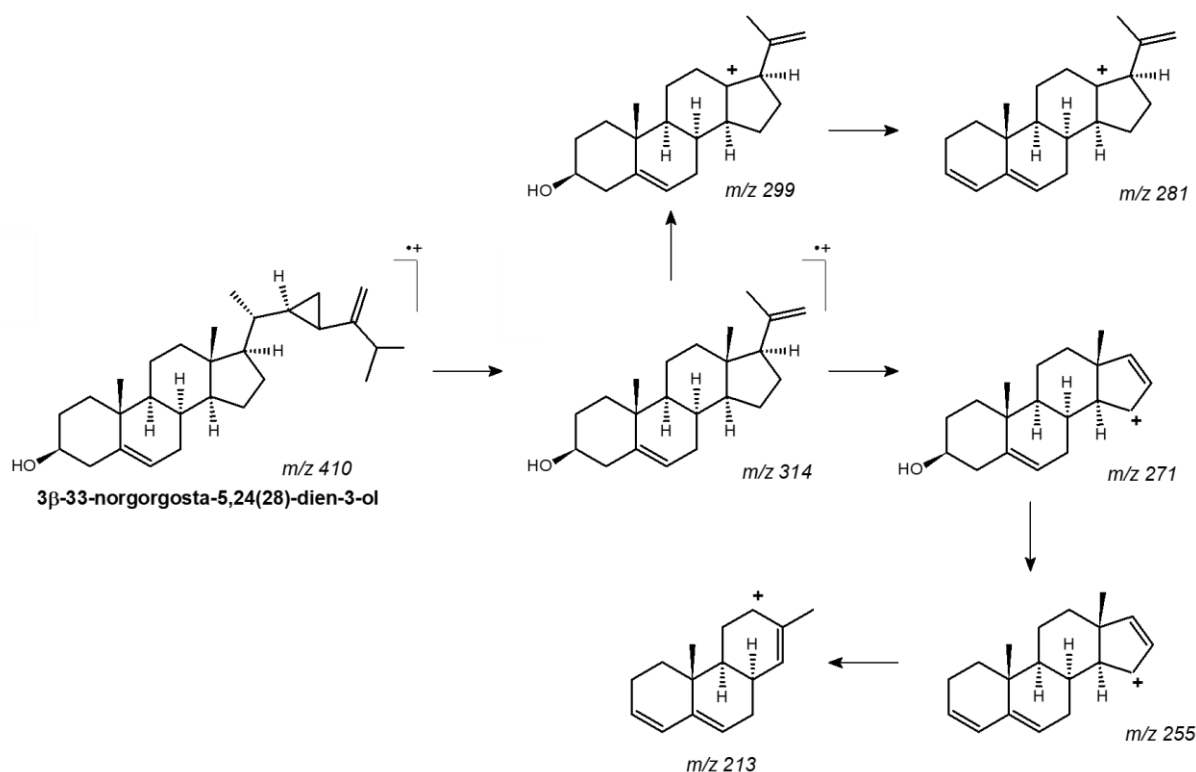


**Figura 45** - Proposta de fragmentação de 16.



**Fonte:** elaborado pelo autor.

O  $3\beta$ -33-norgorgosta-5,24(28)-dien-3-ol é um esteróide encontrado nos extratos etéreos do perianto de *Crocus sativus*. Esses extratos apresentaram atividade citotóxica moderada na inibição de células tumorais (ZHENG et al., 2011).

**Figura 46** – Espectro de massas de 17.**Figura 47** - Proposta de fragmentação de 17.

**Fonte:** elaborado pelo autor.

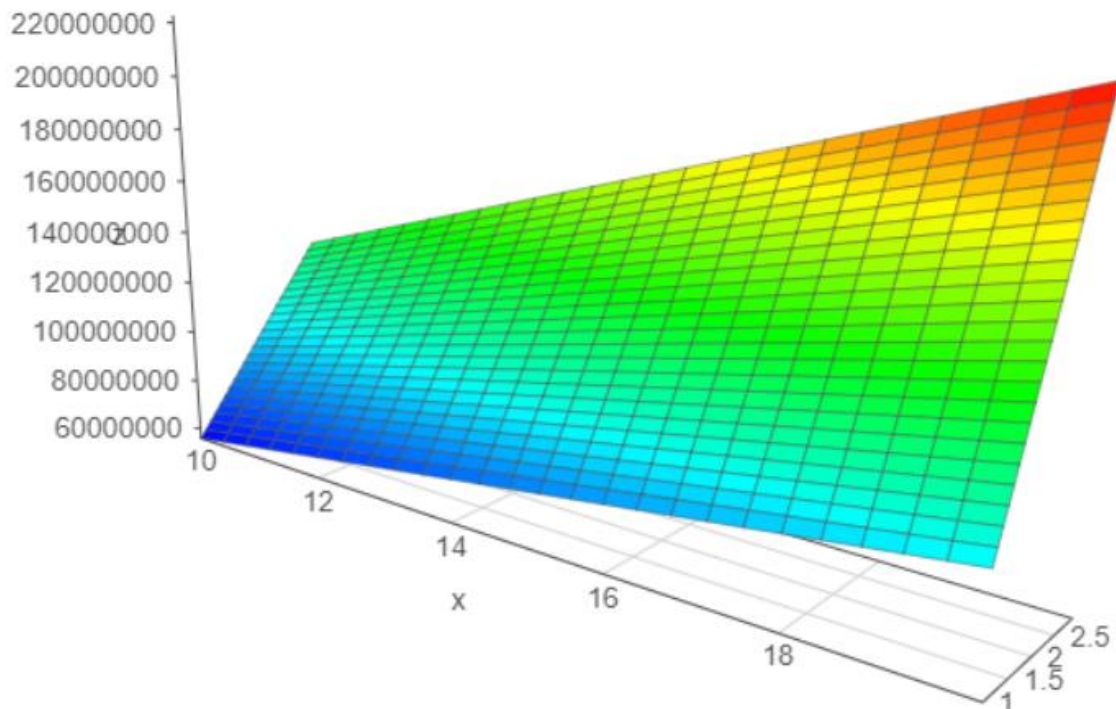
Além disso, foi realizado um planejamento fatorial completo com o intuito de melhorar a metodologia extratora utilizada nos experimentos preliminares, para obtermos a maior quantidade de metabólitos em sua maior concentração utilizando a menor quantidade de solventes. Para isso, foi utilizada a área de bandas cromatográficas de ergosterol obtidas em cada experimento. Essas respostas encontram-se na Tabela 8 e foram utilizadas para o cálculo do ótimo da condição de extração relacionando tempo de análise, quantidade de extrações e volume de solvente.

**Tabela 8** - Área dos picos de ergosterol nos experimentos do planejamento fatorial para o solvente hexano.

Exp	Volume	nº	Tempo	Área de pico (Levedura vazia)	Área de pico (Levedura transformada)
1	10	1	20	8,26E+06	3,58E+06
2	20	1	20	4,24E+06	5,50E+06
3	10	3	20	1,05E+07	1,05E+07
4	10	3	20	1,86E+07	1,62E+07
5	20	1	30	8,38E+06	3,26E+06
6	10	1	30	4,26E+06	5,68E+06
7	20	3	30	1,07E+07	1,07E+07
8	10	3	30	1,90E+07	1,65E+07

Dessa forma, obteve-se uma superfície de resposta para cada solvente utilizado com ambas as leveduras, de modo que, a Figura 48 representa a superfície para o extrato hexânico. Analisando e comparando as superfícies de resposta percebemos a similaridade entre elas para os diferentes solventes.

**Figura 48** - Superfície de resposta gerada a partir dos dados obtidos nos experimentos de otimização das condições de extração.



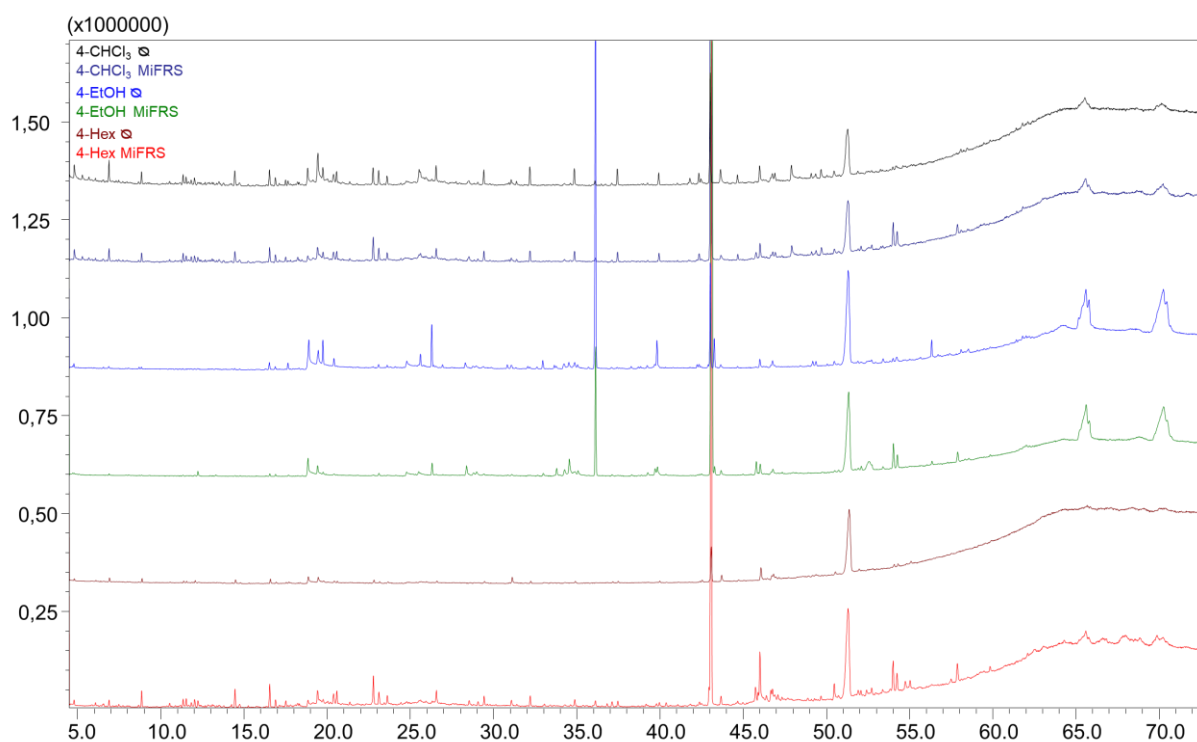
$$N = 1,05 \times 10^7 + 1,03 \times 10^6 * V + 4,21 \times 10^6 * n^{\circ} + 3,07 \times 10^6 * V$$

Dessa forma, N é a área das bandas cromatográficas do ergosterol em cada ponto da equação, V é o volume de solvente e nº é a quantidade de processos de extração. De acordo com a superfície de resposta gerada a partir do planejamento

experimental, a maior área das bandas de ergosterol está relacionada à região de coloração vermelho intenso (Figura 48). Assim, apesar de ainda ser necessário realizar o ajuste fino com um planejamento pelo composto central, foi observado que o ótimo dessa região ocorre com 3 extrações de 20 mL cada, e o tempo de 20 minutos.

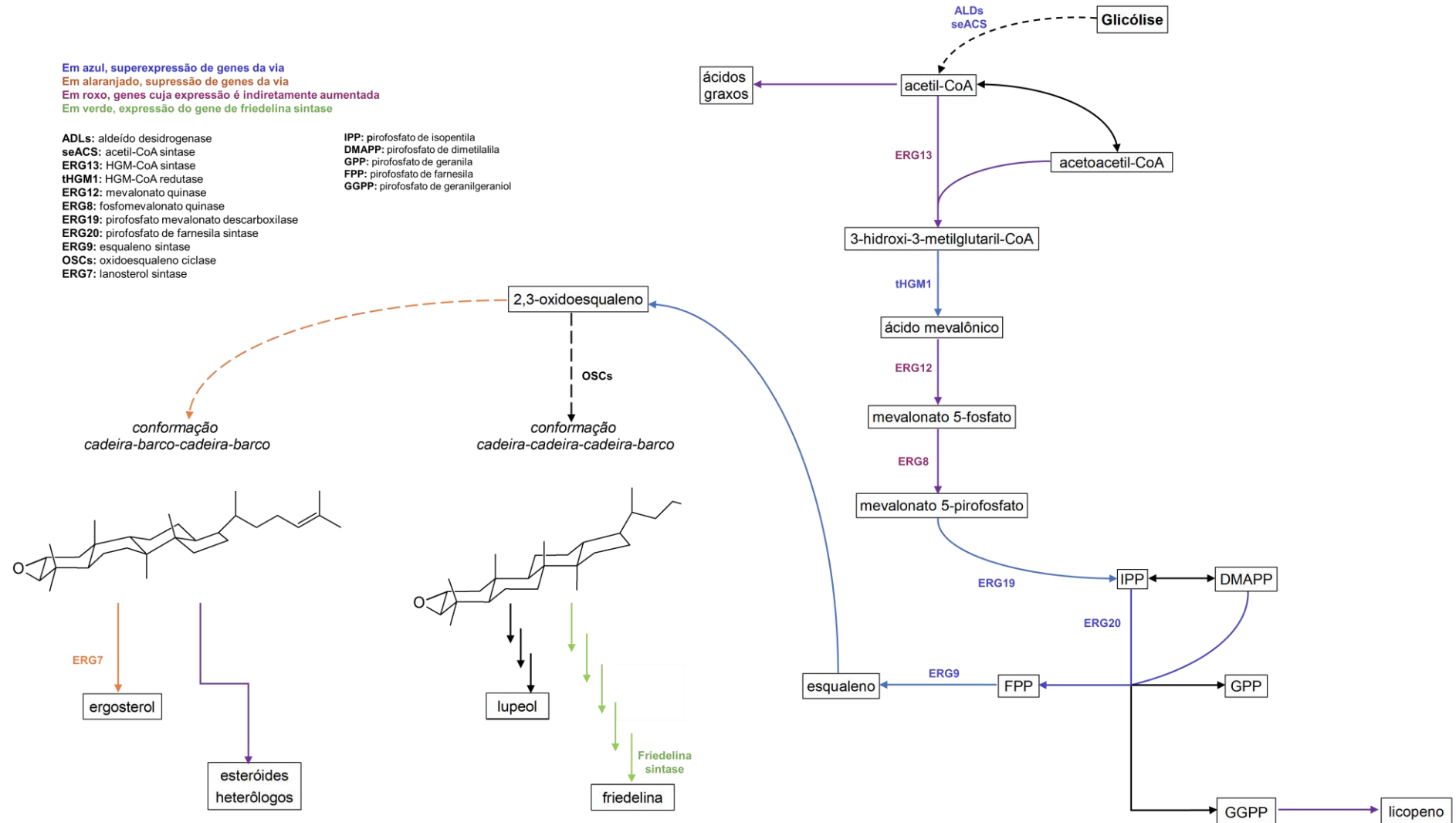
Assim, definidas as condições ótimas de extração, foram analisados os cromatogramas com as maiores áreas das bandas cromatográficas e, conseqüentemente, as maiores quantidades de metabólitos, representados na Figura 49.

**Figura 49** - Comparação dos perfis cromatográficos (CG-EM) dos extratos da levedura contendo os plasmídeos vazio e com os genes de friedelina sintase nos diferentes solventes.\*(Condições de análise:  $T_{injeção}$ : 270,0 °C; Rampa de aquecimento de 140 a 320°C (3 °C/min.);  $T_{trap}$ : 270 °C por 4 min.;  $V_{injeção}$ : 1  $\mu$ L; Split 1:10; Tempo de análise: 73 min.)



Os dados obtidos nesses cromatogramas corroboraram a produção de friedelina, além das outras substâncias identificadas. Entretanto, não foram observadas outras alterações das vias metabólicas, além daquelas previamente observadas. Dessa forma, pode-se sugerir um mapa metabólico da levedura transformada com o vetor contendo os genes friedelina sintase destacando as alterações nas vias metabólicas (Figura 50).

**Figura 50 -** Mapa metabólico de produção de triterpenos e esteróides na levedura transformada.



Fonte: elaborado pelo autor.



## 6 CONCLUSÃO

As diferenças metabólicas especialmente importantes observadas pela análise metabolômica da levedura geneticamente modificada com os genes da friedelina sintase e do controle, estão centradas no aumento do consumo de precursores da via do mevalonato. Assim, foi observado um aumento significativo de isoprenóides, levando a produção de geraniol, geranilgeraniol, esqualeno e licopeno e a diminuição da produção do lanosterol, como era esperado. Da mesma forma, a produção de triterpenos foi favorecida com o acúmulo da friedelina, além da formação endógena do lupeol. Novos esteróides com diferentes níveis de oxidação e endógenos ao sistema heterólogo, foram biossintetizados, corroborando a perturbação das vias metabólicas do *Saccharomyces cerevisiae*, proporcionados também pela ativação da via do mevalonato. Dados desse novo perfil metabólico encontrado no *Saccharomyces cerevisiae*, submetido a experimentos de engenharia metabólica, oferecem novos horizontes para o aumento da diversidade metabólica em leveduras, pela aplicação da biologia sintética e da expressão gênica.

## 7 REFERENCIAS

ABDALLAH, I.I.; QUAX, W. J. A glimpse into the biosynthesis of terpenoids. In: International Conference on Natural Resources and Life Sciences, 2016, Surabaya. **NRLS Conference Proceedings...** KnE Life Sciences, 2017, p. 81-98.

ALLISON, A.C. et al. Celastrol, a potent antioxidant and anti-inflammatory drug, as possible treatment for Alzheimer's disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 25, n. 7, p. 1341-1357, 2001.

ALVES, S.P. et al. Short communication: the heptadecenoic acid in ruminant fats. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 170-173, 2006.

ALVES, T. et al. Friedelin in *Maytenus ilicifolia* is produced by friedelin synthase isoforms. **Molecules**, v. 23, p. 700-711, 2018.

ANTONISAMY, P. et al. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* Lam. in mouse and rat models. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, p. 1070–1077, 2011.

ANTONISAMY, P. et al. Protective effects of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* Lam. against ethanol-induced gastric ulcer in rats and possible underlying mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, v. 750, p. 167-175, 2015.

BABIYCHUK, E. et al. Allelic mutant series reveal distinct functions for *Arabidopsis* cycloartenol synthase 1 in cell viability and plastid biogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 8, p. 3163-3168, 2008.

BALAMURUGAN R.; DURAIPANDIYAN V.; IGNACIMUTHU S. Antidiabetic activity of  $\gamma$ -sitosterol isolated from *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 667, n. 1–3, p. 410–418, 2011.

BARREIRO, E.J., BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARTON, D.H.R; NAKANISHI, K. **Comprehensive Natural Products Chemistry**. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 1999.

BECKER J.; WITTMANN C. Bio-based production of chemicals, materials and fuels – *Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 631-640, 2012.

BERLINCK, R.G.S. et al., A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706-710, 2017.

BOLZANI, V.D.S. et al. Natural products from brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 1837-1846, 2012.

BROWN, S.; TAULER, R.; WALCZAK, B (Ed.). **Comprehensive chemometrics: chemical and biochemical data analysis**. Amsterdam: Elsevier, 2009.

CALIPH, S.M.; FAASSEN, F.W.; PORTER, C.J.H. The influence of intestinal lymphatic transport on the systemic exposure and brain deposition of a novel highly lipophilic compound with structural similarity to cholesterol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 66, p. 1377-1387, 2017.

CHRISTOPHER, R. et al. A new cinnamoyl glycoflavonoid, antimycobacterial and antioxidant constituents from *Heritiera littoralis* leaf extracts. **Natural Products Research**, v. 28, n. 6, p. 351–358, 2014.

CORSINO, J. et al. Quantitative determination of maitenin and 22 $\beta$ -hydroxymaitenin in callus of *Maytenus aquifolium* (Celastraceae) by reverse phase high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 9, n. 5, p. 245-247, 1998.

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, 2000.

COSTA, P.M., et al. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicology in vitro**, v. 22, n. 4, p. 854-863, 2008.

CRAVATT, B. F., et al. Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. **Science**, v. 268, n. 5216, p. 1506–1509, 1995.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Maryland: American Society of Plant Physiologists, p. 1250–1318, 2000.

DANIEL M. **Medicinal plants: chemistry and properties**. Enfield: Science Publishers, 2006.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2nd ed. West Sussex: John Wiley & Sons, 2002.

<http://www.drugbank.ca/drugs/DB03796>

[www.ewg.org/skindeep/ingredient/718977/ETHYL\\_PALMITATE/#.Wo3OGIFv80M](http://www.ewg.org/skindeep/ingredient/718977/ETHYL_PALMITATE/#.Wo3OGIFv80M)

HIRSCH, A.L. Industrial Aspects of Vitamin D. In: FELDMAN, D.; PIKE, J.W.; ADAMS, J.S. (Ed.). **Vitamin D**: Two-Volume Set. 3rd. ed. Cambridge: Academic Press, p. 73-93, 2011.

GAJOWIK, A., DOBRYZNAKSA, M.M. The evaluation of protective effect of lycopene against genotoxic influence of X-irradiation in human blood lymphocytes. **Radiation Environmental Biophysics**, v. 56, n. 4, p. 413-422, 2017.

GAS-PASCUAL, E., et al. Plant oxidosqualene metabolism: cycloartenol synthase-dependent sterol biosynthesis in *Nicotiana benthamiana*. **PLoS One**, v. 9, n. 10, 2014.

GOMES, J.P.M. et al. Antitumoral, mutagenic and (anti)estrogenic activities of tingenone and pristimerin. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 6, p. 963-971, 2011.

GULLO, F. P. et al. Antifungal activity of maytenin and pristimerin. **Evidence-Based Complementary Alternatervative Medicine**, v. 2012, 340787, 2012.

GUNATILAKA, A.A.L. Triterpenoid quinonemethides and related compounds (Celastroloids). In: HERZ, W. et al. (Ed.). **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, New York: Springer-Verlag/Wien, vol. 67, p. 1-123, 1996

HOLTON, R.A, et al. First total synthesis of taxol. 1. Funcionalization of the B ring. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 4, p. 1597-1598, 1994a.

HOLTON, R.A, et al. First total synthesis of taxol. 2. Completion of the C and D rings. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 4, p. 1599-1600, 1994b.

HOOPER, S.N, CHANDLER, F.R. Herbal remedies of the maritime Indians: phytosterols and triterpenes of 67 plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 10, n. 2, p. 181-194, 1984.

HRYCAY, E.G., BANDIERA, S.M. Cytochrome P450 enzymes. In: GAD, S.C. (Ed.) **Preclinical Development Handbook: ADME and Biopharmaceutical Properties** Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., pp 627–696, 2008.

HUANG, B. et al. Heterologous production of secondary metabolites as pharmaceuticals in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v.30, n.7, p.1121-1137, 2008.

HUANG, C. B., GEORGE, B., EBERSOLE, J. L. Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms. **Archives of Oral Biology**, v. 55, p. 555-560, 2010.

HUANG, S. et al. Pristimerin inhibits prostate cancer bone metastasis by targeting PC-3 stem cell characteristics and VEGF-induced vasculogenesis of BM-EPCs. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 37, p. 253–268, 2015.

ITO, H. et al. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. **Journal of Bacteriology**, v. 153, n. 1, p. 163-168, 1983.

KALSCHEUER, R., STÖLTING, T., STEINBÜCHEL, A. Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production. **Microbiology**, v. 152, p. 2529-2536, 2006.

KAUR, G., VERMA, N. Nature curing cancer – review on structural modification studies with natural active compounds having anti-tumor efficiency. **Biotechnology Reports**, v. 6, p. 64-78, 2015.

KIM, H. J., PARK, G. M. & KIM, J. K. Anti-inflammatory effect of pristimerin on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, p. 495–500, 2013.

KOHNO, Y. et al. Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. **Biochimia et Biophysica Acta**, v. 1256, n.1, p. 52-56, 1995.

KOSMIDES, A.K. et al. Metabolomic fingerprinting: Challenges and opportunities. **Critical Reviews™ in Biomedical Engineering**, v. 41, n. 3, p. 205-221, 2013.

KUETE, V. et al. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). **Journal of Ethnopharmacol**, v. 109, p. 372–379, 2007.

LEONCINI I. et al. Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 101, n. 50, p. 17559–17564, 2004.

LIU, J. et al. Treatment of obesity with celastrol. **Cell**, v. 161, n. 5, p. 999-1011, 2015.

LUO, Y. et al. Engineered Biosynthesis of Natural Products in Heterologous Hosts. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 15, p. 5265-5290, 2015.

MANN, A. et al. Antimycobacterial Friedelane-terpenoid from the Root Bark of *Terminalia avicennioides*. **American Journal of Chemistry**, v. 1, p. 52–55, 2011.

MARIENHAGEN, J., BOTT, M. Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 166-178, 2013.

MASATAKA, F. et al. Possible involvement of long chain fatty acids in the spores of *Ganoderma lucidum* (reishi houshi) to its anti-tumor activity. **Biological and pharmaceutical bulletin**, v. 31, n. 10, p. 1933-1937, 2008.

MECHOULAM, R. et al. Anandamide may mediate sleep induction. **Nature**, v. 389, n. 6646, p. 25–26, 1997

MURUGAN, K. et al. Antibiofilm and quorum sensing inhibitory activity of *Achyranthes aspera* on cariogenic *Streptococcus* mutants: An in vitro and in silico study. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 6, p. 728-736, 2013.

NAGEL, R. et al. *Arabidopsis thaliana* isoprenyl diphosphate synthases produce the C25 intermediate geranylarnesyl diphosphate. **The Plant Journal**, v. 84, n.5, p. 847–859, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2016.

NIERO, R., ANDRADE, S.F., 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, 2011.

NÚÑEZ, M.J. et al. Dihydro- $\beta$ -agarofuran sesquiterpenes from Celastraceae species as anti-tumor-promoting agents: Structure-activity relationship. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 111, p. 95-102, 2016.

OHIZUMI, H. et al. Geranylgeraniol is a potent inducer of apoptosis in tumor cells. **Journal of Biochemistry**, v. 117, p. 11-13, 1995.

PATTI, G.J; YANES, O.; SIUZDAK, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 263-269, 2012.

PAZ, T.A. et al. Proteome profiling reveals insights into secondary metabolism in *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) cell cultures producing quinonemethide triterpenes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 130, n. 2, p. 405-416, 2017.

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, 22627, 2016.

POURMOUSA, M. et al. Dehydroergosterol as an analogue for cholesterol: why it mimics cholesterol so well-or does it? **Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 26, p. 7345-7357, 2014.

RAO, C.V., NEWMARK, H.L., REDDY, B.S. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 2, p. 287-290, 1998.

RING, J. et al. The metabolism beyond programmed cell death in yeast. **Experimental Cell Research**, v. 311, p. 1193, 2012.

ROESSNER, U.; NAHID, A. Metabolomics – the combination of analytical biochemistry, biology, and informatics. In: MOO-YOUNG, M. (Ed.). **Comprehensive Biotechnology**, 2nd. Ed. p. 447-459, 2011.

SALEEM, M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. **Cancer Letters**, v. 285, n. 5, p. 109-115, 2009

SANGSUWON, C. et al. Antiproliferative effect and the isolated compounds of *Pouzolzia indica*. **Evidence-Based Complementary Alternaternative Medicine**, v. 2013, 342352, 2013.

SONG, B., JAVITT, N., B., DEBOSE-BOYD, R., A. Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. **Cell Metabolism**, v. 1, n. 3, p. 179-189, 2005.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, n. 2, 2004.

SOUZA-MOREIRA, T.M. et al. Friedelin synthase from *Maytenus ilicifolia*: leucine 482 plays an essential role in the production of the most rearranged pentacyclic triterpene. **Scientific Reports**, v. 6, 36858, 2016.

SUNIL, C. et al. Antioxidant, free radical scavenging and liver protective effects of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* Lam. Leaves. **Food Chemistry**, v. 139, p. 860-865, 2013.

[www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00+C45:C5801251](http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00+C45:C5801251)

THOLL, D. Terpene synthases and regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 297-304, 2006.

THOLL, D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 148, p. 63-106, 2015.

TOMITA, Y. Immunological role of vitamin A and its related substances in prevention of cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 5, n. 3-4, p. 187-194, 1983.

VELOSO, C.C. et al. Pharmacological potential of *Maytenus* species and isolated constituents, especially tingenone, for treatment of painful inflammatory diseases. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, p. 533-540, 2017.

VRANOVÁ, E., COMAN, D., GRUISSEM, W. Structure and dynamics of isoprenoid pathway network. **Molecular Plant**, v. 5, n. 2, p. 318-333, 2012.

WANI, M. C. et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal American Chemistry Society**, v. 93, n. 9, p. 2325-2327, 1971.

WEETE, J.D; ABRIL, M.; BLACKWELL, M. Phylogenetic distribution of fungal sterols. **PLoS ONE**, v. 5, 10899, 2010.

<http://www.wrchem.com/product/westco-oleamide-vbr/>

<http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=652>

XUE, Z. et al. Divergent evolution of oxidosqualene cyclases in plants. **New Phytologist**, v. 193, p. 1022–1038, 2012.

YANG, H. et al. Celastrol, a triterpene extracted from the chinese “Thunder of God Vine,” is a potent proteasome inhibitor and suppresses human prostate cancer growth in nude mice. **Cancer Research**, v. 66, n. 9, p. 4758-4765, 2006

YUAN-TING, L. et al. Protein engineering of *Saccharomyces cerevisiae* oxidosqualene-lanosterol cyclase into parkeol synthase. **Organic Letters**, v. 14, n.20, p. 5222-5225, 2012.

ZHENG, C. et al. Chemical constituents and bioactivities of the liposoluble fraction from different medicinal parts of *Crocus sativus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 7, p. 756-763, 2011.